

**Использование генетически кодируемого биосенсора перекиси водорода HyPer для определения эффективности работы тиол-восстанавливающих ферментативных систем в клетках K562**

**Научный руководитель – Люблинская Ольга Геннадьевна**

**Журавлев Андрей Дмитриевич**

*Студент (бакалавр)*

Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: 2andrezh@gmail.com*

Перекись водорода образуется в клетке в процессе метаболизма молекулярного кислорода и участвует в регуляции важнейших метаболических и сигнальных путей, окисляя тиольные группы регуляторных белков [2]. Тиоредоксин- и глутаредоксин-зависимые ферментативные системы контролируют восстановление окисленных тиолов, поддерживая внутриклеточный редокс-гомеостаз. Работе обеих систем посвящено много исследований *in vitro* и *in vivo*, однако распределение ролей между этими ферментативными путями и их поведение внутри живой клетки до сих пор требует более пристального анализа.

В данной работе предлагается использовать генетически кодируемый биосенсор перекиси водорода HyPer в качестве флуоресцентного репортера, характеризующего эффективность работы тиол-восстанавливающих ферментативных систем в живых клетках. HyPer является химерным белком, который получен путем внедрения желтого флуоресцентного белка (сrYFP) в регуляторный домен OxyR, бактериального транскрипционного фактора, чувствительного к перекиси водорода [1]. Под действием  $H_2O_2$  происходит окисление тиольных групп домена OxyR, и он претерпевает конформационные изменения, которые влияют на структуру сrYFP и приводят к изменению флуоресцентных свойств биосенсора. Как правило, HyPer используют для оценки базального и индуцированного окислительным стрессом уровня  $H_2O_2$  в клетке [1]. Мы предлагаем использовать последовательное добавление к клеткам, экспрессирующим биосенсор, экзогенной перекиси водорода и элиминирующей её каталазы для анализа с помощью проточной цитометрии кинетики восстановления тиольных групп HyPer. Проводя подобные измерения на фоне различных агентов, ингибирующих/активирующих работу различных тиол-восстанавливающих ферментативных систем, можно изучать вклад этих систем в поддержание редокс-гомеостаза клеток.

С использованием предложенной методики мы проанализировали кинетику восстановления биосенсора в цитоплазме клеток K562 при ингибировании тиоредоксин- и глутаредоксин-зависимых ферментативных систем. Полученные результаты показали, что восстановление тиольных групп HyPer в цитоплазме K562 контролирует система тиоредоксина, однако при ингибировании тиоредоксин-зависимых путей, подключается и система глутатиона. Измерения константы скорости реакции восстановления биосенсора в физиологических условиях, а также в условиях окислительного стресса, индуцируемого синтетическим предшественником витамина К менадиолем, показали, что окислительная нагрузка на клетку приводит к быстрому истощению пула восстановленного тиоредоксина в клеточной цитоплазме и резкому снижению эффективности восстановления HyPer.

**Источники и литература**

- 1) Bilan D. S., Belousov V. V. HyPer Family Probes: State of the Art // Antioxidants and Redox Signaling. 2016. № 13 (24). С. 731–751.

- 2) Schieber M., Chandel N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress // Current Biology. 2014. T. 24. № 10. С. R453-62.