



ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СЕНСОРЫ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ

© 2015 г. Д. С. Билан*, **, #, С. А. Лукьянов*, **, В. В. Белоусов*, **

* ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

** ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,
603005, Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1

Поступила в редакцию 03.09.2014. Принята к печати 10.10.2014 г.

Окислительно-восстановительные процессы играют ключевую роль в клетках любых организмов. Эти процессы подразумевают направленные потоки электронов, в переносе которых участвуют редокс-пары: соединения, представленные в клетке параллельно в окисленном и восстановленном состояниях, например, $NAD^+/NADH$, $NADP^+/NADPH$, $GSSG/GSH$. До недавнего времени изучение окислительно-восстановительных процессов в живых клетках было затруднено, что было связано с отсутствием подходящих методов. Генетически кодируемые флуоресцентные биосенсоры представляют собой новый инструмент для изучения биологических процессов, в том числе окислительно-восстановительных. Биосенсоры позволяют в режиме реального времени регистрировать мессенджеры, метаболиты и активность ферментов в живых системах различной сложности, от культивируемых клеток до трансгенных животных. В обзоре рассмотрены основные типы известных редокс-биосенсоров и примеры их использования.

Ключевые слова: генетически кодируемые флуоресцентные редокс-биосенсоры, активные формы кислорода, $2GSH/GSSG$, $NAD^+/NADH$.

DOI: 10.7868/S0132342315020037

ВВЕДЕНИЕ

Открытие и клонирование гена зеленого флуоресцентного белка (GFP) [1–4], исходно выделенного из медузы *Aequorea victoria*, и обнаружен-

ные позже GFP-подобные белки из других источников, позволили создать совершенно новые подходы для исследований биологических процессов, как на клеточном, так и на молекулярном уровне. К настоящему времени методами генной инженерии получено большое количество GFP-подобных белков, которые отличаются от белков дикого типа стабильностью, величиной квантового выхода, временем созревания хромофора и спектральными характеристиками [5]. GFP-подобные белки широко применяются для изучения экспрессии генов, взаимодействия и локализации всевозможных молекул в живых клетках.

На основе флуоресцентных белков регулярно создаются генетически кодируемые биосенсоры, позволяющие исследовать протекание различных клеточных реакций и процессов в живых системах. Биосенсоры подобного типа приобретают все большую популярность по сравнению с синтетическими индикаторами. Главное их преимущество заключается в возможности их использования в живых целостных системах — как на клеточном уровне, так и на уровне целого организма. Кроме того, биосенсоры на основе флуоресцентных белков более фотостабильны и менее токсичны для клетки в сравнении со своими синтетическими аналогами.

Сокращения: АФК — активные формы кислорода; $NAD^+/NADH$ — никотинамидадениндинуклеотид окисленный/восстановленный; $NADP^+/NADPH$ — никотинамидадениндинуклеотидфосфат окисленный/восстановленный; $GSH/GSSG$ — глутатион восстановленный/окисленный (глутатиондисульфид); GFP — зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein); roGFP — редокс-активный зеленый флуоресцентный белок (redox green fluorescent protein); EYFP и ECFP — улучшенные желтый и циановый флуоресцентные белки (enhanced yellow/cyan fluorescent protein); cpmTS — круговой пермутант T-Sapphire (circularly permuted T-Sapphire); cpYFP — круговой пермутант желтого флуоресцентного белка YFP (circularly permuted yellow fluorescent protein); rYFP — редокс-активный желтый флуоресцентный белок (redox yellow fluorescent protein); Akt — протеинкиназа B; CRD — цистеинбогатый домен (cysteine-rich domain); EGF — эпидермальный фактор роста (epidermal growth factor); FRET — Фёрстеровский резонансный перенос энергии (Förster resonance energy transfer); Grx — глутаредоксин (glutaredoxin); NGF — фактор роста нервов (nerve growth factor); OxyR-RD — регуляторный домен транскрипционного фактора OxyR; PDGF — тромбоцитарный фактор роста (platelets derived growth factor); PI3K — фосфатидилинозитол-3-киназа; PTP-1B — тирозинфосфатаза 1B; wtOxyR — бактериальный белок OxyR дикого типа.

Автор для связи (тел.: +7 (499) 724-84-66; эл. почта: d.s.bilan@gmail.com).



Рис. 1. Получение кругового пермутанта флуоресцентного белка YFP.

Изучение окислительно-восстановительных процессов в живых системах в режиме реального времени долгое время было затруднено или невозможно вовсе, главным образом, из-за отсутствия подходящих методов. Для регистрации некоторых видов активных форм кислорода (АФК) существуют различные синтетические красители. Применение некоторых из этих красителей возможно лишь в условиях *in vitro*. Красители, способные проникать внутрь клеток, как правило, не являются специфичными, а их реакции необратимы. Кроме того, на сигналы таких индикаторов часто накладываются артефакты, связанные с наличием побочных реакций [6–16]. Полностью отсутствовали методы, позволяющие регистрировать в живых моделях и другие компоненты окислительно-восстановительных процессов, в том числе так называемые активные редокс-пары клетки, такие как NAD^+/NADH , $\text{GSSG}/2\text{GSH}$.

Многие проблемы детекции редокс-активных соединений были решены благодаря созданию генетически кодируемых редокс-биосенсоров на основе флуоресцентных белков. Уже прошло несколько лет с момента создания первых таких индикаторов, за это время они были протестированы на большом количестве биологических моделей разного уровня сложности, от клеток в культуре до трансгенных животных.

БИОСЕНСОР НА ПЕРОКСИД ВОДОРОДА *NuPer*

Генетически кодируемый флуоресцентный редокс-биосенсор *NuPer* позволяет специфично исследовать роль молекулы H_2O_2 в процессах, происходящих в живых клетках и их компартментах [17]. В основе структуры этого биосенсора лежит транскрипционный фактор *E. coli* OxyR. В бактериальной клетке белок OxyR специфично активирует экспрессию ряда генов в ответ даже на небольшое увеличение концентрации H_2O_2 . В присутствии H_2O_2 в регуляторном домене OxyR происходит образование дисульфидной связи между цистеиновыми остатками Cys-199 и Cys-208 [18, 19]. Высокая реакционная способность Cys-199 в отношении H_2O_2 (константа скорости

реакции составляет $10^5\text{--}10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) обусловлена низким значением pK_a его тиоловой группы [20, 21]. Гидрофобное окружение Cys-199 ограничивает доступ заряженных оксидантов к этому остатку, например, супероксид-анион радикала. При взаимодействии с амфифильной молекулой H_2O_2 тиоловая группа Cys-199 окисляется до сульфеновой кислоты, после чего окисленный аминокислотный остаток уходит из своего гидрофобного окружения и сближается с Cys-208 с формированием дисульфидной связи, что приводит к конформационным изменениям всей структуры белка [18].

Для получения биосенсора *NuPer*, регистрирующего H_2O_2 , в регуляторный домен OxyR через короткие пептидные линкеры был внедрен круговой пермутант желтого флуоресцентного белка (cpYFP) (схема cpYFP изображена на рис. 1). Создание пермутированных GFP-подобных белков необходимо для увеличения подвижности хромофорного окружения и, следовательно, для большей лабильности спектральных свойств флуоресцентных белков. В первичную структуру GFP-подобного белка на уровне гена вносится разрыв в область между 144-м и 149-м аминокислотными остатками, нативные N- и C-концы совмещаются при помощи полипептидного линкера. Новые N- и C- концы находятся в непосредственной близости от хромофора и могут влиять на его микроокружение.

В составе химерного белка *NuPer* (OxyR-cpYFP) регуляторный домен OxyR (OxyR-RD) также отвечает за реакцию с H_2O_2 , как и в белке дикого типа wtOxyR. В результате окисления *NuPer* при взаимодействии с H_2O_2 происходят конформационные изменения регуляторного домена OxyR-RD, передающиеся на структуру cpYFP [17] (рис. 2а).

Для *NuPer* характерно наличие двух пиков возбуждения флуоресценции с максимумами при 420 нм и 500 нм, при окислении биосенсора в его спектре возбуждения флуоресценции происходит пропорциональное увеличение интенсивности при 500 нм и уменьшение интенсивности при 420 нм (рис. 2б). Максимум эмиссии флуоресценции фиксируется при 516 нм [17]. Микроскопию клеток, экспрессирующих *NuPer*, осуществляют в двух каналах. Сигнал биосенсора определяют как соотношение интенсивностей флуоресценции, отдельно возбуждаемой при 500 и 420 нм (F500/F420) (рис. 2в, г). Радиометрические показания сигнала *NuPer* (F500/F420) позволяют избежать многих артефактов микроскопии, вызванных движениями объекта или разными уровнями экспрессии биосенсора между клетками и их компартментами.

Сигнал *NuPer* обратим, поскольку, как и в случае окисленного wtOxyR, биосенсор может быть восстановлен тиол-восстанавливающими систе-

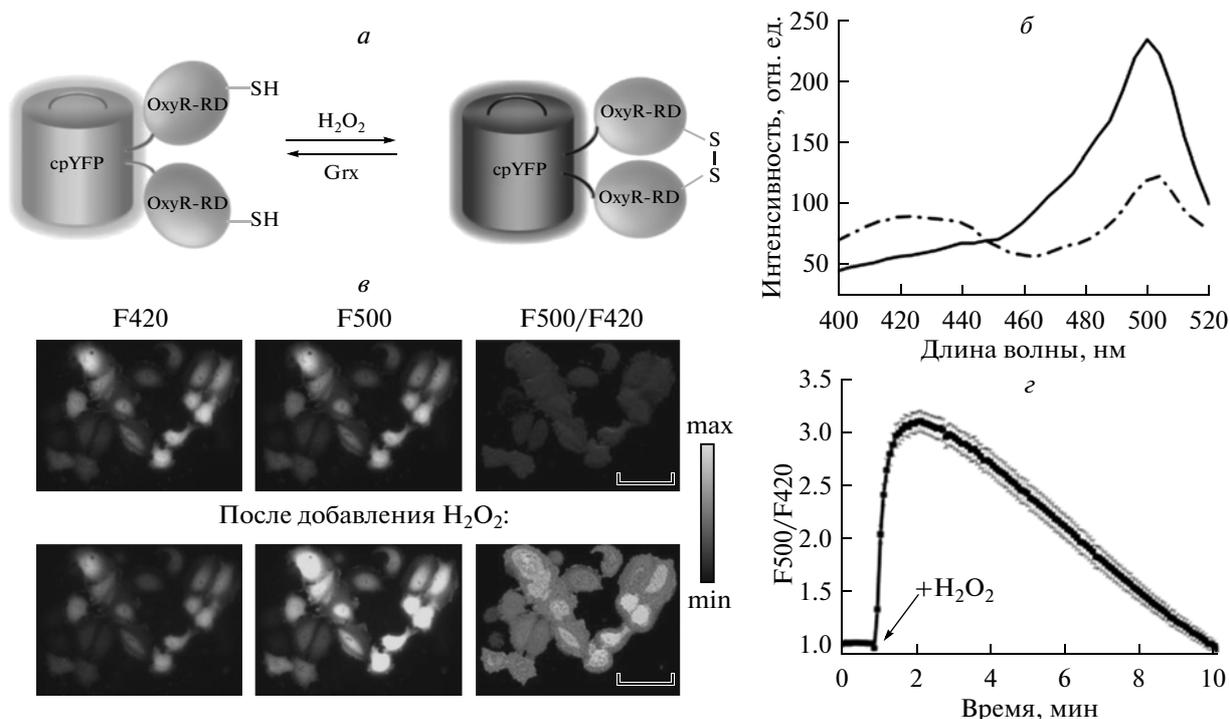


Рис. 2. Генетически кодируемый флуоресцентный биосенсор NuPer. (а) Схема строения NuPer и его обратимая реакция окисления. При взаимодействии NuPer с H₂O₂ происходит формирование дисульфидной связи в регуляторном домене OxyR (OxyR-RD), конформационные изменения которого передаются на флуоресцентный белок cpYFP. Тиол-восстанавливающие системы клетки обратно восстанавливают NuPer. (б) Спектр возбуждения флуоресценции полностью восстановленного NuPer (штрихпунктирная линия) и полностью окисленного NuPer (сплошная линия). Для спектра характерно наличие двух пиков с максимумами при 420 и 500 нм, изменяющихся ратиометрически. (в) Клетки линии HeLa Kyoto, экспрессирующие NuPer, до добавления (верхний ряд) и спустя 1 мин после добавления H₂O₂ до конечной концентрации 100 мкМ (нижний ряд). Флуоресценцию клеток регистрируют в двух каналах F420 и F500, соответствующих двум пикам возбуждения биосенсора. Сигнал NuPer определяют как соотношение изображений двух каналов F420/F500. Шкала 40 мкм. (г) Графическое изображение динамики изменения сигнала NuPer (F420/F500) в клетках линии HeLa Kyoto в течение времени.

мами клетки. Высокая чувствительность к H₂O₂, сравнимая с таковой для wtOxyR [17], быстрая скорость реакции (константа 10⁵ M⁻¹ с⁻¹) [22] и обратимость [17] делают NuPer бесценным инструментом в наблюдениях за динамикой H₂O₂ в живых системах в реальном времени. Благодаря бактериальной природе регуляторного домена OxyR биосенсор NuPer не имеет природных партнеров в эукариотической клетке, поэтому он менее подвержен возможным посттрансляционным модификациям и не токсичен при оверэкспрессии. Еще одно преимущество NuPer заключается в том, что его легко можно локализовать в специфических компартаментах клетки, например в ядре, митохондриях, пероксисомах и других [23]. Кроме того, NuPer можно сшивать с другими белками, что позволяет достичь разрешения на уровне субкомпарментов [24]. Тем не менее, существуют некоторые ограничения по использованию этого биосенсора. Редокс-потенциал активной цистеиновой пары NuPer такой же, как и у wtOxyR и составляет около –185 мВ [19]. Следовательно, NuPer может быть успешно использован в сравнительно

восстанавливающих условиях ядерно-цитоплазматического компартамента [17, 23, 24], митохондриального матрикса [17, 23], пероксисом [23, 25, 26], однако в менее восстанавливающих условиях, например в люмене эндоплазматического ретикулума, NuPer находится в полностью окисленном состоянии [23, 27].

Биосенсор NuPer является популярным и широко используемым инструментом для изучения роли H₂O₂ в живых системах. Не так давно появились версии биосенсора с улучшенными характеристиками, позволяющие исследовать в биологических моделях даже незначительные изменения концентрации H₂O₂.

Первой такой улучшенной версией стал NuPer-2, демонстрирующий примерно в 2 раза больший динамический диапазон ответа (подразумевается максимальное изменение сигнала F500/F420 в ответ на окисление) по сравнению с исходным вариантом. Ключевую роль при этом сыграла единственная замена Ala406Val [28], соответствующая по литературным данным мутации Ala233Val в

wtOxyR [18]. К недостаткам NyPer-2 следует отнести медленную, по сравнению с NyPer, кинетику реакций окисления и последующего восстановления, что может сказываться на временном разрешении детектирования H_2O_2 [28]. В другой версии биосенсора — NyPer-3, эта проблема была устранена. NyPer-3 отличается от исходного варианта мутацией His34Tyr, благодаря которой новая версия биосенсора обладает сравнимым с NyPer-2 динамическим диапазоном ответа, но при этом его скорости реакций окисления и восстановления существенно выше, что делает NyPer-3 более предпочтительным инструментом для регистрации быстрых колебаний H_2O_2 в живых системах [22].

Создание различных спектральных вариантов одного и того же биосенсора благодаря появлению новых циркулярно-пермутированных флуоресцентных белков позволяет использовать сразу несколько биосенсоров в пределах одной клетки. Кроме того, красные GFP-подобные белки наиболее удобны для микроскопии в толстых слоях тканей. На базе циркулярно-пермутированного варианта красного флуоресцентного белка mApple, который ранее был использован в кальциевом биосенсоре R-GECO1 [29], был создан биосенсор NyPer-Red [30]. NyPer-Red обладает пиком возбуждения флуоресценции с максимумом при 575 нм и пиком эмиссии при 605 нм. При этом NyPer-Red обладает одинаковой чувствительностью и схожими кинетическими параметрами с NyPer, созданным на базе srYFP [30].

рН-БИОСЕНСОР SupHer — ЛУЧШИЙ КОНТРОЛЬ ДЛЯ NyPer

Хромофор дикого типа GFP и почти всех GFP-подобных белков содержит аминокислотный остаток Tyr, который может находиться как в протонированной форме (нейтральной), так и в депротонированной (анионной) [31–33]. В рН-чувствительных биосенсорах окружение хромофора организовано таким образом, что может происходить переход протона от Tyr в составе хромофора в среду [33]. Поэтому при изменении величины рН хромофор белка может переходить в протонированную или депротонированную формы.

Большинство пермутированных флуоресцентных белков имеют нарушенную структуру β -бочонка, и их хромофор контактирует с окружающей средой, что и делает их чувствительными к изменениям рН в клетке. Биосенсор NyPer не является исключением и обладает сильной рН-чувствительностью. Закисление окружающей среды приводит к возрастанию уровня протонированной формы (пик возбуждения 420 нм) и падению уровня депротонированной формы (пик 500 нм), имитируя, таким образом, восстановление биосенсора NyPer [17, 34]. Зашелачивание среды, на-

оборот, имитирует окисление NyPer. Проблему воздействия колебаний рН на сигнал биосенсора можно решить, используя рН-специфичные индикаторы в качестве контроля.

Идеальным таким контролем для NyPer является его собственная версия с мутацией Cys199Ser, которая делает его нечувствительным к H_2O_2 . Первоначально этот мутант использовали для демонстрации того, что Cys199 в составе NyPer играет такую же ключевую роль для взаимодействия с H_2O_2 , как и в белке wtOxyR [17]. Поскольку NyPer-Cys199Ser не реагирует с H_2O_2 , но при этом обладает с NyPer абсолютно идентичной чувствительностью к изменениям рН, данная мутантная версия является идеальным рН-контролем для NyPer. Позднее NyPer-Cys199Ser получил название SupHer и был детально охарактеризован и успешно используется в качестве рН-индикатора [34].

srYFP — ИНДИКАТОР НА СУПЕРОКСИД-АНИОН РАДИКАЛ ИЛИ НА ИЗМЕНЕНИЕ рН?

Недавно были опубликованы данные о том, что в матриксе митохондрий srYFP сам по себе чувствителен к супероксид-анион радикалу, $O_2^{\cdot-}$ [35]. При экспрессии srYFP в митохондриях мышечных клеток сердца с помощью srYFP регистрировали “вспышки” $O_2^{\cdot-}$. Очищенный белковый препарат srYFP реагирует увеличением интенсивности флуоресценции при инкубации с ксантин/ксантиноксидазой, при этом наблюдается зависимость от присутствия супероксиддисмутазы в пробе. В пользу предположений о том, что srYFP может выступать в роли индикатора $O_2^{\cdot-}$ говорит тот факт, что миметики супероксиддисмутазы и некоторые антиоксиданты понижали частоту таких “вспышек” $O_2^{\cdot-}$ [35].

Тем не менее, эта работа вызвала много критических замечаний и по сей день является предметом дискуссий. Так, например, оказалось, что кратковременные “вспышки” сигнала, регистрируемые srYFP, сохраняются и в гипоксических или даже безкислородных условиях, при которых образование $O_2^{\cdot-}$ невозможно. Кроме того, эффекты некоторых фармакологических ингибиторов дыхательной цепи митохондрий противоречили уже имеющимся данным [36]. Например, антимицин А (antimycin A), ингибитор комплекса III, известный своей способностью индуцировать продукцию $O_2^{\cdot-}$ в митохондриях, наоборот, ингибировал “вспышки” $O_2^{\cdot-}$, детектируемые с помощью srYFP [35].

Существуют свидетельства в пользу того, что srYFP можно рассматривать в качестве рН-био-

сенсора, поскольку его сигнал изменяется в ответ на изменение рН [37]. *cpYFP* был независимо охарактеризован в митохондриях растений, где также были обнаружены подобные “вспышки” сигнала биосенсора. При этом манипуляции с митохондриальным $O_2^{\cdot-}$ не влияли на частоту или интенсивность этих “вспышек”, которые, однако, зависели от значения рН матрикса [37]. Ранее в качестве рН-контроля для *cpYFP* был использован *EYFP*. Однако эти два белка значительно различаются по чувствительности к изменению рН. При колебаниях рН, характерных для митохондриального матрикса (7.5–8.5), *EYFP* демонстрировал в 10 раз меньшее изменение флуоресценции, что ставит под вопрос целесообразность его использования в качестве контроля для *cpYFP* [38].

Биосенсоры *HuPer* и *SypHer*, которые также являются биосенсорами на базе *cpYFP*, детектировали похожие “вспышки” в митохондриях [39]. При этом *HuPer* специфичен по отношению к H_2O_2 и не реагирует с $O_2^{\cdot-}$ [17]. Интересно, что в экспериментах как с *HuPer*, так и с *SypHer* “вспышки” сигналов в митохондриях появлялись одновременно с возрастанием красной флуоресценции синтетического индикатора на $O_2^{\cdot-}$ *MitoSox*, который рН-стабилен при физиологических значениях рН [39].

Есть основания предполагать, что увеличение $O_2^{\cdot-}$ может быть последствием возрастания рН, так как скорость реакции дисмутации $O_2^{\cdot-}$ зависит от рН. Скорость спонтанной дисмутации падает в 10 раз с возрастанием рН на единицу. Ферментативный процесс, катализируемый супероксиддисмутазой, в меньшей степени зависит от рН. Таким образом, может оказаться, что в митохондриях имеют место оба процесса – возрастание рН и формирование/стабилизация $O_2^{\cdot-}$.

Учитывая, что механизм чувствительности *cpYFP* к $O_2^{\cdot-}$ до сих пор не был описан, и существование “вспышек” $O_2^{\cdot-}$ пока не подтверждено другими методами, становится ясно, что необходимы дальнейшие эксперименты для подтверждения пригодности *cpYFP* в качестве биосенсора для регистрации $O_2^{\cdot-}$.

РЕДОКС-АКТИВНЫЕ GFP (roGFP) И ИХ МОДИФИКАЦИИ

До появления генетически кодируемых флуоресцентных биосенсоров не существовало методов, позволяющих регистрировать в живых системах изменение соотношения восстановленной и окисленной форм глутатиона (2GSH/GSSG).

Глутатион является ключевой молекулой в окислительно-восстановительных реакциях клеточного тиол-дисульфидного обмена. От соотношения 2GSH/GSSG зависит общее редокс-состояние практически всех клеточных тиоловых групп, которые уравниваются соотношением 2GSH/GSSG при участии ферментов тиол-дисульфидного обмена.

Идея создания биосенсора, отображающего такой параметр, как соотношение 2GSH/GSSG, заключается во введении близко расположенной пары цистеинов в область флуоресцентного белка рядом с его хромофором. Редокс-состояние такой введенной пары цистеинов также зависит от состояния пула глутатиона в клетке или в клеточном компартменте. При окислении происходит формирование дисульфидной связи между этими остатками, эта связь может быть вновь восстановлена. Окисленное и восстановленное состояния такого флуоресцентного белка должны различаться по спектральным характеристикам. На сегодняшний день существует несколько биосенсоров подобного типа, позволяющих регистрировать изменения соотношения 2GSH/GSSG.

rxYFP

Первым биосенсором, позволяющим регистрировать изменения соотношения 2GSH/GSSG стал редокс-активный YFP (*rxYFP*) (рис. 3а) с мутациями *Asn149Cys* и *Ser202Cys*, расположенными на соседних бета-слоях белка вблизи его хромофора [40]. Соседние аминокислотные остатки в положениях 148 и 203 обращены к хромофору и формируют его микроокружение, необходимое для флуоресценции белка. Образование дисульфидной связи между *Cys149* и *Cys202* в *rxYFP* приводит к изменениям в положении соседних *His148* и *Tyr203* относительно хромофора, в результате чего происходит изменение спектральных характеристик белка. При окислении интенсивность флуоресценции *rxYFP*, возбуждаемой в области 512 нм, падает максимально в 2 раза [40].

Равновесный потенциал белка *rxYFP* составляет –261 мВ. Очищенный препарат белка очень медленно уравнивается глутатионом в различных редокс-состояниях, но добавление рекомбинантного глутаредоксина (*Grx*) значительно убыстряет реакцию [41]. Благодаря этому несложному эксперименту [41] стало понятно, что для работы *rxYFP* в системах ключевым моментом является доступность глутаредоксина, который быстро уравнивает редокс-состояние биосенсора с окружающим глутатионовым редокс-буфером.

roGFP

Стратегия создания редокс-биосенсора для регистрации динамики изменения соотношения

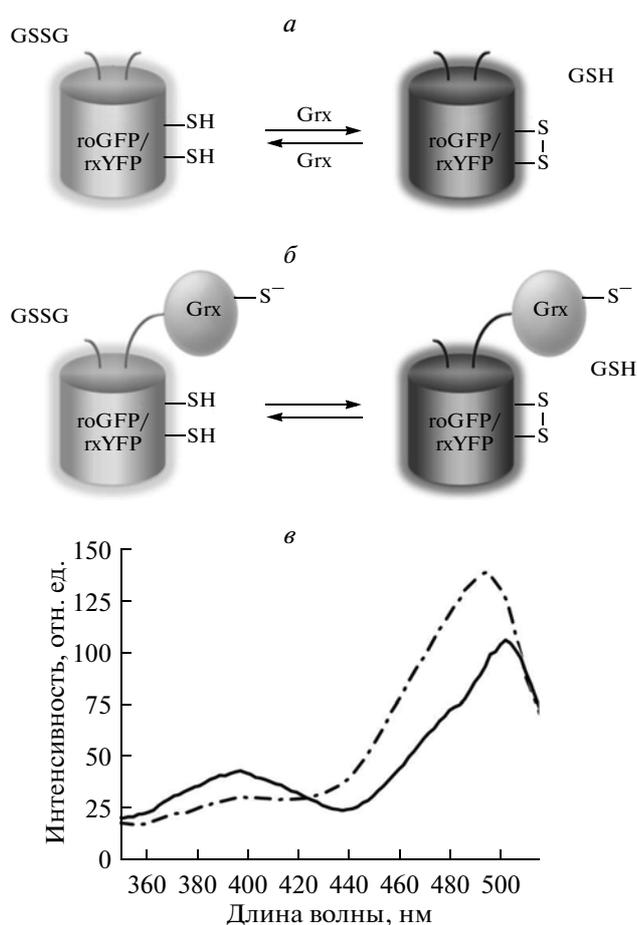


Рис. 3. Генетически кодируемые флуоресцентные биосенсоры для регистрации соотношения 2GSH/GSSG. Схема строения и реакции обратимого окисления (а) roGFP (roGFP1 и roGFP2) и rxYFP (б) Grx-roGFP и rxYFP. В случае (б) глутаредоксин (Grx) связан с флуоресцентным белком посредством пептидного линкера. (в) Спектр возбуждения флуоресценции восстановленного Grx1-roGFP2 (штрих-пунктирная линия) и окисленного Grx1-roGFP2 (сплошная линия). Для спектра характерно наличие двух пиков с максимумами при 400 и 490 нм, изменяющихся ратиометрически.

2GSH/GSSG на примере rxYFP была успешно применена к wtGFP (рис. 3а) [42, 43]. Замены Ser147Cys и Gln204Cys, а также дополнительная мутация Cys48Ser привели к созданию биосенсора roGFP1. В результате мутации Ser65Thr в roGFP1 был получен roGFP2 [42, 43]. Для обоих вариантов roGFP характерно наличие двух пиков в спектре возбуждения флуоресценции. При окислении roGFP1 и roGFP2 происходит увеличение пика в области 400 нм, соответствующего протонированной форме хромофора, и одновременно уменьшение пика, соответствующего анионной форме (475 нм для roGFP1 и 490 нм для roGFP2) [42, 43].

В отличие от rxYFP, для roGFP1 и roGFP2 характерен ратиометрический характер поведения сигналов. Кроме того, roGFP1 и roGFP2 имеют более низкий равновесный потенциал (–291 мВ для roGFP1 и –280 мВ для roGFP2) [43] по сравнению с rxYFP (–261 мВ), что делает их более чувствительными к небольшим изменениям в степени окисления пула глутатиона.

С практической точки зрения roGFP2 представляется более полезным, чем roGFP1, по нескольким причинам. Во-первых, roGFP2 ярче и имеет более широкий динамический диапазон ответа при возбуждении обычными лазерами с длинами волн 405 и 488 нм. Во-вторых, в roGFP2 анионная форма хромофора (возбуждение 490 нм) доминирует над протонированной формой (возбуждение 400 нм), в то время как для roGFP1 характерно обратное [43]. Поскольку при окислении происходит понижение уровня анионной формы и возрастание уровня протонированной, окисление roGFP1 приводит к понижению интенсивности слабого сигнала (анионного) и возрастанию изначально сильного сигнала (протонированного), что неудобно при микроскопии.

Сигнал roGFP1 стабилен при физиологических изменениях величины pH, в то время как roGFP2 со значением pK_a около 6.0 чувствителен к колебаниям pH [43]. При закислении среды интенсивности флуоресценции протонированной и анионной форм хромофора roGFP2 снижаются, но при этом их соотношение не изменяется [44]. Таким образом, благодаря своим ратиометрическим показаниям биосенсор roGFP2 относится все же к pH-стабильным индикаторам.

Grx1-roGFP2

Проблема медленного уравнивания с внешними тиолами характерна как для rxYFP, так и для версий roGFP [45]. При этом реакция тиол-дисульфидного обмена между глутатионом и roGFP ускоряется в присутствии глутаредоксина, доступность которого является основным лимитирующим фактором этой реакции. В случае с rxYFP эта проблема была решена путем получения биосенсора, в котором rxYFP связан с глутаредоксином посредством пептидного линкера [46]. Эту же стратегию позднее применили для roGFP2, что привело к созданию биосенсора Grx1-roGFP2 (схема изображена на рис. 3б, спектр возбуждения флуоресценции на рис. 3в) со значительно улучшенными характеристиками. Grx1-roGFP2 позволяет гораздо быстрее, по сравнению с roGFP2, регистрировать динамику изменения соотношения 2GSH/GSSG. Рабочий диапазон Grx1-roGFP2 по редокс-потенциалу находится между –240 мВ и –320 мВ, что делает данный биосенсор очень чувствительным даже к минимальным изменениям концентрации GSSG в системе. По

этой же причине использование Grx1-roGFP2 возможно лишь в относительно восстановленных компартментах клетки [44].

roGFP часто неправильно используют в качестве индикатора для АФК. Сигнал Grx1-roGFP2 в клетках действительно изменяется при добавлении H_2O_2 , хотя очищенный препарат этого биосенсора не реагирует на H_2O_2 . Влияние H_2O_2 на сигнал биосенсора опосредовано окислением пула GSH, а не является результатом прямого взаимодействия Grx1-roGFP2 с H_2O_2 . На сегодняшний день представлены подробные протоколы использования биосенсоров на основе roGFP [47].

Orp1-roGFP2

После удачной разработки биосенсора Grx1-roGFP2 возникла идея использовать roGFP2 в качестве субстрата для пероксидазы. Возникло предположение, что если оба белка (пероксидаза и roGFP2) будут связаны друг с другом по принципу связи в Grx1-roGFP2, то пероксидаза сможет использовать в качестве субстрата roGFP2. Вскоре на основе roGFP2 и пероксидазы дрожжей Orp1 был получен биосенсор для регистрации H_2O_2 с сохранением спектральных характеристик roGFP2 [48].

Основная цель создания Orp1-roGFP2 заключалась в изучении механизмов окисления тиоловых групп белков *in vivo*. Известно, что большинство таких групп обладают слабой реакционной способностью по отношению к H_2O_2 . И даже существующие редокс-активные группы некоторых белков, например каталитический Cys в тирозинфосфатазе РТР-1В [49, 50], довольно медленно реагируют с H_2O_2 по сравнению с пероксиредоксинами [51]. До сих пор остается неясным, как в присутствии пероксиредоксинов такие цистеины способны окисляться. Одно из объяснений может состоять в том, что эти цистеины реагируют с H_2O_2 не напрямую, а подвергаются опосредованному окислению со стороны пероксидаз. Биосенсор Orp1-roGFP2 в этом плане является хорошей моделью, подтверждающей это объяснение. В клетках дрожжей пероксидаза Orp1 окисляется H_2O_2 , после чего она окисляет транскрипционный фактор Yap1 [52]. Для такой пероксидазы, как Orp1, roGFP2 с его редокс-неактивными цистеинами представляется хорошим потенциальным партнером. Действительно, было показано, что, будучи составляющей химерного белка Orp1-roGFP2, пероксидаза Orp1 почти стехиометрически нейтрализует H_2O_2 и окисляет roGFP2. Благодаря этому результату стало очевидным, что некоторые пероксидазы в условиях *in vivo* катализируют окисление цистеинов, не обладающих высокой редокс-активностью в клетке.

Orp1-roGFP2, как и НуPer, может быть использован в качестве биосенсора для регистрации H_2O_2 в живых системах. Было проведено прямое сравнение Orp1-roGFP2 с НуPer, которое показало схожий характер поведения сигналов обоих биосенсоров в ответ на H_2O_2 в цитоплазме клеткок млекопитающих. Однако НуPer продемонстрировал более быстрое окисление, что связано с прямым окислением биосенсора H_2O_2 , а не опосредованным, как в случае с Orp1-roGFP2 [48].

БИОСЕНСОРЫ ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ СООТНОШЕНИЯ $NAD^+/NADH$

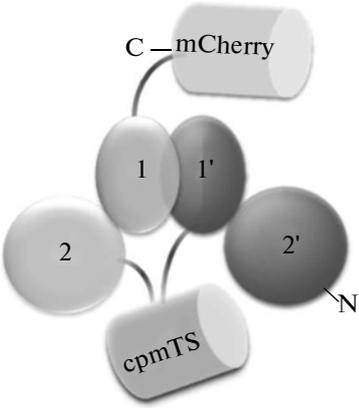
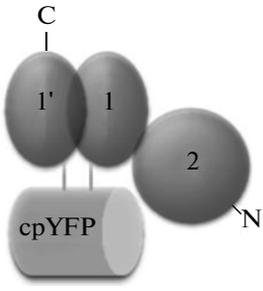
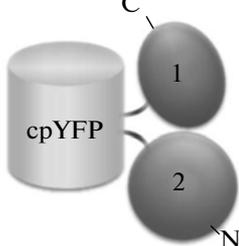
Долгое время считалось, что главная функция NAD^+ и NADH ограничивается их участием в процессах энергетического обмена клеток. Но за последние несколько лет представление о функциях этого кофактора в значительной степени расширилось. Соотношение $NAD^+/NADH$ является важнейшим клеточным редокс-параметром, которое регулирует работу многих ферментов и участвует в регуляции таких сложных процессов, как старение [53], кальциевый сигналинг [54–57], клеточный цикл [58].

Использование ферментативных систем для определения NAD^+ и NADH [59, 60] позволяет работать лишь с биологическими экстрактами. Более распространенные УФ-микроскопия и, в большей степени, двухфотонная микроскопия не дают информации об изменении соотношения $NAD^+/NADH$ в клетке. Можно неспецифично регистрировать лишь флуоресцирующую восстановленную форму кофактора [61–69]. Кроме того, при длительной и интенсивной съемке образца такими методами может происходить его повреждение [70–73].

Для регистрации соотношения $NAD^+/NADH$ в живых системах были независимым образом разработаны сразу несколько генетически кодируемых флуоресцентных биосенсоров (таблица).

Как и в случае с биосенсором на пероксид водорода НуPer [17], была применена стратегия использования конформационного изменения структуры бактериального белка в ответ на изменение исследуемого параметра в клетке, в данном случае – соотношения $NAD^+/NADH$, и визуализация этих перестроек с помощью интегрированного кругового пермутанта флуоресцентного белка. Во всех существующих биосенсорах для регистрации соотношения $NAD^+/NADH$ в качестве основы были выбраны представители бактериальных белков семейства Rex. В бактериальных клетках белки данного семейства выступают в роли транскрипционных факторов и функционируют в виде гомодимеров; все они являются природными сен-

Сравнительная характеристика генетически кодируемых флуоресцентных биосенсоров, регистрирующих соотношение NAD^+/NADH

| | Peredox [78] | Frex [79] | RexYFP [80] |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Схематичное изображение структуры |  |  |  |
| | Обозначения: 1, 1' – NAD-связывающие домены разных субъединиц Rex 2, 2' – ДНК-связывающие домены разных субъединиц Rex | | |
| Спектральные характеристики | Ex.400/Em.510 – для cpmTS Ex.587/Em.610 – для mCherry | Ex.420, 500/Em.518 | Ex.490/Em.516 |
| Значение константы сродства к NADH | Менее 5 нМ | FrexH – 40 нМ Frex – 3.7 мкМ C3L194K – 50 мкМ | 180 нМ |
| Достоинства | Высокая чувствительность и специфичность | Для каждого конкретного эксперимента можно подобрать версию с требуемой чувствительностью | Небольшая молекулярная масса |
| | Стабильный сигнал при физиологических изменениях величины pH (pK_a cpmTS – 5) | | Позволяет получать и сравнивать сигналы матрикса митохондрий и цитоплазмы |
| Недостатки | Ограничения, связанные с большой молекулярной массой конструкции | pH-чувствительность в физиологических условиях | pH-чувствительность в физиологических условиях, рекомендуется использовать в качестве pH-контроля SypHer |
| | Из-за высокого сродства к NADH биосенсор не работает в условиях высоких концентраций NADH, в том числе в матриксе митохондрий | Каждую из версий биосенсора предпочтительнее использовать в определенных условиях, но результаты, полученные с помощью разных версий, сравнивать нельзя | Нельзя исключить влияние NADPH на сигнал биосенсора (сродство к NADPH 6.2 мкМ) |

сорами внутриклеточных колебаний соотношения NAD^+/NADH [74–77].

В условиях аэрации, когда индекс NAD^+/NADH имеет высокое значение, представители Rex белков образуют прочный комплекс с бактериальной ДНК и молекулой NAD^+ , выступая в качестве репрессора транскрипции некоторых генов. Если NAD^+/NADH соотношение снижается в условиях недостатка кислорода, белок Rex связывает две молекулы NADH , поскольку имеет к нему большее сродство, чем к NAD^+ . Это приводит к конформационным изменениям в структуре белка Rex и последующему его освобождению из комплекса с ДНК [76, 77].

Peredox

Основой работы биосенсора Peredox [78], регистрирующего соотношение NAD^+/NADH , являются взаимодействия двух субъединиц T-Rex (из *Thermus aquaticus*) в составе димера при изменении внутриклеточного индекса NAD^+/NADH . Субъединицы T-Rex соединены друг с другом через пермутант флуоресцентного белка T-Sapphire с помощью коротких пептидных линкеров. Спектр возбуждения флуоресценции биосенсора характеризуется наличием одного пика в области 400 нм, максимум эмиссии наблюдается при 510 нм. При увеличении концентрации NADH в системе происходит увеличение интенсивности флуоресценции биосенсора. На данный момент Peredox является самым чувствительным биосенсором к NADH среди всех биосенсоров данной группы, его константа сродства к NADH составляет менее 5 нМ. По причине высокого сродства к NADH Peredox не может быть использован в условиях высоких концентраций NADH , в том числе в матриксе митохондрий [78].

Несмотря на то что окисленная форма кофактора NAD^+ не влияет на спектральные характеристики Peredox, все же и она связывается биосенсором, поскольку этим свойством обладают все белки семейства Rex. NADH и NAD^+ конкурируют за нуклеотидсвязывающий сайт биосенсора, поэтому на его сигнал влияет присутствие в окружении не только NADH , но и NAD^+ , что и делает Peredox биосенсором на соотношение NAD^+/NADH . При этом сродство Peredox к NADH примерно в 8000 раз выше, чем к NAD^+ . Другие соединения, такие как NADPH , NADP^+ , ATP , ADP , AMP , ADP -рибоза, никотинамид, аденозин, в физиологически возможных концентрациях не влияют на сигнал биосенсора или влияют незначительно [78].

На C- конце конструкции Peredox расположен красный флуоресцентный белок mCherry. С одной стороны, благодаря этому сигнал биосенсора носит ратиометрический характер, поскольку

флуоресценция красного белка стабильна, но с другой стороны, делает конструкцию биосенсора более массивной. Есть сведения, что в цитоплазме некоторых типов эукариотических клеток Peredox по неизвестной причине подвержен агрегации [78].

Возможность использования Peredox в эукариотических клетках была успешно продемонстрирована на некоторых типах клеток млекопитающих. Неоспоримым преимуществом данного биосенсора является стабильность его сигнала в условиях изменений величины pH в физиологическом диапазоне (pK_a T-Sapphire составляет около 5) [78].

Frex

Биосенсор Frex и различные его варианты [79] имеют схожий принцип работы с Peredox [78]. В данном случае между субъединицами димера B-Rex (из *Bacillus subtilis*) интегрирован srYFP [79]. При этом одна субъединица в составе Frex является полноразмерной, а вторая представлена лишь одним нуклеотидсвязывающим доменом. В спектре возбуждения флуоресценции для биосенсора характерен выраженный пик с максимумом при 500 нм и слабовыраженный при 420 нм, максимум эмиссии фиксируется при 518 нм [79].

При связывании NADH интенсивность флуоресценции биосенсора Frex, возбуждаемая при 500 нм, увеличивается. Константа сродства Frex к NADH составляет 3.7 мкМ [79], что отражает его гораздо более низкую чувствительность по сравнению с Peredox [78]. Версия, которая была названа FrexH, обладает большим сродством к NADH , ее константа сродства составляет около 40 нМ. FrexH отличается от Frex поведением сигнала – в случае FrexH связывание NADH приводит к падению интенсивности флуоресценции биосенсора. Кроме того, существует еще одна версия биосенсора с очень низким сродством к NADH с константой сродства около 50 мкМ [79].

Сигнал всех версий данного биосенсора специфичен по отношению к NADH . Но, как и в случае других биосенсоров, созданных на основе srYFP , сигналы всех представителей Frex подвержены влиянию со стороны колебаний значения pH в физиологических моделях. Авторы данной работы предлагают лишь в некоторых случаях в качестве pH-контроля использовать srYFP [79]. Такой подход некорректен, поскольку pH-чувствительность пермутированного флуоресцентного белка в свободном состоянии и в составе химерного белка может быть разной.

Существование нескольких версий биосенсора Frex, различающихся сродством к NADH , делает предпочтительным использование той или иной версии в компартаментах клетки с опреде-

ленными концентрациями NADH. Это существенно ограничивает применение данного сенсора в условиях сравнения исследуемого параметра, например в цитоплазме и матриксе митохондрий, поскольку концентрация свободного NADH в этих компартаментах отличается.

RexYFP

В отличие от предыдущих биосенсоров *Frex* и *Peredox* функционирование *RexYFP* [80] основано на взаимодействиях доменов в составе одной субъединицы T-Rex. Для создания этого биосенсора в структуру бактериального белка между его нуклеотид- и ДНК-связывающими доменами был интегрирован *cpYFP*. Внутримолекулярные перестройки в пределах одной субъединицы T-Rex в зависимости от соотношения $NAD^+/NADH$ в среде приводят к изменению флуоресцентного сигнала. Таким образом, конструкция *RexYFP* минимум в 1.5–2 раза меньше по сравнению с конструкциями других биосенсоров этой группы. Это может быть важным преимуществом при создании химерных белков с биосенсором или при его направленной локализации в различные структуры клетки. Спектр возбуждения флуоресценции *RexYFP* представлен одним пиком с максимумом при 490 нм, для спектра эмиссии характерен пик с максимумом при 516 нм. При связывании NADH интенсивность флуоресценции снижается; среди прочих соединений лишь NADPH оказывает влияние на сигнал *RexYFP*. При этом константы сродства для NADH и NADPH у *RexYFP* разные: 180 нМ и 6.2 мкМ; соответственно [80]. Бóльшее сродство *RexYFP* к NADH и тот факт, что внутриклеточная концентрация общего пула NADP ниже по сравнению с пулом NAD (например, в клетках печени крысы примерно в 10 раз) позволяют сделать вывод, что сигнал *RexYFP* в большей степени зависит именно от колебаний соотношения $NAD^+/NADH$. Однако при нормальных физиологических условиях общий пул NADP в клетке более восстановлен, в отличие от пула NAD [53, 81–83]. Поэтому нельзя полностью исключить вероятности того, что при некоторых условиях NADPH все же может оказывать влияние на сигнал *RexYFP*.

Сигнал *RexYFP* также зависит от величины pH в физиологическом диапазоне изменений. Закисление среды приводит к понижению флуоресценции *RexYFP*. Для того чтобы учесть влияние pH на сигнал *RexYFP*, в качестве pH-контроля рекомендуется использовать pH-биосенсор *SyrHeg* [17, 34]. Экспериментально было показано, что *SyrHeg* и *RexYFP* имеют одинаковую pH-зависимость в физиологическом диапазоне pH [80]. Нормирование сигнала *RexYFP* на сигнал *SyrHeg* в одинаковых условиях экспериментов позволяет учитывать влияние колебаний pH на сигнал *RexYFP* [80].

Эффективность использования биосенсора *RexYFP* совместно с предложенным способом контроля pH-изменений с помощью *SyrHeg* была продемонстрирована на линиях клеток млекопитающих [80]. Было проведено также сравнение динамики изменения сигнала *RexYFP* с показаниями pH-стабильного биосенсора *Peredox* [78] в ответ на различные стимулы [80]. При этом сигналы *Peredox* и *RexYFP* одинаковы по характеру и вполне сравнимы по амплитуде ответа. В некоторых случаях *Peredox* достигает своего максимума ответа быстрее по сравнению с *RexYFP*, что связано с разницей в чувствительности к NADH двух этих биосенсоров [80].

Из-за высокого сродства к NADH *Peredox* не может быть использован в условиях высоких концентраций этого кофактора, в том числе в матриксе митохондрий [78]. Другой биосенсор *Frex* имеет несколько версий, различающихся сродством к NADH. Так, выделяют *Frex* (K_d 3.7 мкМ), *FrexH* (K_d 40 нМ), *C3L194K* (K_d 50 мкМ). Каждая из этих версий имеет предпочтительное использование в тех или иных условиях [79]. При этом *RexYFP*, значение константы сродства которого составляет 180 нМ, является на данный момент единственным биосенсором, с помощью которого можно регистрировать динамику изменения соотношения $NAD^+/NADH$ как в цитоплазме, так и в матриксе митохондрий [80].

Таким образом, существующие генетически кодируемые биосенсоры позволяют регистрировать соотношение $NAD^+/NADH$ в живых системах, что ранее было невозможно. Наличие определенных преимуществ делает каждого из них предпочтительным для использования в конкретных экспериментах.

РЕДОКС-БИОСЕНСОРЫ, ОСНОВАННЫЕ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯХ FRET

Было предпринято несколько попыток сделать биосенсор для регистрации H_2O_2 , принцип работы которого основан на взаимодействиях FRET. Первые варианты состояли из FRET-пары флуоресцентных белков ECFP и EYFP, которые были соединены линкерной последовательностью с двумя остатками Cys, формирующими дисульфидную связь при окислении [84]. Динамический диапазон таких биосенсоров оказался слишком мал для их продуктивного использования в микроскопии. Последующие работы по оптимизации состава линкерного участка и FRET-пар привели к созданию биосенсора с 6-кратным изменением в эффективности FRET и значением редокс-потенциала –143 мВ [85]. Благодаря более положительному равновесному редокс-потенциалу относительно существующих версий *roGFP*, полученный сенсор вскоре был использован для

наблюдений редокс-событий в просвете эндоплазматического ретикула [86].

Среди других редокс-биосенсоров, основанных на взаимодействиях FRET, следует отметить биосенсор OxyFRET [87], который содержит два цистеин-богатых домена (cysteine-rich domains (CRD)) из белка Yap1, разделенных синим и желтым флуоресцентными белками. Окисление в доменах CRD приводит к изменениям в эффективности FRET, но клеточные системы, отвечающие за окисление биосенсора, пока неизвестны. Другой биосенсор, PerFRET [87], состоит из одного домена CRD и пероксидазы Ogp1, фланкированных FRET-парой, состоящей из белков Cerulean и Venus. Оба биосенсора работают схожим образом в различных моделях. Хотя динамический диапазон ответа биосенсоров сравнительно мал, они были успешно использованы для мониторинга активации NADPH-оксидазы [87].

ПРИМЕНЕНИЕ РЕДОКС-БИОСЕНСОРОВ В РАЗЛИЧНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Перед планированием экспериментов с использованием различных редокс-биосенсоров крайне важно понимать, что именно является объектом исследования. Так, ряд исследователей успешно использовали различные версии roGFP в качестве биосенсоров, регистрирующих АФК. При этом биосенсоры на основе roGFP не реагируют с АФК в физиологических концентрациях, поскольку цистеины roGFP реагируют с H_2O_2 с крайне низкой скоростью [88]. С помощью глутаредоксинов, наличие которых является лимитирующим фактором, биосенсоры подобного типа уравниваются с общим пулом глутатиона. Очевидно, что оптимальным биосенсором для измерения редокс-состояния внутриклеточных тиолов является Grx-roGFP2 [44]. Что касается регистрации АФК, то на данный момент выбор биосенсоров в этой области ограничен несколькими версиями HyPer [17, 22, 28] и Ogp1-roGFP2 [48].

Несмотря на то что HyPer и roGFP в основном используют для получения информации пространственного и временного характера, с их помощью можно проводить и количественный анализ. Конкретное значение откалиброванного сигнала roGFP2 можно перевести в значение редокс-потенциала тиоловых групп. Подобные расчеты приведены в ряде работ [44, 47, 88]. Биосенсор HyPer также был откалиброван разными концентрациями H_2O_2 [17], что позволяет аналогичным образом использовать значение его сигнала для определения концентрации H_2O_2 , но из-за конкуренции HyPer с компонентами антиоксидантных систем измеренную таким образом концентрацию H_2O_2 следует рассматривать как прибли-

тельную. Биосенсоры для регистрации соотношения $NAD^+/NADH$ также могут быть применены для количественной оценки исследуемого параметра.

Редокс-биосенсоры могут быть использованы в биологических системах различной сложности. В самом простом варианте с их помощью можно наблюдать за живыми клетками в культуре в режиме реального времени, что ранее было невозможно из-за ограничений существующих синтетических красителей. Редокс-биосенсоры сделали возможной регистрацию некоторых редокс-процессов в реальном времени на уровне не только отдельных клеток, но и органелл и даже субкомпарментов. С другой стороны, использование генетически кодируемых биосенсоров возможно на уровне целой ткани или отдельного организма.

HyPer В КЛЕТОЧНЫХ ОРГАНЕЛЛАХ

HyPer и его производные были успешно использованы для регистрации H_2O_2 , образованного в клетке в ответ на добавление EGF [89, 90], PDGF [28], NGF [17], электрическую стимуляцию нейронов [91], инсулин [92] и другие стимулы. В большинстве экспериментов отсутствовал контроль, определяющий наличие колебаний значения pH [17, 28, 89–92]. Полученные с помощью биосенсора SypHer [17, 34] неопубликованные данные свидетельствуют об отсутствии значимых изменений величины pH в клетках линий HeLa и NIH-3T3 при добавлении EGF и PDGF. Тем не менее, в экспериментах с участием различных версий HyPer рекомендуется делать pH-контроль.

Все перечисленные работы с участием биосенсора были проведены с его версией, локализованной в цитоплазме клеток. Помимо этого были также использованы версии биосенсора с локализациями в митохондриях [17, 23, 93–95] и пероксисомах [23, 25, 26].

МИКРОДОМЕНЫ H_2O_2 , ОБНАРУЖЕННЫЕ С ПОМОЩЬЮ HyPer

С помощью редокс-протеомики было выяснено, что средний уровень степени окисленности тиоловых групп в разных клеточных компартментах (ядро, цитоплазма, митохондрии) не отличается. Значительная разница была обнаружена в окисленности тиолов, ассоциированных с разными сигнальными путями или типами белков. Например, белки цитоскелета оказались наиболее восстановленными, в то время как белки каскада PI3K/Akt демонстрировали наибольшую степень окисленности тиоловых групп [96]. Становится понятно, что редокс-карты отдельных клеточных компартментов отличаются высокой степенью гетерогенности. Аэробные формы жизни в процессе эволюции приобрели способность удержи-

вать потенциально опасные молекулы внутри микродоменов.

HuPer был успешно использован для визуализации продукции H_2O_2 в микродоменах [24, 97]. Поскольку при регистрации локальной продукции H_2O_2 внутри любого клеточного компартмента диффузия биосенсора является основным лимитирующим фактором, HuPer иммобилизовали на мембранах, которые продуцируют H_2O_2 . Локализация биосенсора на цитоплазматической поверхности мембраны позволила обнаружить локальное формирование микродоменов H_2O_2 при активации тирозинкиназных каскадов [24].

HuPer В МОДЕЛЯХ *in vivo*

В ответ на повреждение ткани формируется градиент концентрации H_2O_2 , который служит для привлечения в рану нейтрофилов и представляет собой самую раннюю стадию воспалительного ответа. С помощью биосенсора HuPer был впервые визуализирован градиент H_2O_2 в хвостовом плавнике *Danio rerio* при нанесении раны [98]. Позднее существование этого градиента было подтверждено улучшенной версией биосенсора HuPer-3, который предпочтительнее использовать в данной модели благодаря большему динамическому диапазону ответа данной версии [22]. В рамках другого недавнего исследования было продемонстрировано, что нейтрофилы, прибывающие в область раны, снижают градиент H_2O_2 с помощью миелопероксидазы [99]. Создание трансгенной рыбы, экспрессирующей HuPer в нейтрофилах, позволило наблюдать внутриклеточный градиент H_2O_2 в мигрирующих нейтрофилах *in vivo* [99].

HuPer был также успешно использован для демонстрации градиента H_2O_2 при ампутации хвостового плавника головастика шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* [100]. Было показано, что формирование градиента H_2O_2 служит необходимой стадией для запуска регенерации плавника через активацию сигнального пути Wnt/ β -катенин. Важно отметить, что в рамках данной модели добавление различных антиоксидантов и ингибиторов NADPH-оксидазы блокировало регенерацию, в то время как экспрессия HuPer не отражалась на регенерации. Это является сильным аргументом в пользу того, что HuPer не обладает антиоксидантным эффектом в клетках, которые экспрессируют биосенсор. В настоящее время существуют лишь единственные данные о пероксидазной активности HuPer в *Arabidopsis thaliana* [101].

Интересный результат с помощью биосенсора HuPer был получен еще одной группой исследователей, показавших, что у *Caenorhabditis elegans* уровень H_2O_2 высок во время развития организма, затем падает с переходом во взрослое состояние и остается низким вплоть до начала старения,

когда вновь имеет место усиление продукции H_2O_2 . Примечательно, что животные, имевшие более высокий уровень H_2O_2 в период развития, имели более высокие концентрации оксиданта и при старении. Результаты, полученные с помощью HuPer в данном эксперименте, соотносились с данными, независимо полученными с применением AmplexRed и методов редокс-протеомики [102].

roGFP2 *in vivo* В ТКАНЯХ *Drosophila melanogaster*

Биосенсоры Grx1-roGFP2 и Ogr1-roGFP2 были использованы для исследования изменений соотношения 2GSH/GSSG и концентрации H_2O_2 в тканях *D. melanogaster* в зависимости от возраста, пола и условий содержания животных [103]. Соотношение 2GSH/GSSG в цитоплазме клеток не отличалось у животных разного возраста (от 1 до 14 дней) и в различных тканях. В митохондриях пул глутатиона был более окислен в мальпигиевых каналах и жировой ткани, но при этом более восстановлен в мышцах. Уровень H_2O_2 наоборот демонстрировал высокую вариабельность в зависимости от возраста, пола, ткани и органеллы. Энтероциты являлись основными клетками, в которых было показано, что уровень H_2O_2 в них каким-то образом зависит от возраста особи. Интересно, что более высокий уровень H_2O_2 в энтероцитах коррелировал с большей продолжительностью жизни животных [103]. Данное исследование служит дополнительным подтверждением того, что концентрация H_2O_2 и значение соотношения 2GSH/GSSG являются двумя разными клеточными параметрами, требующими независимого измерения в различных моделях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одним из ограничений некоторых существующих редокс-биосенсоров является зависимость их сигнала от изменений pH в физиологическом диапазоне. При работе с любым биосенсором подобного типа требуется проведение надежных контрольных экспериментов с применением pH-индикаторов.

Второй немаловажный вопрос заключается в том, могут ли экспрессируемые биосенсоры изменять свойства биологического объекта? В принципе, такие сенсоры, как HuPer и Ogr1-roGFP2 могут иметь антиоксидантную активность. Можно предположить, что и биосенсоры для регистрации соотношения $NAD^+/NADH$, конкурирующие с множеством нуклеотидсвязывающих белков, могут влиять на свободный пул данного кофактора в системе. Скорее всего, по мере использования этих биосенсоров в самых разных системах ответы на эти вопросы будут по-

лучены. Так, например, НуРег имеет очень высокую скорость реакции с H_2O_2 ($10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [22]. Реакция приводит к восстановлению H_2O_2 и, таким образом, НуРег выступает в качестве пероксидазы. Однако антиоксидантная функция НуРег лимитирована восстанавливающей активностью глутаредоксина и тиоредоксина. Восстановление биосенсора происходит гораздо медленнее, чем его окисление [17, 22, 28]. Поэтому НуРег не может рассматриваться в качестве эффективного антиоксиданта. Это подтверждается отсутствием физиологического влияния НуРег на такие редокс-зависимые процессы, как миграция нейтрофилов в область раны [98] или регенерация [100]. При этом остается открытым вопрос, может ли локальная экспрессия НуРег менять уровень H_2O_2 на уровне субкомпарментов? Подобная проблема имеет отношение и к другому биосенсору, Orp1-roGFP2, который имеет сходную с НуРег кинетику окисления и восстановления [48].

Благодаря существующим редокс-биосенсорам стало возможным наблюдение в реальном времени за изменениями концентрации H_2O_2 , соотношений 2GSH/GSSG и NAD^+/NADH в живых системах. Есть основания предполагать, что и в дальнейшем будут разрабатываться биосенсоры для регистрации других не менее важных параметров клетки. Так, например, большой интерес представляет изучение роли молекул двухатомных газов NO и O_2 в живых системах. До сих пор не создан биосенсор для определения соотношения $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$. Малоизученной остается роль других разновидностей АФК в различных биологических процессах. Пока применение сrYFP в качестве биосенсора для регистрации $\text{O}_2^{\cdot-}$ остается спорным, представляется возможным создать биосенсор подобного типа на основе некоторых FeS-кластерных белков. Так, в клетках *E. coli* роль природного сенсора, регистрирующего $\text{O}_2^{\cdot-}$, выполняет белок SoxR [104], в качестве основы для создания такого биосенсора также может послужить фермент аконитаза [105, 106].

Второй важный аспект дальнейшего развития редокс-биосенсоров заключается в улучшении характеристик уже существующих. К важным характеристикам биосенсора можно отнести его яркость, хороший уровень сигнала, минимальное влияние артефактов на сигнал. За исключением НуРег-Red, все приведенные в данном обзоре редокс-биосенсоры имеют эмиссию в зеленой области спектра. Получение различных спектральных версий биосенсоров позволит использовать комбинированные наборы разных редокс-биосенсоров в пределах одной клетки. Недавнее создание палитры кальциевых сенсоров [29] дает основа-

ния предполагать появление в скором времени редокс-биосенсоров на основе синих и красных белков. Биосенсоры на основе дальне-красных белков существенно облегчили бы наблюдения исследуемых процессов в тканях животных.

Потенциал для дальнейшего развития редокс-биосенсоров очень велик, он заключается как в создании новых, так и в усовершенствовании и широком применении уже существующих биосенсоров.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантом РФФИ 13-04-40333-Н, программой РАН “Молекулярная и клеточная биология” и Министерством образования и науки РФ (проект № 11.G34.31.0017).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shimomura O., Johnson F.H., Saiga Y. // J. Cell. Comp. Physiol. 1962. V. 59. P. 223–239.
2. Prasher D.C., Eckenrode V.K., Ward W.W., Prendergast F.G., Cormier M.J. // Gene. 1992. V. 111. P. 229–233.
3. Tsien R.Y. // Annu. Rev. Biochem. 1998. V. 67. P. 509–544.
4. Zimmer M. // Chem. Rev. 2002. V. 102. P. 759–781.
5. Chudakov D.M., Matz M.V., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // Physiol. Rev. 2010. V. 90. P. 1103–1163.
6. Freitas M., Lima J.L., Fernandes E. // Anal. Chim. Acta. 2009. V. 649. P. 8–23.
7. Bartosz G. // Clin. Chim. Acta. 2006. V. 368. P. 53–76.
8. Schopf R.E., Mattar J., Meyenburg W., Scheiner O., Hammann K.P., Lemmel E.M. // J. Immunol. Methods. 1984. V. 67. P. 109–117.
9. Gomes A., Fernandes E., Lima J.L. // J. Biochem. Biophys. Methods. 2005. V. 65. P. 45–80.
10. Mohanty J.G., Jaffe J.S., Schulman E.S., Raible D.G. // J. Immunol. Methods. 1997. V. 202. P. 133–141.
11. Crow J.P. // Nitric Oxide. 1997. V. 1. P. 145–157.
12. Kooy N.W., Royall J.A., Ischiropoulos H., Beckman J.S. // Free Radic. Biol. Med. 1994. V. 16. P. 149–156.
13. Miller E.W., Tulyathan O., Isacoff E.Y., Chang C.J. // Nat. Chem. Biol. 2007. V. 3. P. 263–267.
14. Rhee S.G., Chang T.S., Jeong W., Kang D. // Mol. Cells. 2010. V. 29. P. 539–549.
15. Setsukinai K., Urano Y., Kakinuma K., Majima H.J., Nagano T. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 3170–3175.
16. Li Y., Zhu H., Trush M.A. // Biochim. Biophys. Acta. 1999. V. 1428. P. 1–12.
17. Belousov V.V., Fradkov A.F., Lukyanov K.A., Staroverov D.B., Shakhbazov K.S., Terskikh A.V., Lukyanov S. // Nat. Methods. 2006. V. 3. P. 281–286.
18. Choi H., Kim S., Mukhopadhyay P., Cho S., Woo J., Storz G., Ryu S.E. // Cell. 2001. V. 105. P. 103–113.

19. Zheng M., Aslund F., Storz G. // *Science*. 1998. V. 279. P. 1718–1721.
20. Aslund F., Zheng M., Beckwith J., Storz G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999. V. 96. P. 6161–6165.
21. Lee C., Lee S.M., Mukhopadhyay P., Kim S.J., Lee S.C., Ahn W.S., Yu M.H., Storz G., Ryu S.E. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004. V. 11. P. 1179–1185.
22. 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. // *ACS Chem. Biol.* 2013. V. 8. P. 535–542.
23. Malinouski M., Zhou Y., Belousov V.V., Hatfield D.L., Gladyshev V.N. // *PLoS One*. 2011. V. 6. P. e14564.
24. Mishina N.M., Tyurin-Kuzmin P.A., Markvicheva K.N., Vorotnikov A.V., Tkachuk V.A., Laketa V., Schultz C., Lukyanov S., Belousov V.V. // *Antioxid. Redox. Signal.* 2011. V. 14. P. 1–7.
25. Costa A., Drago I., Behera S., Zottini M., Pizzo P., Schroeder J.L., Pozzan T., Lo Schiavo F. // *Plant J.* 2010. V. 62. P. 760–772.
26. Elsner M., Gehrmann W., Lenzen S. // *Diabetes*. 2011. V. 60. P. 200–208.
27. Enyedi B., Varnai P., Geiszt M. // *Antioxid. Redox Signal.* 2010. V. 13. P. 721–729.
28. Markvicheva K.N., Bilan D.S., Mishina N.M., Gorokhovatsky A.Y., Vinokurov L.M., Lukyanov S., Belousov V.V. // *Bioorg. Med. Chem.* 2011. V. 19. P. 1079–1084.
29. Zhao Y., Araki S., Wu J., Teramoto T., Chang Y.F., Nakano M., Abdelfattah A.S., Fujiwara M., Ishihara T., Nagai T., Campbell R.E. // *Science*. 2011. V. 333. P. 1888–1891.
30. Ermakova Y.G., Bilan D.S., Matlashov M.E., Mishina N.M., Markvicheva K.N., Subach O.M., Subach F.V., Bogeski I., Hoth M., Enikolopov G., Belousov V.V. // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. P. 5222.
31. Hanson G.T., McAnaney T.B., Park E.S., Rendell M.E., Yarbrough D.K., Chu S., Xi L., Boxer S.G., Montrose M.H., Remington S.J. // *Biochemistry*. 2002. V. 41. P. 15477–15488.
32. Brejc K., Sixma T.K., Kitts P.A., Kain S.R., Tsien R.Y., Ormo M., Remington S.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997. V. 94. P. 2306–2311.
33. Elsliger M.A., Wachter R.M., Hanson G.T., Kallio K., Remington S.J. // *Biochemistry*. 1999. V. 38. P. 5296–5301.
34. Poburko D., Santo-Domingo J., Demaurex N. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 11672–11684.
35. Wang W., Fang H., Groom L., Cheng A., Zhang W., Liu J., Wang X., Li K., Han P., Zheng, J. Yin M., Mattson M.P., Kao J.P., Lakatta E.G., Sheu S.S., Ouyang K., Chen J., Dirksen R.T., Cheng H. // *Cell*. 2008. V. 134. P. 279–290.
36. Muller F.L. // *Free Radic. Biol. Med.* 2009. V. 47. P. 1779–1780.
37. Schwarlander M., Logan D.C., Fricker M.D., Sweetlove L.J. // *Biochem. J.* 2011. V. 437. P. 381–387.
38. Schwarlander M., Murphy M.P., Duchon M.R., Logan D.C., Fricker M.D., Halestrap A.P., Muller F.L., Rizzuto R., Dick T.P., Meyer A.J., Sweetlove L.J. // *Trends Cell Biol.* 2012. V. 22. P. 503–508.
39. Quatresous E., Legrand C., Pouvreau S. // *J. Gen. Physiol.* 2012. V. 140. P. 567–570.
40. Ostergaard H., Henriksen A., Hansen F.G., Winther J.R. // *EMBO J.* 2001. V. 20. P. 5853–5862.
41. Ostergaard H., Tachibana C., Winther J.R. // *J. Cell. Biol.* 2004. V. 166. P. 337–345.
42. Dooley C.T., Dore T.M., Hanson G.T., Jackson W.C., Remington S.J., Tsien R.Y. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 22284–22293.
43. Hanson G.T., Aggeler R., Oglesbee D., Cannon M., Capaldi R.A., Tsien R.Y., Remington S.J. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 13044–13053.
44. Gutsch M., Pauleau A.L., Marty L., Brach T., Wabnitz G.H., Samstag Y., Meyer A.J., Dick T.P. // *Nat. Methods*. 2008. V. 5. P. 553–559.
45. Meyer A.J., Brach T., Marty L., Kreye S., Rouhier N., Jacquot J.P., Hell R. // *Plant J.* 2007. V. 52. P. 973–986.
46. Bjornberg O., Ostergaard H., Winther J.R. // *Biochemistry*. 2006. V. 45. P. 2362–2371.
47. Morgan B., Sobotta M.C., Dick T.P. // *Free Radic. Biol. Med.* 2012. V. 51. P. 1943–1951.
48. Gutsch M., Sobotta M.C., Wabnitz G.H., Ballikaya S., Meyer A.J., Samstag Y., Dick T.P. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. P. 31532–31540.
49. Lee S.R., Kwon K.S., Kim S.R., Rhee S.G. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 15366–15372.
50. Lou Y.W., Chen Y.Y., Hsu S.F., Chen R.K., Lee C.L., Khoo K.H., Tonks N.K., Meng T.C. // *FEBS J.* 2008. V. 275. P. 69–88.
51. Winterbourn C.C. // *Nat. Chem. Biol.* 2008. V. 4. P. 278–286.
52. Delaunay A., Pflieger D., Barrault M.B., Vinh J., Toledano M.B. // *Cell*. 2002. V. 111. P. 471–481.
53. Ying W. // *Antioxid. Redox. Signal.* 2008. V. 10. P. 179–206.
54. Bruzzone S., Kunerth S., Zocchi E., De Flora A., Guse A.H. // *J. Cell. Biol.* 2003. V. 163. P. 837–845.
55. De Flora A., Zocchi E., Guida L., Franco L., Bruzzone S. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2004. V. 1028. P. 176–191.
56. Guse A.H. // *FEBS J.* 2005. V. 272. P. 4590–4597.
57. Higashida H., Hashii M., Yokoyama S., Hoshi N., Asai K., Kato T. // *J. Neurochem.* 2001. V. 76. P. 321–331.
58. Inoue T., Hiratsuka M., Osaki M., Oshimura M. // *Cell Cycle*. 2007. V. 6. P. 1011–1018.
59. Lowry O.H., Passonneau J.V., Schulz D.W., Rock M.K. // *J. Biol. Chem.* 1961. V. 236. P. 2746–2755.
60. Zerez C.R., Lee S.J., Tanaka K.R. // *Anal. Biochem.* 1987. V. 164. P. 367–373.
61. Schneckenburger H., Wagner M., Weber P., Strauss W.S., Sailer R. // *J. Fluoresc.* 2004. V. 14. P. 649–654.
62. Liang B., Petty H.R. // *J. Cell Physiol.* 1992. V. 152. P. 145–156.
63. Pan L., Zhang X., Song K., Tang B., Cai W., Wu X., Rupp R.A., Xu J. // *Appl. Opt.* 2009. V. 48. P. 1042–1046.

64. *Piston D.W., Masters B.R., Webb W.W.* // J. Microsc. 1995. V. 178. P. 20–27.
65. *Rocheleau J.V., Head W.S., Piston D.W.* // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 31780–31787.
66. *Huang S., Heikal A.A., Webb W.W.* // Biophys. J. 2002. V. 82. P. 2811–2825.
67. *Patterson G.H., Knobel S.M., Arkhammar P., Thastrup O., Piston D.W.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2000. V. 97. P. 5203–5207.
68. *Kasischke K.A., Vishwasrao H.D., Fisher P.J., Zipfel W.R., Webb W.W.* // Science. 2004. V. 305. P. 99–103.
69. *Yu Q., Heikal A.A.* // J. Photochem. Photobiol. B. 2009. V. 95. P. 46–57.
70. *Lisby S., Gniadecki R., Wulf H.C.* // Exp. Dermatol. 2005. V. 14. P. 349–355.
71. *Gniadecki R., Thorn T., Vicanova J., Petersen A., Wulf H.C.* // J. Cell Biochem. 2000. V. 80. P. 216–222.
72. *Hopt A., Neher E.* // Biophys. J. 2001. V. 80. P. 2029–2036.
73. *Patterson G.H., Piston D.W.* // Biophys. J. 2000. V. 78. P. 2159–2162.
74. *Brekasis D., Paget M.S.B.* // EMBO J. 2003. V. 22. P. 4856–4865.
75. *Sickmier E. A., Brekasis D., Paranawithana S., Bonanno J.B., Paget M.S.B., Burley S.K., Kielkopf C.L.* // Structure. 2005. V. 13. P. 43–54.
76. *McLaughlin J.K., Strain-Damerell C.M., Xie K., Brekasis D., Soares A.S., Paget M.S.B., Kielkopf C.L.* // Mol. Cell. 2010. V. 38. P. 563–575.
77. *Wang E., Bauer M.C., Rogstam A., Linse S., Logan D.T., Wachenfeldt C.* // Mol. Microbiol. 2008. V. 69. P. 466–478.
78. *Hung Y.P., Albeck J.G., Tantama M., Yellen G.* // Cell Metab. 2011. V. 14. P. 545–554.
79. *Zhao Y., Jin J., Hu Q., Zhou H.M., Yi J., Yu Z., Xu L., Wang X., Yang Y., Loscalzo J.* // Cell Metab. 2011. V. 14. P. 555–566.
80. *Bilan D.S., Matlashov M.E., Gorokhovatsky A.Y., Schultz C., Enikolopov G., Belousov V.V.* // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1840. P. 951–957.
81. *Veech R.L., Eggleston L.V., Krebs H.A.* // Biochem. J. 1969. V. 115. P. 609–619.
82. *Pollak N., Dolle C., Ziegler M.* // Biochem. J. 2007. V. 402. P. 205–218.
83. *Reiss P.D., Zuurendonk P.F., Veech R.L.* // Anal. Biochem. 1984. V. 140. P. 162–171.
84. *Kolossov V.L., Spring B.Q., Sokolowski A., Conour J.E., Clegg R.M., Kenis P.J., Gaskins H.R.* // Exp. Biol. Med. (Maywood). 2008. V. 233. P. 238–248.
85. *Kolossov V.L., Spring B.Q., Clegg R.M., Henry J.J., Sokolowski A., Kenis P.J., Gaskins H.R.* // Exp. Biol. Med. (Maywood). 2011. V. 236. P. 681–691.
86. *Kolossov V.L., Leslie M.T., Chatterjee A., Sheehan B.M., Kenis P.J., Gaskins H.R.* // Exp. Biol. Med. (Maywood). 2012. V. 237. P. 652–662.
87. *Enyedi B., Zana M., Donko A., Geiszt M.* // Antioxid. Redox. Signal. 2013. V. 19. P. 523–534.
88. *Meyer A.J., Dick T.P.* // Antioxid. Redox. Signal. 2010. V. 13. P. 621–650.
89. *Miller E.W., Dickinson B.C., Chang C.J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2010. V. 107. P. 15681–15686.
90. *Markvicheva K.N., Bogdanova E.A., Staroverov D.B., Lukyanov S., Belousov V.V.* // Methods Mol. Biol. 2008. V. 476. P. 79–86.
91. *Riquelme D., Alvarez A., Leal N., Adasme T., Espinoza I., Valdes J.A., Troncoso N., Hartel S., Hidalgo J., Hidalgo C., Carrasco M.A.* // Antioxid. Redox. Signal. 2011. V. 14. P. 1245–1259.
92. *Espinosa A., Garcia A., Hartel S., Hidalgo C., Jaimovich E.* // J. Biol. Chem. 2009. V. 284. P. 2568–2575.
93. *Wu R.F., Ma Z., Liu Z., Terada L.S.* // Mol. Cell. Biol. 2010. V. 30. P. 3553–3568.
94. *Jiang J., Maeda A., Ji J., Baty C.J., Watkins S.C., Greenberger J.S., Kagan V.E.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2011. V. 412. P. 55–60.
95. *Ungvari Z., Labinsky N., Mukhopadhyay P., Pinto J.T., Bagi Z., Ballabh P., Zhang C., Pacher P., Csiszar A.* // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2009. V. 297. P. H1876–1881.
96. *Go Y.M., Duong D.M., Peng J., Jones D.P.* // J. Proteomics Bioinform. 2011. V. 4. P. 196–209.
97. *Mishina N.M., Bogeski I., Bolotin D.A., Hoth M., Niemeyer B.A., Schultz C., Zagaynova E.V., Lukyanov S., Belousov V.V.* // Antioxid. Redox. Signal. 2012. V. 17. P. 505–512.
98. *Niethammer P., Grabher C., Look A.T., Mitchison T.J.* // Nature. 2009. V. 459. P. 996–999.
99. *Pase L., Layton J.E., Wittmann C., Ellett F., Nowell C.J., Reyes-Aldasoro C.C., Varma S., Rogers K.L., Hall C.J., Keightley M.C., Crosier P.S., Grabher C., Heath J.K., Renshaw S.A., Lieschke G.J.* // Curr. Biol. 2012. V. 22. P. 1818–1824.
100. *Love N.R., Chen Y., Ishibashi S., Kritsiligkou P., Lea R., Koh Y., Gallop J.L., Dorey K., Amaya E.* // Nat. Cell. Biol. 2013. V. 15. P. 222–228.
101. *Bieker S., Riester L., Stahl M., Franzaring J., Zentgraf U.* // J. Integr. Plant. Biol. 2012. V. 54. P. 540–554.
102. *Knoefler D., Thamsen M., Konieczek M., Niemuth N.J., Diederich A.K., Jakob U.* // Mol. Cell. 2012. V. 47. P. 767–776.
103. *Albrecht S.C., Barata A.G., Grosshans J., Teلمان A.A., Dick T.P.* // Cell Metab. 2012. V. 14. P. 819–829.
104. *Fujikawa M., Kobayashi K., Kozawa T.* // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. P. 35702–35708.
105. *Gardner P.R.* // Biosci. Rep. 1997. V. 17. P. 33–42.
106. *Gardner P.R., Fridovich I.* // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 8757–8763.

Genetically Encoded Fluorescent Redox Sensors

D. S. Bilan^{*, **, #}, S. A. Lukyanov^{*, **, #}, V. V. Belousov^{*, **, #}

[#]Phone: +7 (499) 724-84-66; e-mail: d.s.bilan@gmail.com

^{*} Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

^{**} Nizhny Novgorod State Medical Academy, Ministry of Healthcare of Russia,
pl. Minin and Pozharsky 10/1, Nizhny Novgorod, 603005 Russia

Redox processes play a key role in cells of all organisms. These processes imply directed flows of electrons via so-called redox pairs: substances that exist in both reduced and oxidized states simultaneously within the cell. Examples of redox pairs are NAD^+/NADH , $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, $\text{GSSG}/2\text{GSH}$. Until recently, studies of redox processes in the living cells were challenged by the lack of suitable methods. Genetically encoded fluorescent biosensors provide a new way to study biological processes including redox ones. Biosensors allow real-time detection of messengers, metabolites and enzymatic activities in living systems of different complexity from cultured cells to transgenic animals. In this review, we describe the main types of known redox biosensors with examples of their use.

Keywords: genetically encoded fluorescent redox biosensors, reactive oxygen species, $2\text{GSH}/\text{GSSG}$, NAD^+/NADH