

## Флуорогенный биосенсор для детекции пероксида водорода

Научный руководитель – Белоусов Всеволод Вадимович

Смолярова Дарья Дмитриевна

Студент (бакалавр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра биохимии, Москва, Россия

E-mail: [dasha@smolyarova.ru](mailto:dasha@smolyarova.ru)

Пероксид водорода относится к активным формам кислорода (АФК), избыток которых вызывает окислительный стресс клетки. Однако показано, что небольшие количества  $H_2O_2$  могут выступать в качестве вторичного мессенджера, модифицируя белки и изменяя таким образом их активность [1]. Для того, чтобы исследовать распространение  $H_2O_2$  внутри клетки, используют синтетические красители (например, 2,7-дихлородигидрофлуоресцин, который становится флуоресцентным при окислении  $H_2O_2$ ), но большинство из них окисляется другими видами АФК и взаимодействует с окислителем необратимо, что ограничивает применение таких систем *in vivo*. Помимо синтетических красителей используют генетически-кодируемые биосенсоры на основе флуоресцентных белков, похожих по структуре на зеленый флуоресцентный белок (GFP). Биосенсоры имеют важное преимущество - они синтезируются клеткой самостоятельно и обладают высокой селективностью по отношению к аналиту, поэтому было создано несколько поколений биосенсоров HyPer [2]. Биосенсоры HyPer состоят из двух частей: бактериального транскрипционного фактора OxyR и флуоресцентного ядра (GFP-подобного белка), характер флуоресценции которого меняется в ответ на обратимое окисление цистеинов OxyR.

В качестве альтернативы GFP-подобным белкам можно использовать принципиально другие флуоресцентные ядра для сенсоров - флуорогенные белки, требующие внешнего хромофора, который проявляет флуоресцентные свойства только в комплексе с флуорогенным белком. Таким образом, для одного и того же белка можно использовать нетоксичные флуорогенные красители с различными спектральными свойствами в зависимости от условий эксперимента, проводить исследования в анаэробных условиях, так как для созревания хромофора не нужен кислород, а способность к быстрому обмену хромофора обеспечит возобновляемый фотостабильный сигнал. Потенциально такая система обладает большей контрастностью, так как можно добиться минимальной флуоресценции в отсутствие  $H_2O_2$  (что невозможно при использовании GFP-подобных белков), это позволит использовать сенсор для эффективного изучения распределения  $H_2O_2$  в клетке при микроскопии субдифракционного разрешения.

По итогам настоящей работы нам удалось создать флуорогенный биосенсор, который способен взаимодействовать с GFP-подобными хромофорами, обладающими флуоресценцией в зеленой и красной областях спектра. Мы проанализировали некоторые свойства биосенсора *in vivo* и *in vitro* и определили, что биосенсор способен к быстрому, обратимому и селективному окислению с десятикратным увеличением флуоресценции в ответ на физиологические концентрации  $H_2O_2$ .

### Источники и литература

- 1 Veal et al., Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling // Molecular Cell. 2007, V. 26, p. 1-14
- 4 Lukyanov K.A., Belousov V.V. Genetically encoded fluorescent redox sensors // Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj. 2014. V. 1840. p. 745–756.