
На правах рукописи

Богданова Юлия Антоновна

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

Специальность 1.5.3. – Молекулярная биология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2021

Работа выполнена в отделе метаболизма и редокс-биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Научный руководитель:

Белоусов Всеволод Вадимович, доктор биологических наук, профессор РАН заведующий отделом метаболизма и редокс-биологии ИБХ РАН

Официальные оппоненты:

1. Плотников Егор Юрьевич, доктор биологических наук, профессор РАН, заведующий лабораторией структуры и функцией митохондрий Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, отдел функциональной биохимии биополимеров

2. Иванов Александр Владимирович, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией биохимии вирусных инфекций Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, отдел клеточной биологии

Защита состоится «02» марта 2022 года в 11:00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, а также на сайте института www.ibch.ru.

Автореферат разослан «_» _

20 г

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук
В.А. Олейников



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

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). 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 DAAO 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.

С помощью DAAO 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 H₂O₂. Возможность локализовать DAAO в определенных органеллах не раз использовалась для изучения взаимодействия пулов редокс-активных соединений. Однако авторы данной работы видели огромное поле для применения DAAO в живых системах для решения различных вопросов редокс-

биологии.

Цель работы: расширить область применения хемогенетических генераторов H₂O₂.

В рамках данной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Определить вклад антиоксидантных систем на ограничение диффузии H₂O₂ 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, 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 HuPer 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.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Исследования проведены с помощью современных методов и подходов: различных подходов молекулярно-биологического конструирования, культивирования как иммортализованных клеточных линий, так и выделения и поддержания первичных клеток в культуре, широкопольной флуоресцентной микроскопии, конфокальной флуоресцентной микроскопии. Эксперименты выполнены в количестве, достаточном для получения статистически достоверных результатов. Результаты исследований были обработаны стандартными методами вариационной статистики в соответствии с числом сравниваемых параметров и нормальным либо ненормальным распределением. Научные положения, выводы и практические предложения построены на основе достоверных результатов исследований, подтвержденных первичной документацией, и согласуются с поставленными целью и задачами работы. Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне. Практические предложения аргументированы. Материал, представленный в работе, согласуется с независимыми данными, опубликованными по тематике, близкой к диссертационной.

Структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 151 страницах и состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 346 ссылок. Диссертация содержит 19 рисунков и 1 таблицу.

Апробация работы

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1 Литературный обзор

Обзор литературы представлен в первой главе и состоит из четырех разделов. Первый раздел посвящен биологии АФК, описывает их типы, источники в клетке и антиоксидантные системы, отвечающие за их разрушение. Во втором разделе описаны свойства пероксида водорода как сигнальной молекулы. В третьем разделе перечислены существующие инструменты для генерации АФК, а в четвертом – инструменты для их детекции.

2 Экспериментальная часть

2.1 Оптимизация хемогенетического генератора H_2O_2 для использования в различных живых системах

2.1.1 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. 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.

2.1.2 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. *In vitro* фермент наиболее активен относительно неполярных, менее активен в случае полярных и положительно заряженных аминокислот. В случае

экспрессии ДААО в эукариотических клетках важным фактором успешности определенной D-аминокислоты в качестве субстрата ДААО 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 HyPer-ДААО. В качестве возможных субстратов ДААО 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.

Мы не наблюдали значительной продукции пероксида водорода в ответ на добавление в среду для имаджинга 4 мМ D-аргинина (рисунок 1 А). Ответ сенсора на добавление 4 мМ D-лизина во многом вызван внутриклеточным изменением рН (рисунок 1 В, Г). Также значительное изменение рН наблюдалось при использовании 4 мМ D-треонина (рисунок 1 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 1 З).

Позже мы протестировали две непротеиногенные неполярные аминокислоты D-норлейцин (D-Nle) и D-норвалин (D-Nva). 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.

D-норлейцин в концентрации 4 мМ в среде вызывал сходный с 4 мМ D-аланина уровень окисленности HyPer7 (рисунок 1 Ж).

Уже 0,2 мМ концентрация D-норвалина в среде вызывала практически полное окисление HyPer7, сравнимое с 4 мМ концентрацией D-аланина (рисунок 2 А). D-норвалин не имел выраженного эффекта на внутриклеточный рН при добавлении его в среду к HeLa Kyoto, экспрессирующим генетически-кодированный сенсор рН SynHer2 (рисунок 2 В), а также не вызывал синтеза пероксида водорода в клетках, не экспрессирующих RgДААО (рисунок 2 Г). Использование D-норвалина позволяет создавать в цитоплазме клеток большой диапазон концентраций H₂O₂ (рисунок 2 Б), поэтому может использоваться для моделирования как физиологических, так и патологических процессов

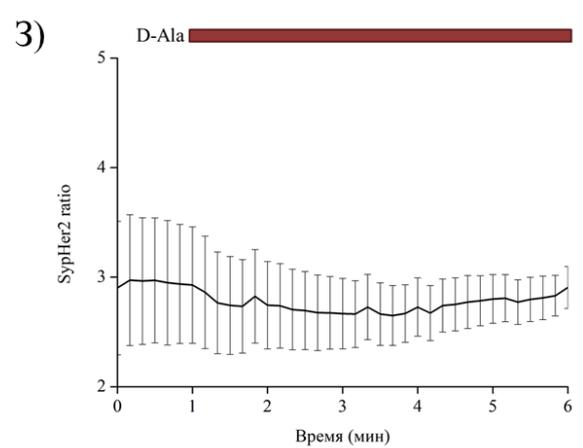
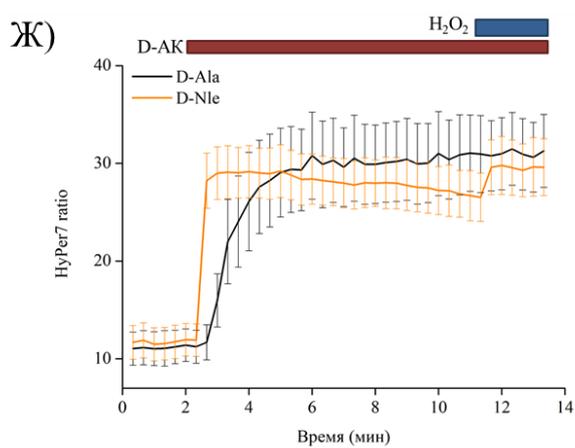
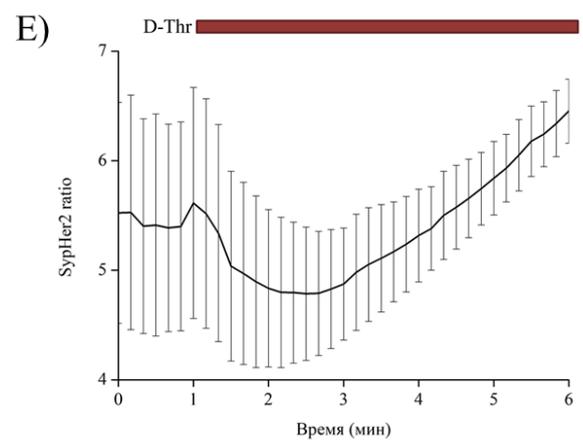
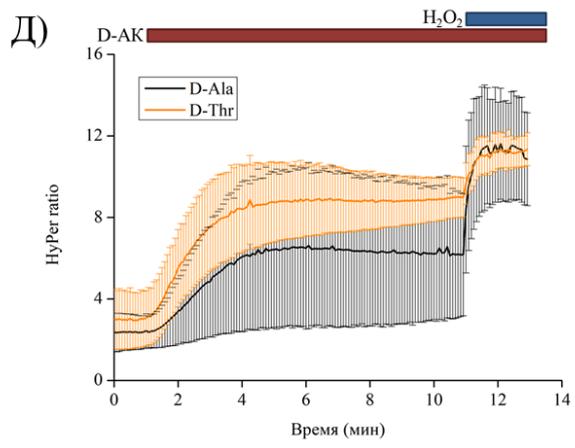
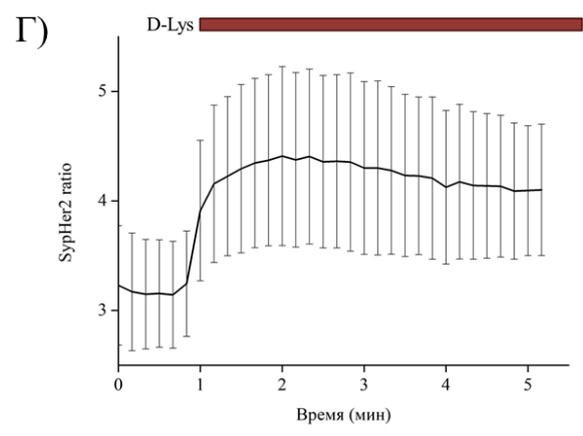
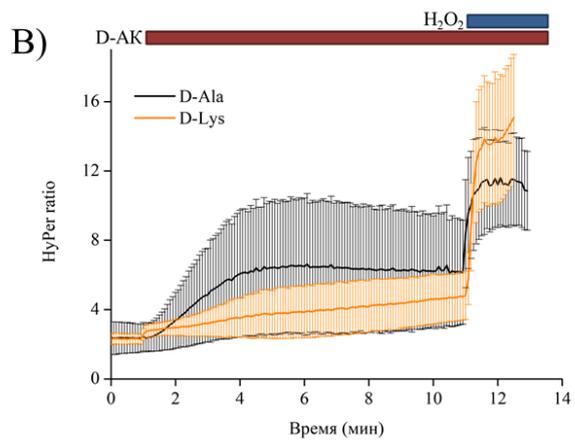
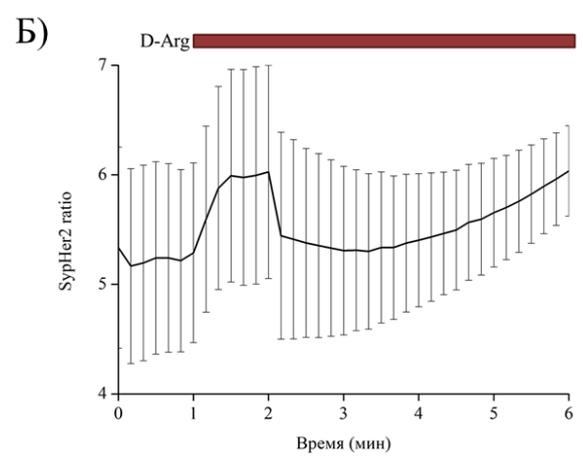
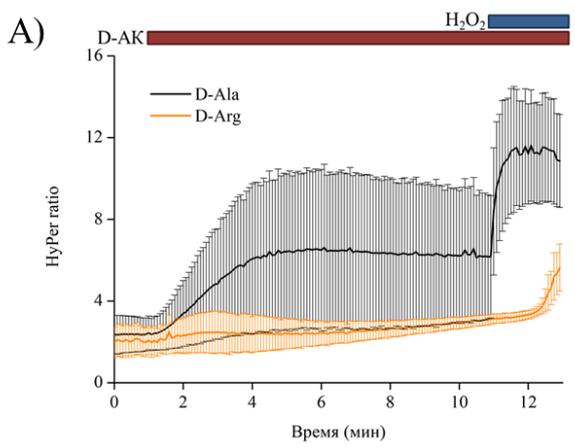


Рисунок 1 – графики изменения рациометрического ответа HyPer-DAAO и SypHer2, проэкспрессированного в цитоплазме Hela Kyoto, при создании в среде для имаджинга 4 мМ концентраций D-аргинина (А и Б), D-лизина (В и Г) и D-треонина (Д и Е). Также приведен

график изменения рациометрического ответа HyPer7 при его ко-экспрессии с DAAO в *Hela Kyoto* в ответ на создание в среде 4 мМ концентрации D-норлейцина (Ж). График изменения рациометрического ответа SypHer2 на 4 мМ концентрацию D-аланина (З)

При ко-экспрессии DAAO и HyPer 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 2 Д).

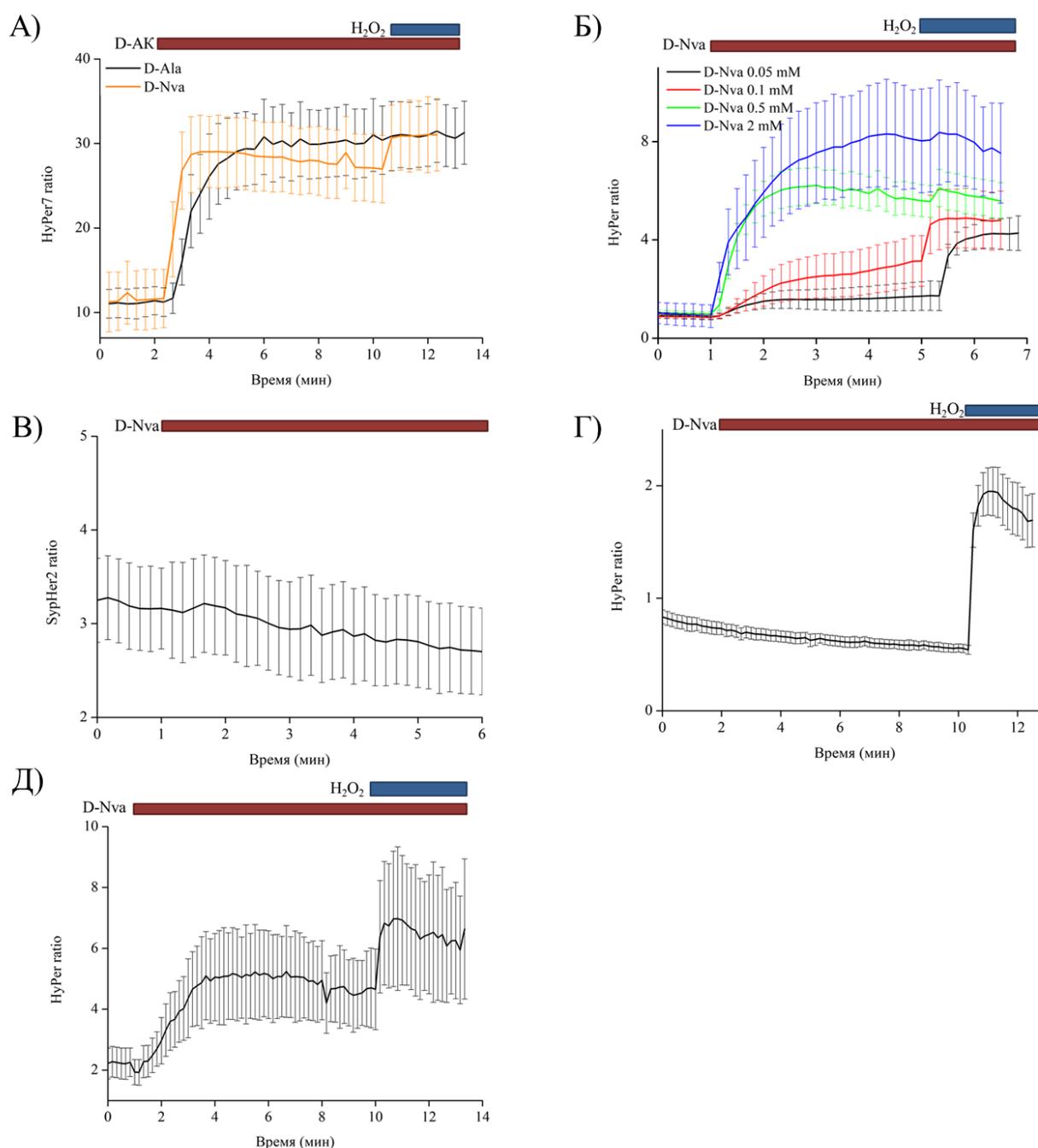


Рисунок 2 – График изменения рациометрического ответа HyPer7 при его ко-экспрессии с DAAO в *Hela Kyoto* при создании в среде 0,2 мМ концентрации D-норвалина и

сравнение его с графиком ответа HyPer7 на 4 мМ D-аланин (А). Графики ратиометрического ответа фьюза HyPer-DAAO на различные концентрации D-норвалина в среде (Б). Графики ратиометрического ответа SupHer2 и HyPer на 2 мМ концентрацию D-Nva (В и Г). График ратиометрического ответа HyPer-mito при его ко-экспрессии с DAAO-mito на 8 мМ D-Nva (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. 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.

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-оксовалериановой кислоты, образующейся из D-норвалина, на жизнеспособность клеток линии HeLa Kyoto. При помощи проточной цитометрии было показано, что 2-оксовалериановая кислота не оказывает значительного влияния на жизнеспособность культуры HeLa Kyoto в концентрации 1 мМ при инкубации в течение 24 часов.

2.2 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. На данный момент не существует единого мнения о роли различных антиоксидантных систем в поддержании градиента пероксида водорода.

2.2.1 Создание локализованных в ядре и в цитозоле генераторов H_2O_2

Для решения поставленной задачи мы создали конструкторы 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 конструктор 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 3 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 3 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.

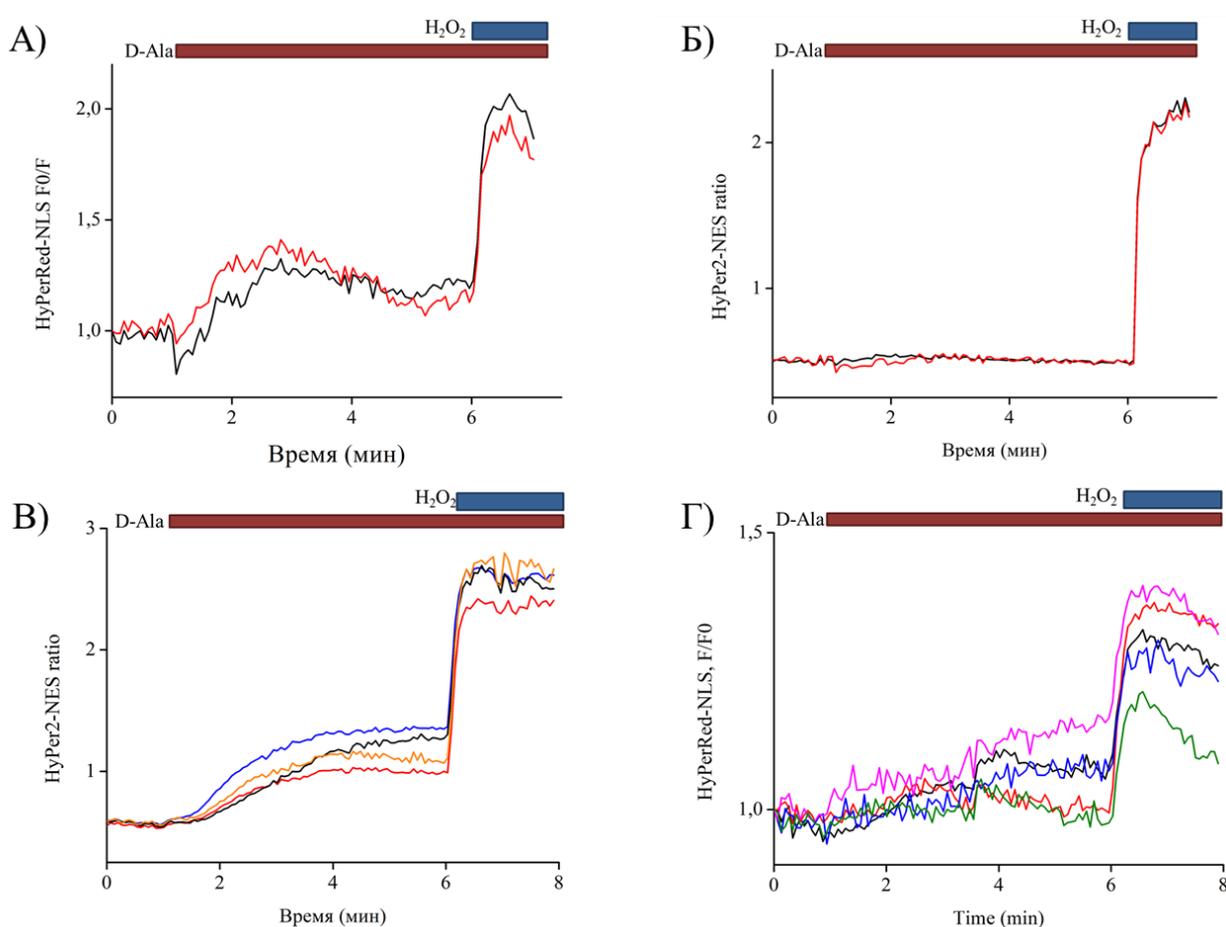


Рисунок 3 – Изменения интенсивности флуоресцентного сигнала HyPerRed-NLS при добавлении к клеткам 0,25 мМ D-аланина. Происходит нарастание сигнала из-за образующегося в ядре пероксида водорода как продукта реакции DAAO-NLS (А) Изменения рациометрического сигнала HyPer2-NES при добавлении к клеткам 0,25 мМ D-аланина практически не происходит из-за ограничения диффузии пероксида водорода при его генерации в ядре DAAO-NLS (Б). Изменения рациометрического 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.

2.2.2 Локализованная в ядре DAAO позволяет визуализировать ограничение диффузии H₂O₂

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 H₂O₂ 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 4 А, Б). При добавлении D-аланина мы наблюдали возрастание сигнала HyPerRed в ядре. Окисление HyPerRed при добавлении 4 мМ D-аланина оказывалось неполным (рисунок 4 Г), из чего следует, что, согласно измеренным характеристикам HyPerRed, концентрация продуцировавшегося H₂O₂ в ядре была менее 200 нМ. Немедленно после добавления D-аланина образующийся пероксид водорода диффундировал в цитоплазму и матрикс ближайших к ядру митохондрий, вследствие чего мы наблюдали окисление HyPer3 (рисунок 4 В, Г). При этом HyPer3 в матриксе митохондрий на периферии клетки оставался восстановленным. Добавление в среду внешнего H₂O₂ 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.

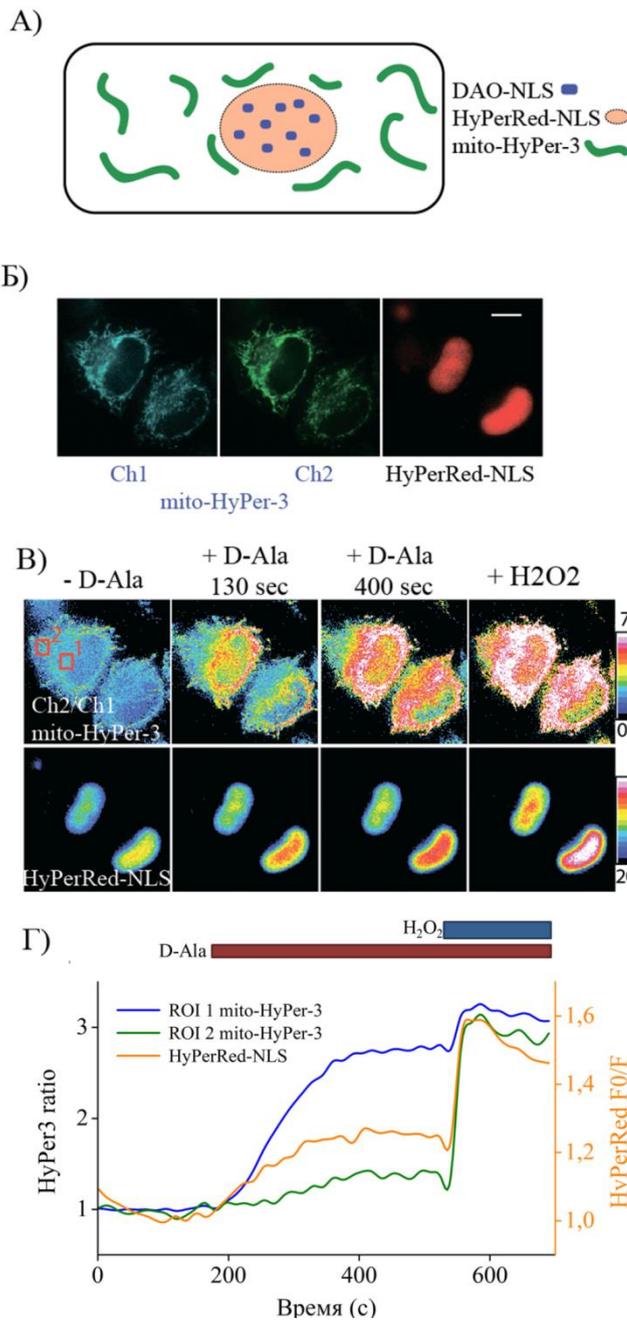


Рисунок 4 – Схема системы, состоящей из хемогенетического генератора пероксида водорода DAAO-NLS, в присутствии D-аланина проводящего реакцию с образованием H₂O₂ в ядре клетки. HyPerRed-NLS также локализуется в ядре и позволяет измерять локальное образование H₂O₂, mito-HyPer3 локализуется в матриксе митохондрий и детектирует тот H₂O₂, 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 ратиометрические изображения клеток из панели (Б) для mito-HyPer3, в нижнем – HyPerRed-NLS. После добавления D-аланина H₂O₂ образуется в ядре, происходит увеличение интенсивности флуоресценции HyPerRed-NLS. H₂O₂, покидая ядро, образует градиент, видимый при изменении ратиометрического 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 H₂O₂ в ROI1, ROI2 и в ядре клетки, приведенной выше (Г)

Для доказательства того, что градиент пероксида водорода формируется именно на уровне цитозоля, мы создали фьюз НуPer с кератином, белком промежуточного цитоскелета, который формирует относительно устойчивую сеть внутриклеточных микрофиламентов (рисунок 5 А). Это позволило предотвратить быструю диффузию НуPer внутри цитозоля. Добавление D-аланина к клеткам, экспрессирующим DAAO-NLS и кератин-НуPer, вело к формированию картины распределения интенсивности флуоресценции НуPer, сходной с наблюдаемой при использовании НуPer3, локализованного в матриксе митохондрий. НуPer, связанный с перинуклеарными филаментами, демонстрировал шарообразную картину окисления вокруг ядра, сенсор на периферии клетки оставался восстановленным (рисунок 5 Б, 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.

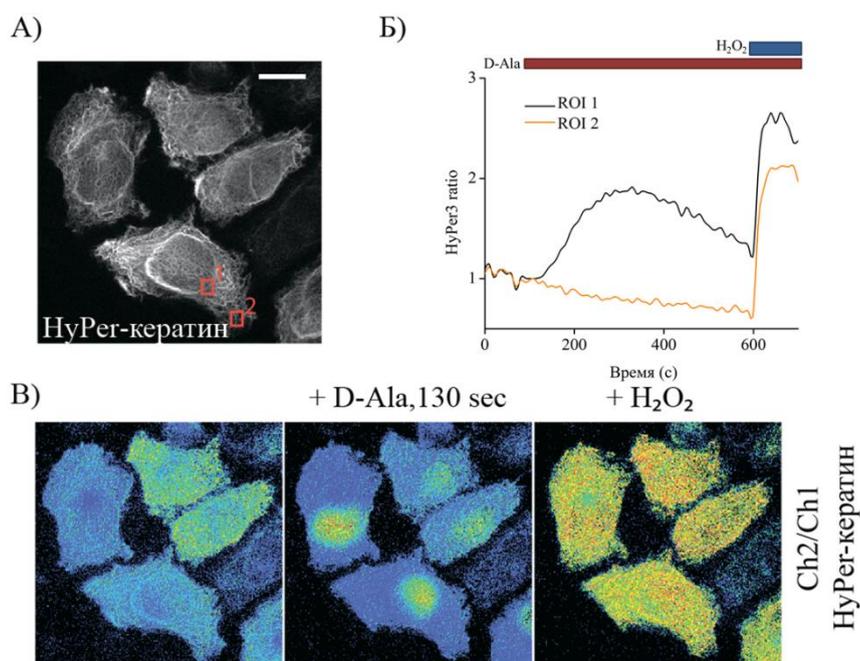


Рисунок 5 – Полученные при Ex 470/40 нм и Em 525/50 нм флуоресцентные изображения клеток HeLa Kyoto, экспрессирующих DAO-NLS и НуPer-кератин. Красными прямоугольниками указаны ROI1 в перинуклеарной области и ROI2 на периферии клетки (А). Динамика изменения H_2O_2 в ROI1 и ROI2 при активации DAAO-NLS (Б). Рациометрические изображения клеток (А) до и после добавления в среду D-аланина и после полного окисления сенсора добавленным внешне пероксидом водорода (В)

2.2.3 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 HyPer3 в митохондриях в перинуклеарной области в сравнении с периферическими зонами. Таким образом, градиент пероксида водорода может быть проанализирован при помощи построения профиля сигнала HyPer3 вдоль клетки (рисунок 6 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 радиометрическому значению HyPer3 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 HyPer3 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 6 Б). При инкубации клеток с 3-AT, 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 6 Б). В этом случае добавление D-аланина приводит к быстрому окислению всего митохондриального HyPer3 по всему объему клетки (рисунок 6 А, В). Добавление внешнего пероксида водорода не вело к увеличению сигнала HyPer3, 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 HyPer3 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 6 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

матрикса 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 6 Б). Таким образом, мы можем предположить, что обе формы тиоредоксинредуктазы участвуют в ограничении диффузии H_2O_2 в данной системе.

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, паразитами (малярия), воспалительными процессами, нейродегенеративными заболеваниями.

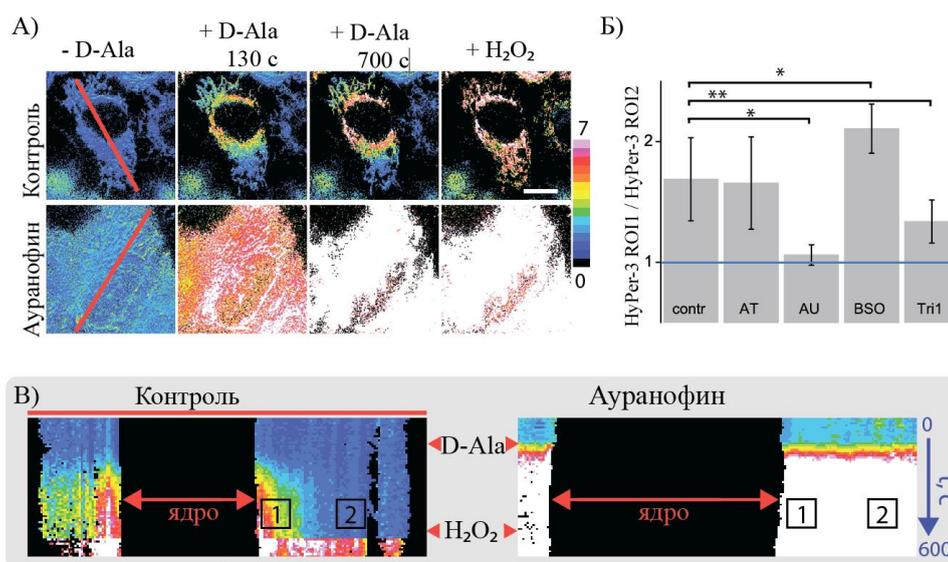


Рисунок 6 – Рациометрические изображения клеток, экспрессирующих *mito-HyPer3* и *DAAO-NLS*. Верхний ряд соответствует изменению рациометрического сигнала *mito-HyPer3* при добавлении *D*-аланина к клеткам в контрольном эксперименте (инкубированным с *DMSO*), нижний – клеткам, обработанным ауранофином. Ауранофин вызывает исчезновение градиента пероксида водорода (А). Влияние различных ингибиторов антиоксидантных систем на градиент H_2O_2 . Градиент определяли количественно как отношение рациометрического 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

2.3 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. 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.

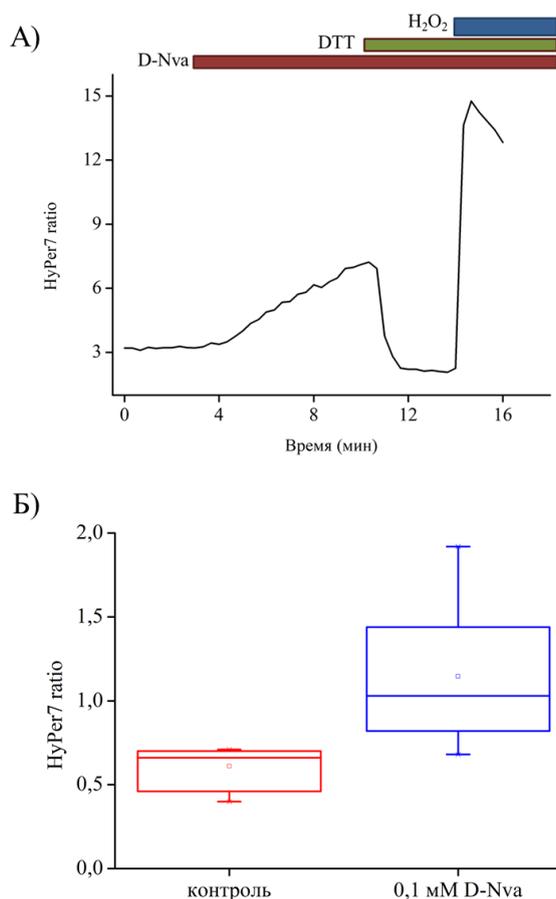
2.3.1 С помощью DAAO можно успешно изменять редокс-статус клеток линии PC-12

Первичные тесты мы провели, используя клетки линии PC-12. При культивировании в присутствии NGF происходит дифференцировка PC-12 в нейроны симпатических ганглиев. Удобство и легкость поддержания культуры клеток PC-12 делает их идеальными объектами для тестирования хемотропических инструментов перед их использованием в первичных нейрональных культурах.

Мы создали не локализованный фьюз HyPer7-DAAO. Цитоплазма нейронов подвержена колебаниям pH в диапазоне чувствительности флуоресцентного ядра HyPer версий 1-3, 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 PC-12. В данной системе добавление в среду для имаджинга D-норвалина вызывало увеличение радиометрического сигнала HyPer7 (рисунок 7 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 PC-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. PC-12, инкубировавшиеся с D-норвалином, имели более высокий уровень окисленности цитоплазмы (рисунок 7 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 7 – График изменения ратиометрического сигнала сенсора HyPer7 при экспрессии фьюза HyPer7-DAAO в клетках PC-12. При их обработке 0,5 mM D-норвалина сенсор окисляется из-за активации DAAO, 10 mM DTT восстанавливает сенсор до минимальных ратиометрических значений, а 200 нM 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 mM D-норвалином, в качестве контроля использовали клетки без добавки D-аминокислоты (Б)

2.3.2 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.

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 8 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 mM, что привело к резкому снижению ратиометрического сигнала (рисунок 8 Б). После восстановления с помощью DTT HyPer7 во фьюзе с DAAO оказался способен увеличивать сигнал после добавления как внешнего пероксида водорода (рисунок 8 В), так и D-аминокислот. Таким образом, HyPer7 был полностью функционален во фьюзе и мог как восстанавливаться, так и снова окисляться. HyPer7, проэкспрессированный в нейронах в ко-трансфекции с DAAO также был окислен.

HyPer7, проэкспрессированный в клетках нейрональной культуры без DAAO, был полностью восстановлен и реагировал на внешние добавления

пероксида водорода (рисунок 8 А).

Мы предполагаем, что DAAO в нейронах способна работать на внутреннем субстрате и продуцировать количества пероксида водорода, достаточные для полного окисления HyPer7. При этом экспрессирующие конструкт 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. Длительно время D-серин считался глиальным трансммиттером, считалось, что локализуется он исключительно в астроцитах, которые способны к его выбросу под воздействием глутамата. Позже было показано, что D-серин и серинрацемаза локализуются исключительно в нейронах. D-серин действует как ко-трансммиттер, но не выбрасывается при экзоцитозе синаптических везикул, а выходит из нейронов при активации транспортеров аминокислот. Вероятно, в нейронах D-серин находится в форме, в которой он доступен для DAAO. Это ведет к повышенному уровню окисления HyPer7 и цитоплазмы нейронов, что значительным образом может влиять на их дифференциацию и функционирование. Кроме того

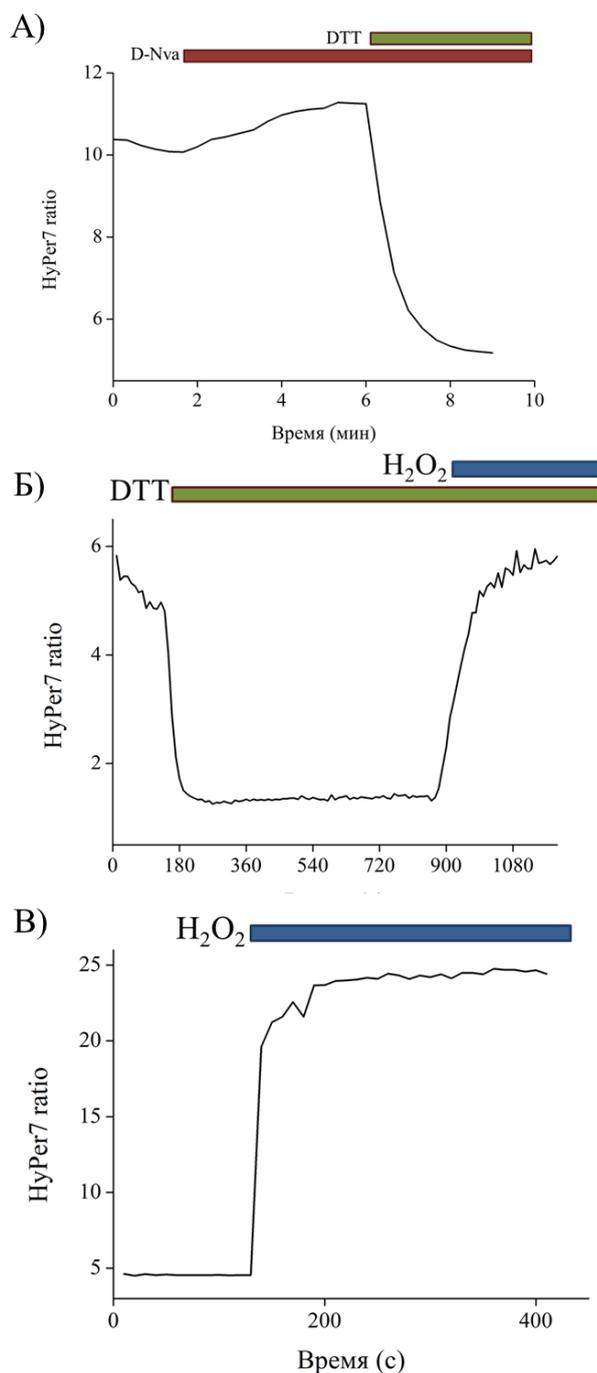


Рисунок 8 – Динамика изменения ратиометрического сигнала HyPer7 при экспрессии фьюза HyPer7-DAAO в клетках первичной нейрональной культуры. Добавление 4 мМ D-Nva вызывает слабое изменение ратиометрического сигнала сенсора, т.к. сенсор изначально окислен, что можно показать добавлением в среду 10 мМ DTT (А). Динамика изменения ратиометрического сигнала HyPer7 при экспрессии фьюза HyPer7-DAAO в клетках первичной нейрональной культуры. Сенсор оказывается изначально значительно окислен, при обработке 10 мМ DTT способен восстанавливаться, а затем окисляться до прежних

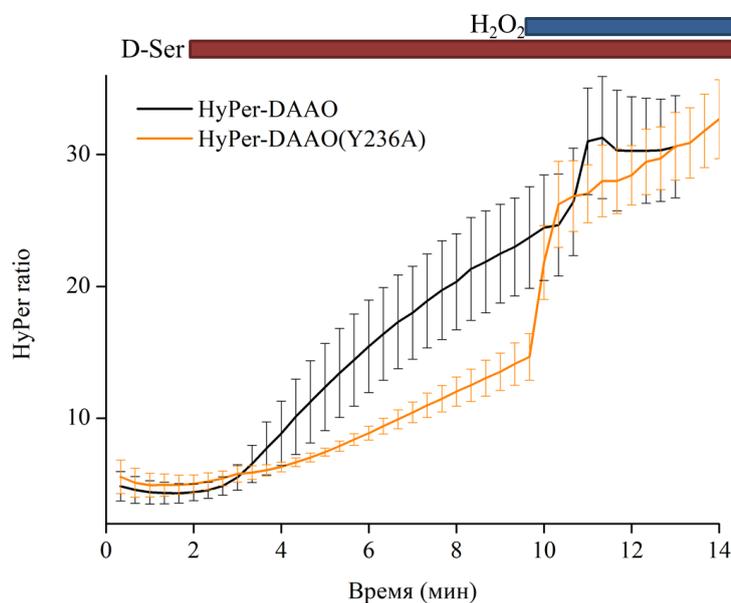
значений добавкой внешнего пероксида (B). Динамика изменения ратиометрического сигнала HyPer7 при экспрессии HyPer7 в клетках первичной нейрональной культуры. Сенсор восстановлен и отвечает на пероксид водорода (B).

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, что говорит в пользу предположения о том, что RgDAAO, проэкспрессированная в цитоплазме нейронов, может вести к нарушению их функционирования.

2.3.3 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 существенно снижения функциональной активности по отношению к D-серину (рисунок 9), вследствие чего дальнейшей работы с ним не продолжалось.

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

Рисунок 9 – Изменение ратиометрического 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

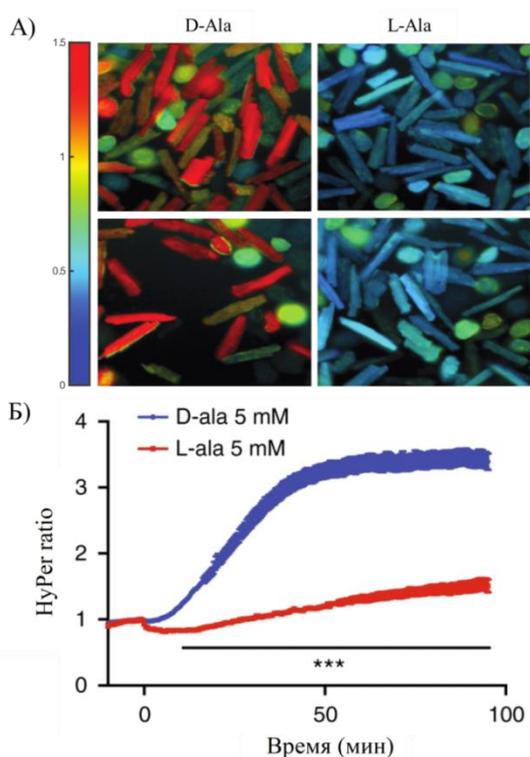
D-серина, что предполагает возможность использования там DAAO в качестве редокс-модулятора. Также решение этой проблемы можно искать с помощью направленного и ненаправленного мутагенеза последовательности фермента с целью снижения его активности относительно D-серина.

2.4 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. Ранее вычленивать 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 Hyper 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 10 А, Б). Ответ на D-аланин был дозозависимым. Для доказательства того, что наблюдаемый ответ не был вызван изменением внутриклеточного рН, кардиомиоциты, дифференцированные из

Рисунок 10 – Рациометрический сигнал Hyper cardiomyocytes, 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 рациометрического сигнала Hyper (Б)

человеческих IPS, трансфецировали плазмидами, несущими вставку SypHer2-DAAO, и подвергали воздействию 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 *Il1b*, *Tnfa*, *Icam1* и *Nos2* (кодирующие интерлейкин 1β, фактор некроза опухолей α, ICAM-1 и индуцибельную NO-синтазу) были повышены (рисунок 11). 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.

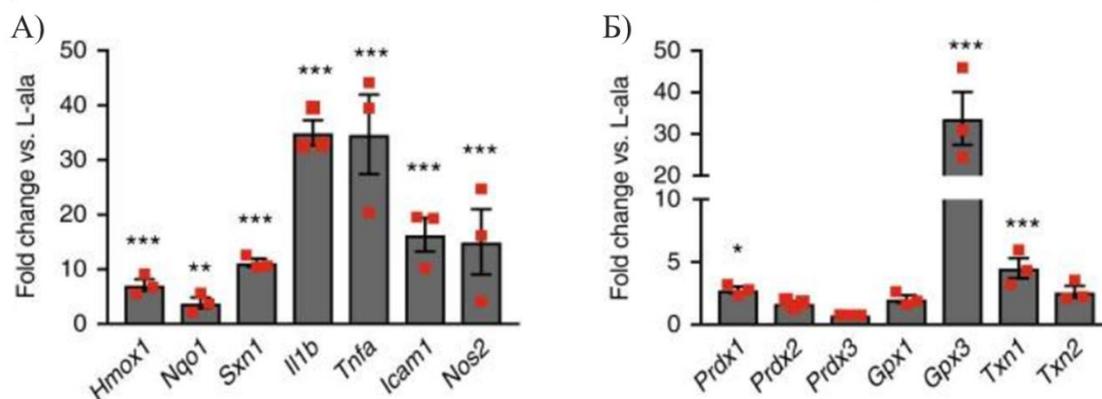


Рисунок 11 – Изменения в экспрессии транскрипционных мишеней фактора Nrf2 *Hmox1*, *Nqo1* и *Sxn1* и мишеней NF-κB *Il1b*, *Tnfa*, *Icam1* и *Nos2* в кардиомиоцитах, выделенных из крыс, экспрессирующих DAAO и обработанных 10 мМ D-аланина или L-аланина в течение 120 минут (А). Изменения в экспрессии редокс-активных белков *Prdx1*, *Prdx2*, *Prdx3*, *Gpx1*, *Gpx3*, *Txn1* и *Txn2* в кардиомиоцитах, выделенных из крыс, экспрессирующих DAAO и обработанных 10 мМ D-аланина или L-аланина в течение 120 минут (Б)

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.

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. Использование ДААО 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.

ВЫВОДЫ

1. D-норвалин может быть использован в качестве альтернативного субстрата для генерации пероксида водорода при помощи ДААО в живых системах. Использование от 50 мкМ до 4 мМ D-норвалина позволяет создать в цитозоле клеткок 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 H₂O₂ с помощью ДААО в матриксе митохондрий.
2. Диффузия пероксида водорода, генерируемого с помощью ДААО при добавлении D-аминокислот, ограничена. Тиоредоксиновая ветвь антиоксидантной защиты играет ключевую роль в ограничении диффузии H₂O₂ в цитозоле клеток. В этом ограничении диффузии пероксида водорода участвуют как тиоредоксиновая система цитозоля, так и матрикса митохондрий.
3. С помощью ДААО возможно изменение редокс-статуса клеток PC-12 на короткие и длительные промежутки времени.
4. Экспрессия ДААО в нейронах первичной гиппокампальной культуры приводит к формированию пероксида водорода без добавления внешних D-аминокислот.
5. Экспрессия ДААО 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*). Хемогенетический генератор ДААО позволяет моделировать патологические процессы в сердцах крыс *in vivo*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

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 H₂O₂ gradients? Antioxid Redox Signal. 2019 Mar 13; 31(9): 664-670 *авторы внесли равный вклад в работу.

Тезисы докладов на конференциях:

Bogdanova YA, Matlashov ME, Belousov VV. Genetically encoded H₂O₂ 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