

УДК 577.3

ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЙ БИОСЕНСОР HyPer КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО УРОВНЯ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА

© 2024 г. О. Г. Люблинская¹, *, Ю. С. Иванова¹¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Россия

*E-mail: o.lyublinskaya@mail.ru

Поступила в редакцию 07.12.2023

После доработки 14.12.2023

Принята к публикации 14.12.2023

В настоящем мини-обзоре систематизирована информация о методах количественной оценки внутриклеточной концентрации перекиси водорода, основанных на использовании генетически кодируемого сенсора пероксида HyPer . Рассматриваются два подхода: 1) градуировка биосенсора с использованием экзогенной перекиси водорода, основанная на оценке скорости проникновения пероксида в клетки и внутриклеточной пероксидазной активности; 2) прямое определение внутриклеточного содержания пероксида, основанное на измерении уровня окисления биосенсора, константы реакции окисления и константы реакции восстановления HyPer в клетках. Применение этих методов позволяет решать широкий спектр задач клеточной редокс-биологии — ранжировать диапазон физиологических и повреждающих концентраций перекиси водорода в клетках, оценивать эффективность системы антиоксидантной защиты в различных клеточных компартментах в условиях окислительного стресса, определять вклад различных ферментативных систем в пероксидазную активность клеток и изучать особенности систем антиоксидантной защиты в различных биологических контекстах (в процессе клеточного старения, дифференцировки, репрограммирования, при развитии патологий). Описанные методы могут быть адаптированы для других генетически-кодируемых биосенсоров перекиси водорода.

Ключевые слова: перекись водорода, антиоксидантная защита, пероксидазная активность, генетически кодируемые биосенсоры, HyPer

DOI: 10.31857/S0041377124030026, EDN: PERHTF

Перекись водорода (H_2O_2) является участником многих метаболических и сигнальных каскадов в клетках аэробных организмов (Sies, Jones, 2020). Эта молекула образуется в различных клеточных компартментах — либо в реакциях, сопровождающихся восстановлением молекулярного кислорода (O_2) путем присоединения двух атомов водорода, либо в результате спонтанной или ферментативной дисмутации супероксидного анион-радикала $\text{O}_2^{\cdot -}$, образующегося из O_2 . Часть продуцируемой в клетках H_2O_2 является побочным продуктом внутриклеточного метаболизма. Например, в пероксисомах H_2O_2 может синтезироваться в ходе катаболических реакций при окислении различных субстратов (длинноцепочечных жирных кислот, аминокислот), а в митохондриях — как результат клеточного дыхания. Другая часть молекул H_2O_2 образуется в реакциях сигнальных каскадов. Источниками, пополняющими пул регуляторно-активных молекул H_2O_2 , считаются преимущественно NADPH-оксидазы — ферменты, локализующиеся

на плазматической мембране, а также на мембранах внутриклеточных органелл (Sies et al., 2017). Параллельно с реакциями генерации H_2O_2 в клетке постоянно протекают реакции разложения пероксида, а ответственные за это ферментативные системы образуют основу систем антиоксидантной защиты клетки. H_2O_2 удаляется высокопродуктивными ферментами, такими как пероксиредоксины, глутатионпероксидазы и каталаза (Sies et al., 2017). Эти ферменты, функционирующие в разных клеточных компартментах, обеспечивают точный контроль внутрикомпаратментных уровней H_2O_2 , поддержание которых критически важно для сохранения функционирования и жизнеспособности клеток. Внутриклеточная концентрация H_2O_2 зависит от физиологического контекста и, согласно последним оценкам, может исчисляться от единиц до сотен нМ (Sies 2021). Концентрация H_2O_2 служит важнейшей характеристикой физиологического состояния клеток, а её повышение часто служит индикатором патологических состояний, таких как индукция

апоптотической программы или клеточного старения. При этом важно понимать, что под термином внутриклеточная концентрация в данном случае понимается показатель, усредненный по объёму клетки, однако в реальности он формируется за счет локальных в пространстве и ограниченных во времени колебаний уровня пероксида, обеспечивающих протекание H_2O_2 -зависимых сигнальных и метаболических процессов.

Чтобы разобраться, какую роль играет H_2O_2 в великом множестве метаболических и сигнальных каскадов клетки, и как научиться корректировать нарушения внутриклеточного редокс-гомеостаза, сопровождающиеся изменением физиологически релевантного уровня H_2O_2 , нужны инструменты, позволяющие специфично и количественно оценивать внутриклеточные и внутрикомпаратментные концентрации пероксида. Однако проведение подобных измерений в живых клетках вплоть до последнего времени было практически невозможным, и лишь создание и внедрение в лабораторную практику новых молекулярных инструментов — генетически кодируемых флуоресцентных биосенсоров H_2O_2 — стало прорывом, позволившим продвинуться вперед в решении этих сложных задач.

Благодаря усилиям целого круга научных коллективов, разрабатывающих различные стратегии применения биосенсоров H_2O_2 в редокс-биологии, в последние годы появилась серия работ, описывающих методы количественной характеристики H_2O_2 -опосредованных процессов в живых клетках. На наш взгляд, пришла пора систематизировать эти исследования и обрисовать круг возможных задач, для решения которых можно применять эти методы.

В настоящем мини-обзоре мы сконцентрируемся на том, какие возможности для количественного определения внутриклеточного уровня H_2O_2 открывает генетически кодируемый биосенсор HyPer и постараемся описать, как можно использовать эти возможности для изучения метаболизма H_2O_2 в клетках человека в норме и патологии. На протяжении всего текста мы будем преимущественно говорить о первой, появившейся в 2006 г., версии биосенсора HyPer (Belousov et al. 2006), поскольку большинство экспериментов по количественному измерению внутриклеточного содержания H_2O_2 проводили именно с этим вариантом сенсора. Перспективы использования новейшей, более чувствительной версии биосенсора, HyPer7 (Pak et al., 2020), мы коротко обсудим в последнем разделе обзора.

HyPer: СТРУКТУРА БИОСЕНСОРА И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К H_2O_2

HyPer представляет собой химерный белок, сконструированный путем внедрения пермутированной формы желтого флуоресцентного белка (сrYFP) в регуляторный домен природного сенсора H_2O_2 -бактериального транскрипционного фактора OxyR, регулирующего в *Escherichia coli* экспрессию антиоксидантов генов при повышении внутриклеточного уровня пероксида (Belousov et al., 2006). Под действием H_2O_2 в домене OxyR образуется дисульфидная связь, домен претерпевает конформационные изменения, которые влияют на протонирование сrYFP, что приводит к изменению его флуоресцентных свойств. Максимум спектра флуоресценции HyPer расположен в зеленой области спектра (516 нм). Для биосенсора характерно наличие двух пиков возбуждения флуоресценции — в фиолетовой области (400—420 нм, соответствует восстановленной форме HyPer) и голубой области спектра (480—500 нм, соответствует окисленной форме HyPer). Соответственно, при увеличении доли окисленных молекул биосенсора, в спектре возбуждения флуоресценции HyPer происходит пропорциональное увеличение возбуждения в полосе 480—500 нм и уменьшение возбуждения в полосе 400—420 нм (Belousov et al., 2006). Флуорофор биосенсора (сrYFP) отличается высокой яркостью и светостойкостью. Коэффициент экстинкции при 490 нм составляет $17000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Bilan et al., 2013). Высокая чувствительность HyPer к H_2O_2 определяется константой скорости его реакции с пероксидом ($5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Bilan et al., 2013).

Генетическая последовательность, кодирующая биосенсор, может доставляться в клетки или отдельные клеточные компартменты с использованием методов плазмидной трансфекции или вирусной трансдукции (Bilan, Belousov, 2016). Для доставки HyPer в выбранный клеточный компартмент используется вариант генетической последовательности HyPer, слитый с сигналом локализации в этом компартменте. Измерение флуоресцентных сигналов HyPer, экспрессируемого в клетках или тканях модельных животных, при использовании возбуждающих лазеров с длиной волны 405 и 488 нм позволяет судить о соотношении окисленной и восстановленной формы биосенсора и отслеживать таким образом изменения уровня H_2O_2 в клеточных компартментах с высокой степенью специфичности и чувствительности, которые недоступны для других существующих методов детекции пероксида в живых системах (Mishina et al., 2013; Bilan, Belousov, 2016).

Как и другие биосенсоры, созданные на основе *srYFP*, флуоресцентный сигнал HyPer является pH-зависимым, так как спектральные свойства биосенсора зависят от протонирования домена *srYFP*. Поскольку величина *pKa* HyPer составляет 8.5, то даже при небольшом защелачивании внутриклеточной среды, pH которой типично находится в диапазоне 7.0—7.5, наблюдаются изменения в спектре возбуждения локализованного в клетках HyPer, аналогичные тем, которые наблюдаются при его окислении. Чтобы разделить два эффекта (депротонирование при изменении pH и депротонирование при окислении под действием H_2O_2), в экспериментах, наряду с HyPer, как правило, используют его контрольный белок — *SyrPer*, отличающийся от HyPer одной аминокислотной заменой C199S. Мутация C199S приводит к утрате белком H_2O_2 -чувствительности, но сохраняет в неизменности зависимость его флуоресцентных свойств от pH (Bilan, Belousov, 2016).

МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО СИГНАЛА HyPer

Как правило, в экспериментах *in vitro* с клетками, экспрессирующими HyPer, используется лазерная конфокальная микроскопия, которая позволяет визуализировать флуоресценцию биосенсора и отслеживать его редокс-статус в живых клетках (Mishina et al., 2013). Еще одним эффективным методом детекции сигнала биосенсора является использование планшетных флуориметров (Malinouski et al., 2011), и, наконец, недавно появилась еще одна опция для подобного анализа — проточная цитометрия (Lyublinskaya et al., 2018). Использование в экспериментах различных модификаций биосенсора, локализованных в разных клеточных компартментах (цитозоль, ядро, митохондрии) или субкомпартаментах (межмембранное митохондриальное пространство, заякоривание на промежуточных филаментах) обеспечивает возможность изучать метаболизм пероксида на уровне отдельных сайтов локализации HyPer (Malinouski et al., 2011; Mishina et al., 2019).

В процессе измерений обычно детектируется ратиометрический сигнал HyPer — отношение сигналов флуоресценции биосенсора при двух разных длинах волн возбуждения (488 и 405 нм), соответствующих его окисленной и восстановленной форме. Измерение ратиометрического сигнала позволяет проводить качественный анализ — наблюдать изменение внутриклеточного или внутрикомпарментного уровня H_2O_2 под воздействием различных стимулов. При использовании планшетных

флуориметров и проточной цитометрии удается, кроме того, определять долю окисленного/восстановленного сенсора в клеточных компартментах и субкомпартаментах, используя прием калибровки флуоресцентных сигналов биосенсора. Для калибровки к клеткам добавляются высокие дозы дитиотреитола (ДТТ, обычно 10—30 мМ) и экзогенной H_2O_2 (100—1000 мкМ), обеспечивающие полное восстановление и окисление HyPer соответственно. При подобной калибровке долю окисленного сенсора в клетке (OxD — oxidation degree), изменяющуюся в пределах от 0 до 1, можно определить по формуле (Meयर, Dick, 2010):

$$OxD = \frac{I_{488} \times I_{405DTT} - I_{488DTT} \times I_{405}}{I_{488} \times I_{405DTT} - I_{488} \times I_{405H_2O_2} + I_{488H_2O_2} \times I_{405} - I_{488DTT} \times I_{405}} \quad (1)$$

где OxD = N_{ox}/N_{tot} — отношение фракции окисленных (ox) молекул HyPer к его общему (tot) количеству в клетке, I_{488} и I_{405} — флуоресцентные сигналы биосенсора в клетках интереса, измеренные при длинах волн возбуждения 488 и 405 нм соответственно, а I_{DTT} и $I_{H_2O_2}$ — сигналы, измеренные в образцах клеток при инкубации с калибровочными дозами ДТТ и H_2O_2 соответственно. Измерение доли окисленного сенсора позволяет проводить не только качественные, но и количественные оценки внутриклеточных уровней H_2O_2 с использованием приёмов, описанных в следующем разделе обзора.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ HyPer ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ H_2O_2 В УСЛОВИЯХ ВНЕШНЕЙ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ НАГРУЗКИ НА КЛЕТКИ

В условиях окислительного стресса, индуцированного внеклеточными источниками H_2O_2 , конечная скорость проникновения H_2O_2 через плазматическую мембрану и эффективная внутриклеточная элиминация H_2O_2 ферментами антиоксидантной защиты приводит к значительной разнице между внеклеточной и внутриклеточной концентрацией пероксида: внутри клетки уровень H_2O_2 оказывается намного меньше, чем снаружи (Antunes, Cadenas, 2000). Клеточные пероксидазы элиминируют избыточную перекись намного быстрее, чем она проникает в клетку, и устанавливающийся внутриклеточный уровень H_2O_2 зависит от конкуренции этих двух процессов. В исследованиях, посвященных влиянию повышенных внеклеточных уровней H_2O_2

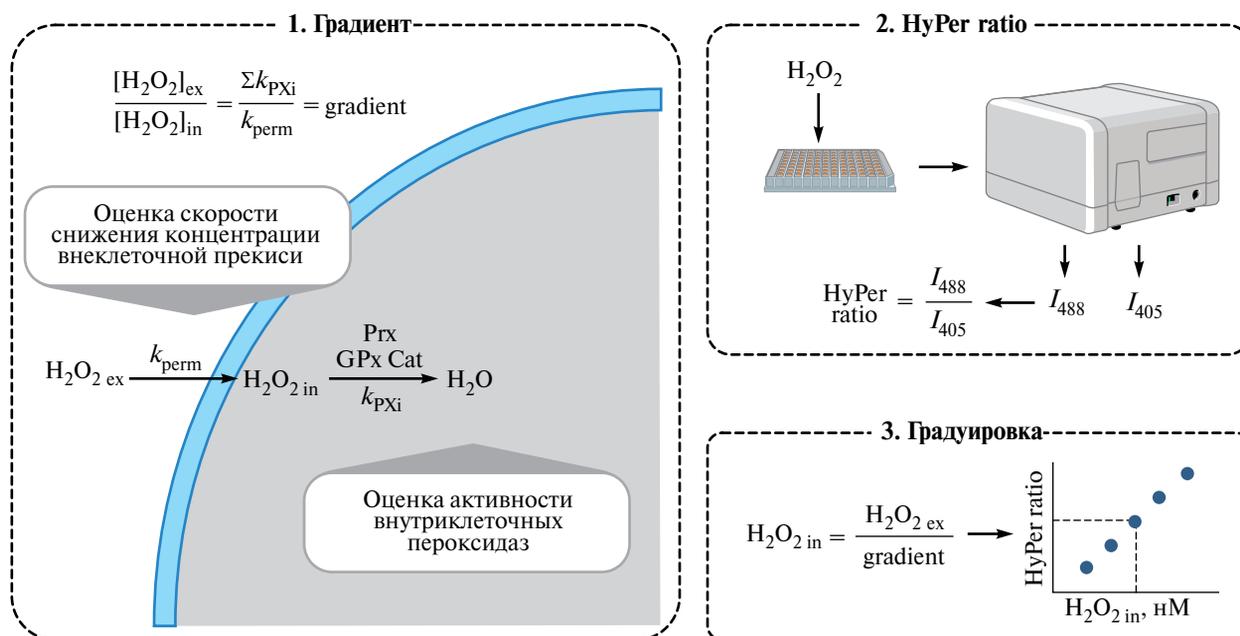


Рис. 1. Схема эксперимента по градуировке биосенсора HyPer в живых клетках с использованием экзогенной H_2O_2 . Обозначения: gradient – отношение внеклеточной концентрации H_2O_2 ($[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{ex}}$) к внутриклеточной ($[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{in}}$); k_{PXi} – константа скорости элиминации H_2O_2 внутриклеточными пероксидазами: пероксиредоксинами (Prx), глутатионпероксидазами (GPx), каталазой (Cat), c^{-1} ; k_{perm} – константа скорости проникновения H_2O_2 в клетку, c^{-1} ; HyPer ratio – ратиометрический сигнал биосенсора, отношение сигналов флуоресценции HyPer при двух разных длинах волн возбуждения: 488 нм (I_{488}) и 405 нм (I_{405}).

на физиологию клеток, отношение внеклеточной к внутриклеточной концентрации H_2O_2 принято называть градиентом H_2O_2 , хотя с точки зрения физической химии это некорректно – в этой области науки под концентрационным градиентом, как правило, понимается разность концентраций, но не их отношение. Однако поскольку термин «градиент H_2O_2 » стандартно используется в клеточной редокс-биологии для описания клеточного ответа на внешний окислительный стресс, мы позволим себе использовать его и в настоящем обзоре, толкуя его как безразмерную величину, отвечающую на вопрос, во сколько раз внеклеточная концентрация H_2O_2 превышает внутриклеточную.

Для количественного определения с помощью HyPer внутриклеточного уровня H_2O_2 в условиях окислительного стресса были разработаны две различные стратегии. Первая – градуировка биосенсора с помощью экзогенной H_2O_2 , и использование затем этой градуировки для определения уровня пероксида в клетках, находящихся в условиях окислительного стресса. Вторая стратегия – прямое измерение внутриклеточного содержания H_2O_2 , основанное на анализе кинетики окисления биосенсора в живых клетках непосредственно после индукции стресса. Рассмотрим подробнее оба предложенных подхода.

Градуировка HyPer с использованием экзогенной H_2O_2 . Подход, предлагающий использовать градуировку HyPer, был предложен коллективом авторов из лаборатории Hadley D. Sikes (Massachusetts Institute of Technology, США) около 10 лет назад (Huang, Sikes, 2014). В рамках этого подхода для градуировки биосенсора, локализованного в клетках, используются значения внутриклеточной концентрации, вычисленные на основе внеклеточной концентрации H_2O_2 и величине градиента, устанавливающегося после добавления к клеткам экзогенного пероксида. Градиент определяется с использованием метода, предложенного в 2000 г. Fernando Antunes (Lisbon University) (Antunes, Cadenas, 2000). Согласно этому методу, градиент вычисляется, основываясь на разнице между скоростью проникновения H_2O_2 в клетку и скоростью её элиминации внутриклеточными пероксидазами (рис. 1):

$$k_{\text{perm}} \times [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{ex}} = \Sigma_i k_{\text{PXi}} \times [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{in}}, \quad (2)$$

$$\text{gradient} = [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{ex}} / [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{in}} = \Sigma_i k_{\text{PXi}} / k_{\text{perm}}, \quad (3)$$

где k_{perm} – это константа скорости проникновения H_2O_2 внутрь клетки, k_{PX} – константа скорости элиминации пероксида внутриклеточными пероксидазами

(PX_i), а $[H_2O_2]_{ex}$ и $[H_2O_2]_{in}$ — вне- и внутриклеточная концентрации H_2O_2 соответственно.

Для определения скорости проникновения H_2O_2 измеряется скорость детоксификации H_2O_2 клетками: фотометрическим способом с использованием H_2O_2 -чувствительных реагентов (например, AmplexRed, 10-ацетил-3,7-дигидроксибензофенона) определяется внеклеточная концентрация H_2O_2 в разные временные точки после добавления в клеточную среду экзогенного пероксида. Для определения скорости внутриклеточной элиминации H_2O_2 пероксидазами клетки лизируют и проводят тесты на специфическую ферментативную активность пероксиредоксинов, глутатионпероксидаз, каталазы (основных участников процесса элиминации H_2O_2 в клетках) (Huang, Sikes, 2014). Определив таким образом градиент, можно вычислить значение $[H_2O_2]_{in}$ для каждой конкретной концентрации H_2O_2 , добавляемой в клеточную среду, и сопоставив это значение с измеренным флуоресцентным ратиометрическим сигналом *HuPer*, проградуировать сенсор. В дальнейшем эту градуировку можно использовать для определения внутриклеточной концентрации H_2O_2 в экспериментальных образцах клеток.

Предложенный в лаборатории Hadley D. Sikes протокол был реализован для определения диапазона цитотоксических и нецитотоксических внутриклеточных концентраций H_2O_2 при индукции окислительного стресса в культивируемых клетках линии HeLa (Huang et al., 2016). Для этих клеток вычисленное значение градиента составило 650 раз (Huang, Sikes, 2014). С использованием этой оценки авторы показали, что внутриклеточные концентрации H_2O_2 ниже 35 нМ не вызывают цитотоксических эффектов, в то время как концентрации, превышающие это значение, могут приводить к гибели клеток, однако токсичность пероксида зависит от времени воздействия H_2O_2 (Huang et al., 2016).

Несмотря на пионерский характер экспериментов, проведенных в лаборатории Hadley D. Sikes, позволивших впервые ранжировать диапазон физиологически релевантных и повреждающих внутриклеточных концентраций H_2O_2 , стоит отметить, что концепция предложенного метода, в рамках которой градиент H_2O_2 считается независимым от интенсивности окислительного воздействия, является значительным упрощением, что заставляет рассматривать полученные значения (Huang et al., 2016) с осторожностью — в большей степени как вероятные оценочные величины. Ещё одно ограничение этого подхода — невозможность оценки внутрикомпаратментных уровней H_2O_2 , устанавли-

вающих в условиях окислительного стресса, поскольку ферментативная пероксидазная активность, измеряемая для вычисления градиента и градуировки сенсора, определяется в тотальных клеточных лизатах. Помимо этого, метод достаточно трудоемкий и не может быть использован для рутинного измерения внутриклеточного содержания H_2O_2 .

Анализ кинетики окисления *HuPer*. Альтернативный подход для количественного определения внутриклеточного уровня H_2O_2 с использованием *HuPer* был предложен в работе авторов настоящего обзора, выполненной в сотрудничестве с Fernando Antunes (Lyublinskaya, Antunes, 2019). В рамках этого подхода было предложено определять концентрацию H_2O_2 , устанавливающуюся в различных компартментах клетки в условиях внешнего H_2O_2 -индуцированного стресса, основываясь на анализе кинетики окисления *HuPer*, локализованного в этих компартментах, непосредственно после добавления экзогенного пероксида в клеточную среду. При разработке метода авторы исходили из следующего:

1) анализ кинетики химических реакций служит удобным инструментом для определения концентраций реагирующих веществ (достаточно лишь знать константы протекающих реакций);

2) окисление внутриклеточных белков может быть описано с использованием кинетической модели, разработанной ранее (Brito, Antunes, 2014);

3) скорость реакции окисления *HuPer* в клетках существенно, на несколько порядков, ниже скорости установления внутриклеточной концентрации H_2O_2 после добавления к клеткам экзогенного пероксида (Lim et al., 2016; Lyublinskaya et al., 2018).

Был разработан протокол для измерения внутрикомпаратментных уровней H_2O_2 , устанавливающихся в условиях постоянного присутствия экзогенного пероксида во внеклеточном пространстве (Lyublinskaya, Antunes, 2019; Zenin и др., 2022). Первый этап протокола (рис. 2) подразумевает измерение кинетических кривых. С использованием планшетного флуориметра или проточного цитометра отслеживается кинетика окисления *HuPer*, локализованного в изучаемом клеточном компартменте — измеряются флуоресцентные сигналы, соответствующие окисленной и восстановленной форме биосенсора в зависимости от времени, прошедшего после добавления H_2O_2 в клеточную среду (Zenin et al., 2022). Второй этап протокола предполагает вычисление на основе полученных данных доли окисленного биосенсора OxD (см. уравнение 1) и аппроксимацию кинетических кривых уравнениями химической кинетики (Brito, Antunes, 2014).

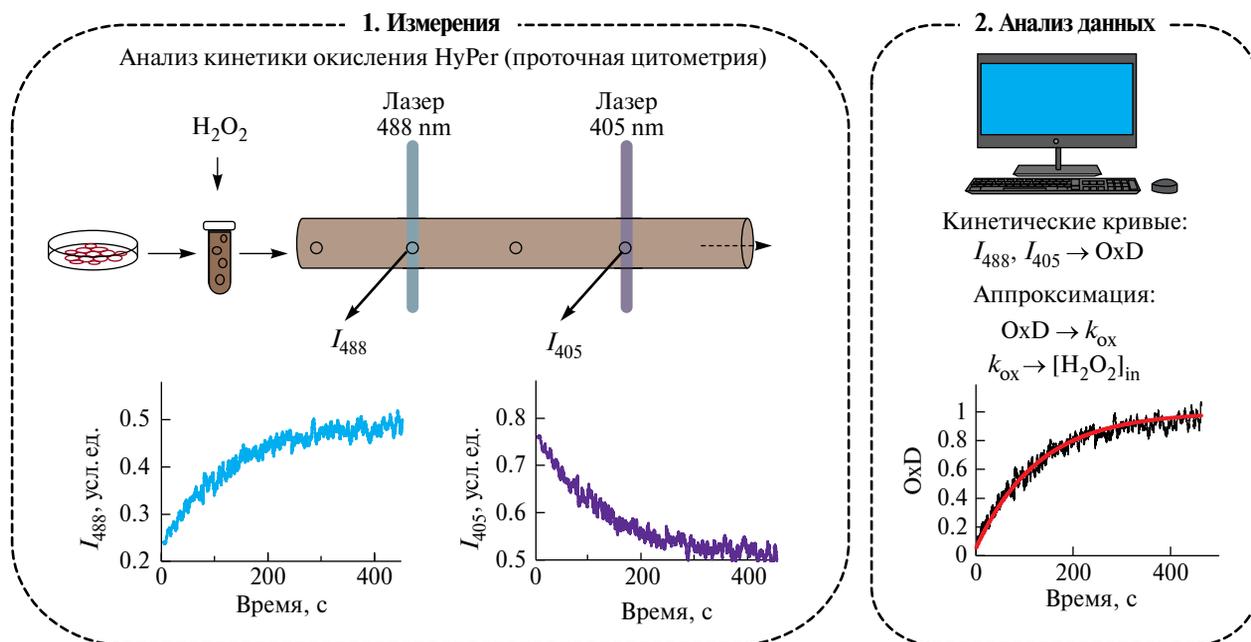


Рис. 2. Схема эксперимента по определению внутриклеточной концентрации H_2O_2 ($[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{in}}$) при индукции внешнего окислительного стресса. Левая панель — схема измерений, проточно-цитометрический анализ клеток. Правая панель — обработка экспериментальных данных, пример кинетической кривой (черная) и аппроксимации этой кривой кинетическим уравнением (4) (красная кривая). Обозначения: I_{488} и I_{405} — сигналы флуоресценции Нупер при длинах волн возбуждения 488 и 405 нм соответственно; OxD (oxidation degree) — отношение количества окисленных молекул Нупер к их общему количеству в клетке; k_{ox} — константа скорости реакции второго порядка между Нупер и H_2O_2 , c^{-1} .

Согласно описанным в настоящей работе закономерностям, непосредственно после индукции внешнего окислительного стресса, доля окисленного Нупер в исследуемом клеточном компартменте начинает расти, достигая со временем квазистационарного уровня, благодаря конкуренции процессов окисления и восстановления сенсора. Увеличение доли окисленного сенсора со временем описывается следующими уравнениями:

$$\text{OxD} = \text{OxD}_{\text{ss}} - e^{-(k_{\text{ox}} + k_{\text{rd}}) \times t} \times (\text{OxD}_{\text{ss}} - \text{OxD}_0) \quad (4)$$

$$\text{OxD}_{\text{ss}} = \frac{k_{\text{ox}}}{k_{\text{rd}} + k_{\text{ox}}} \quad (5)$$

В этих уравнениях OxD — это доля окисленного сенсора в момент времени t , OxD_{ss} — устанавливающийся со временем квазистационарный уровень окисления сенсора, OxD_0 — доля сенсора в начальный момент времени, а k_{ox} и k_{rd} — это константы псевдопервого порядка окисления и восстановления сенсора соответственно. Величина k_{rd} зависит от активности ферментативных систем тиол-дисульфидного обмена, восстанавливающих сенсор. Величина k_{ox} зависит от уровня H_2O_2 внутри клетки и определяется следующим образом:

$$k_{\text{ox}} = k_{\text{Нупер} + \text{H}_2\text{O}_2} \times [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{in}}, \quad (6)$$

где $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{in}}$ — это внутриклеточная концентрация H_2O_2 , усредненная по сайтам локализации сенсора, а $k_{\text{Нупер} + \text{H}_2\text{O}_2} = 5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{c}^{-1}$ это константа реакции между Нупер и H_2O_2 (известна из: Bilan et al., 2013).

Двухпараметрическая нелинейная аппроксимация кинетических кривых уравнениями (4) и (5) с использованием метода наименьших квадратов позволяет определить k_{ox} и k_{rd} , а уравнение (6) используется для вычисления внутрикомпаратментного содержания H_2O_2 .

Описанный протокол был апробирован с использованием клеток К-562, экспрессирующих цитоплазматический вариант Нупер (Lyublinskaya, Antunes, 2019; Zenin et al., 2022). Были определены цитоплазматические концентрации H_2O_2 , установившиеся при добавлении разных концентраций экзогенной H_2O_2 в клеточную среду. Вычисленные концентрации H_2O_2 позволили определить градиенты H_2O_2 , которые оказались разными для разных окислительных нагрузок на клетки. При низких концентрациях экзогенной H_2O_2 ($< 10 \text{ мкМ}$) градиент был близок к 10^3 , но быстро уменьшался с увеличением окислительной нагрузки. При высоких внеклеточных концентрациях H_2O_2 (10–100 мкМ), которые вызывали полное окисление Нупер, градиент стабилизировался и оказался равным 440 раз. На основе проведенных измерений был определен цитотоксический порог внутриклеточных

концентраций H_2O_2 . Цитоплазматическая концентрация H_2O_2 , приводящая к гибели 50 % клеток K-562 через 1 сут после индукции стресса (показатель LD50), оказалась равной 45 нМ (Zenin et al., 2022), что в целом хорошо согласуется с результатами, полученными в лаборатории Hadley D. Sikes для клеток линии HeLa (Huang et al., 2016).

Основным достоинством описанного выше метода количественного определения H_2O_2 является возможность его рутинного использования в экспериментах с клетками самого разного типа и происхождения, а также возможность работы с компартиментализованными вариантами HuPer. Для каждого типа клеток и каждого варианта сенсора можно один раз проградуировать HuPer с использованием экзогенной H_2O_2 , а затем использовать эту градуировку для измерения внутрикомпарментного содержания H_2O_2 в других экспериментах, посвященных реакции клеток на внешний окислительный стресс. Метод детекции флуоресценции биосенсора может быть разным: с помощью планшетного флуориметра или проточной цитометрии. При применении проточной цитометрии появляется возможность анализировать отдельные клеточные субпопуляции в составе одной популяции клеток, однако недостатком этого метода является необходимость перевода клеточной культуры в суспензию, что может влиять на клеточное микроокружение и физиологический контекст в случае адгезивных культур.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ HuPer ДЛЯ ОЦЕНКИ БАЗАЛЬНОГО УРОВНЯ H_2O_2 В КЛЕТКАХ

Помимо оценок внутриклеточного содержания H_2O_2 в условиях окислительного стресса, в работе (Lyublinskaya, Antunes, 2019), HuPer был использован для экспериментального определения базальной внутриклеточной концентрации перекиси водорода в цитоплазме культивируемых клеток. Согласно уравнениям (5) и (6), для определения средней концентрации эндогенной перекиси водорода в выбранном клеточном компартменте необходимо в отсутствие экзогенного пероксида измерить уровень базального окисления HuPer, локализованного в этом компартменте (OxD_{ss_basal}), и базальную константу реакции восстановления сенсора (k_{rd_basal}). OxD_{ss_basal} в экспериментальных образцах клеток вычисляется с использованием уравнения (1), основываясь на измерениях, проведенных с использованием планшетного флуориметра или проточного цитометра. Для определения k_{rd_basal} необходимо провести серию кинетических экспериментов с добавлением в кле-

точную среду экзогенного пероксида. Полученные в этих опытах кинетические кривые аппроксимируются уравнением (4) для определения k_{rd} , после чего путем экстраполяции зависимости k_{rd} от внеклеточной концентрации H_2O_2 определяются значения k_{rd_basal} (k_{rd} при $[H_2O_2]_{ex} = 0$) (Lyublinskaya, Antunes, 2019). С использованием значений OxD_{ss_basal} и k_{rd_basal} из уравнения (5) определяется k_{ox_basal} , а из уравнения (6) — базальная внутрикомпарментная концентрация $[H_2O_2]_{in_basal}$.

С использованием этого подхода, была определена базальная концентрация H_2O_2 в цитоплазме клеток K-562, ресуспендированных в PBS, которая составила 2 ± 0.5 нМ (Lyublinskaya, Antunes, 2019). Однако в более поздних работах было обнаружено, что в культурах K-562, ресуспендированных в полной ростовой среде, HuPer, локализованный в цитоплазме, оказывается полностью восстановлен (Zenin et al., 2022). Согласно уравнению (5), подобная картина может наблюдаться только при выполнении условия $k_{ox_basal} \ll k_{rd_basal}$. По-видимому, выполнение этого условия в клетках, ресуспендированных в полной среде, обусловлено эффективной работой дисульфидредуктаз, восстанавливающих биосенсор. Аналогичная картина наблюдалась и в клетках других клеточных линий (Zenin et al., 2022), что свидетельствует о невозможности использовать HuPer для количественного определения среднего базального уровня H_2O_2 в клеточной цитоплазме в условиях физиологической нормы с использованием описанного выше метода.

Таким образом, проведенные эксперименты (Lyublinskaya, Antunes, 2019; Zenin et al., 2022) показали, что полноценный состав питательной среды важен для поддержания нормального редокс-метаболизма клетки, обеспечивающего полное восстановление редокс-активных тиольных групп HuPer в условиях физиологической нормы. Напротив, ресуспендирование клеток в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) приводит к обеднению питательными веществами и способствует нарушению редокс-гомеостаза в клеточной цитоплазме, приводя к окислению HuPer. Несмотря на это, измерения, проведенные с использованием клеток K-562, ресуспендированных в PBS (Lyublinskaya, Antunes, 2019), заслуживают внимания, так как позволили впервые экспериментально определить концентрационный диапазон для эндогенной H_2O_2 в клеточной цитоплазме. Согласно проведенной оценке, усредненная по времени и объему цитоплазматическая концентрация H_2O_2 измеряется в нМ (нмоль/л), что хорошо согласуется с существующими теоретическими представлениями на этот счет (Sies 2021).

СПЕКТР ЗАДАЧ, РЕШАЕМЫХ ПУТЕМ ПРОВЕДЕНИЯ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ОЦЕНОК УРОВНЯ H_2O_2 В НУРЕР-ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ КЛЕТКАХ

Несмотря на ряд ограничений описанных выше методов количественного определения внутриклеточного содержания H_2O_2 (главное из которых — затруднения, возникающие при определении с помощью Нурер базальной концентрации пероксида), эти методы могут использоваться для решения широкого ряда задач клеточной редокс-биологии.

Во-первых, измеряемый с помощью Нурер уровень H_2O_2 , устанавливающийся в клеточных компартментах в условиях внешнего H_2O_2 -индуцированного стресса, можно рассматривать как характеристику систем антиоксидантной защиты клеток. Соответственно, проводя подобные измерения, можно отслеживать, как меняется эффективность этих систем при изменении физиологического контекста — в процессе клеточного старения, дифференцировки, репрограммирования. Так, в работе Зенина с коллегами (Zenin et al., 2022) было проанализировано изменение антиоксидантной активности в цитоплазме клеток человека в ходе репрограммирования и последующей дифференцировки. Чтобы иметь возможность сравнивать между собой изогенные линии клеток разного фенотипа, авторы работы получили индуцированные плюрипотентные клетки человека (иПСК), используя в качестве родительских культур мезенхимные стволовые клетки (МСК), экспрессирующие Нурер, после чего методом спонтанной дифференцировки получили дифференцированные потомки иПСК, близкие по фенотипу к исходным культурам МСК (иПСК-МСК). Для полученных клеточных линий были измерены цитоплазматические концентрации H_2O_2 , устанавливающиеся при различных окислительных нагрузках на клетки. Проведенные эксперименты показали, что при репрограммировании МСК эффективность антиоксидантной защиты увеличивается, в то время как дифференцировка иПСК не приводит к заметному изменению антиоксидантной активности в клеточной цитоплазме (Zenin et al., 2022). В целом, культуры иПСК и иПСК-МСК характеризовались самой мощной системой антиоксидантной защиты из всех проанализированных в данной работе клеточных линий (МСК, иПСК, иПСК-МСК, HeLa, K-562) (Zenin et al., 2022). На основе полученных результатов была сформулирована гипотеза о высокоэффективной системе антиоксидантной защиты клеток, характерной для этапа эмбрионального развития.

Во-вторых, работая с клетками пациентов, можно исследовать влияние различных патологий на активность антиоксидантной защиты клеток. Так, в настоящее время в научной литературе обсуждается целый набор противоопухолевых стратегий, основанных на разной чувствительности нормальных и трансформированных клеток к окислительному стрессу (Sporn, Liby, 2012; Milkovic et al., 2017), однако четкого представления об особенностях редокс-метаболизма малигнизированных клеток нет. Для решения этой проблемы можно выделить различные популяции клеток из опухолевых и нормальных тканей человека, трансдуцировать их Нурер, и, используя методы, описанные в данном обзоре, сравнить эффективность антиоксидантной защиты клеток малигнизированного и нормального фенотипа.

В-третьих, важнейшее направление исследований, которое можно реализовать с использованием описанных в обзоре количественных методов — это идентификация ферментативных путей, контролирующих редокс-метаболизм клеток разного типа, а также разных клеточных компартментов в условиях окислительной нагрузки. Например, сочетание метода определения внутриклеточной концентрации H_2O_2 , основанного на анализе кинетики окисления Нурер, с ингибиторным анализом и (или) генетическими манипуляциями, позволяющими подавлять активность конкретных ферментативных путей, дает возможность разобраться, при каких интенсивностях внешнего окислительного стресса какие из многочисленных клеточных пероксидаз критически важны, а какие выполняют регулируемую или резервирующую функцию в клетках разного типа. Так, в работе Ивановой с соавторами (Ivanova et al., 2023) был проанализирован вклад тиоредоксин-зависимых пероксидаз (пероксиредоксинов) в систему антиоксидантной защиты иПСК и их дифференцированных клеток-потомков мезенхимного типа (иПСК-МСК). С использованием ингибиторного анализа было показано, что тиоредоксин-зависимые пероксидазы оказывают влияние на антиоксидантную активность в цитоплазме как иПСК, так и иПСК-МСК исключительно в условиях легкой окислительной нагрузки, но не играют существенной роли в условиях интенсивного окислительного стресса. Полученные результаты свидетельствуют об универсальном характере редокс-метаболизма стволовых и дифференцированных клеток в условиях окислительного стресса и подчеркивают значение пероксиредоксинов как основных источников элиминации H_2O_2 в клеточной цитоплазме в условиях слабых окислительных возмущений.

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 четырёх глав обзора; в рамках проекта № 23-74-01142 — для заключительных трёх 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