Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России) Федеральное государственное бюджетное учреждение науки ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Tyn

РУМЯНЦЕВ Константин Алексеевич

Константин / Декесевич

БЛИЖНЕИНФРАКРАСНЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ И БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ БИОМАРКЕРЫ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ФИТОХРОМОВ

03.01.03 – Молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научные руководители: Туроверов Константин Константинович доктор физико-математических наук, профессор

Верхуша Владислав Витальевич доктор биологических наук

оглавление

| ВВЕДЕНИЕ | 5 |
|--|----|
| Актуальность исследования | 5 |
| Цели и задачи | 6 |
| Научная новизна | 7 |
| Теоретическая и практическая значимость работы | 7 |
| Положения, выносимые на защиту | 7 |
| Апробация результатов работы | 8 |
| Публикации | |
| Финансовая поддержка | 10 |
| Личный вклад автора | 10 |
| 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 11 |
| 1.1. Ближнеинфракрасные флуоресцентные белки на основе бактериальных | |
| фитохромов | 11 |
| 1.1.1. Ближнеинфракрасное окно прозрачности тканей | 11 |
| 1.1.2. Бактериальные фитохромы | |
| 1.1.3. Постоянно флуоресцирующие белки | 15 |
| 1.1.4. Фотоактивируемые флуоресцентные белки | 17 |
| 1.1.5. Сенсоры белок-белковых взаимодействий | 18 |
| 1.2. Особенности создания ближнеинфракрасных белков на основе бактериальных | |
| фитохромов | 21 |
| 1.2.1. Влияние третичной структурны на свойства ближнеинфракрасных белков на | |
| основе бактериальных фитохромов | 21 |
| 1.2.2. Влияние фотофизических характеристик хромофоров на свойства | |
| ближнеинфракрасных белков на основе бактериальных фитохромов | 24 |
| 1.3. Применение ближнеинфракрасных флуоресцентных белков на основе | |
| бактериальных фитохромов | 26 |
| 1.3.1. Базовые методы флуоресцентного анализа | 26 |
| 1.3.1.1. Флуоресцентные биомаркеры | 26 |
| 1.3.1.2. Флуоресцентные метки целевых белков | 28 |
| 1.3.1.3. Флуоресцентные сенсоры | 28 |
| 1.3.2. Методы прижизненной визуализации процессов глубоко в тканях | 31 |
| 1.3.2.1. Флуоресцентная томография | 31 |
| 1.3.2.2. Измерение времени жизни флуоресценции | 32 |
| 1.3.2.3. Фотоакустика | 33 |

| 1.3.3. Методы флуоресцентного анализа для разных масштабов: от клеток до | |
|--|-------|
| целых организмов | 35 |
| 1.4. Достоинства и недостатки современных ближнеинфракрасных биомаркеров | |
| на основе бактериальных фитохромов | 36 |
| 1.5. Генетически кодируемые источники ближнеинфракрасной биолюминесценции | 39 |
| 1.5.1. Принцип и применение биолюминесценции | 39 |
| 1.5.2. Люциферазы, излучающие в видимом диапазоне спектра | 40 |
| 1.5.3. Ближнеинфракрасные люциферазы | 40 |
| 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ | 43 |
| 2.1. Материалы | 43 |
| 2.2. Методы | 44 |
| 2.2.1. Создание белковых конструктов | 44 |
| 2.2.1.1. Мутагенез и отбор клонов из бактериальных библиотек мутантов флуоресцен | гного |
| белка | 44 |
| 2.2.1.1.1. Случайный и сайт-специфический мутагенез | 44 |
| 2.2.1.1.2. Создание мутантов с короткими пептидными вставками | 45 |
| 2.2.1.2. Создание химерных белков | 46 |
| 2.2.2. Анализ белков in vitro | 46 |
| 2.2.2.1. Выделение и очистка белка | 46 |
| 2.2.2.2. Спектральные и физико-химические свойства | 47 |
| 2.2.2.3. Биохимические и физико-химические свойства бактериальных | |
| клеток-продуцентов мутантных форм GAF-FP | 50 |
| 2.2.3. Экспрессия белков в клетках млекопитающих | 51 |
| 2.2.3.1. Культивирование клеточных культур | 51 |
| 2.2.3.2. Трансфекция клеток | 52 |
| 2.2.3.3. Эпифлуоресцентная микроскопия | 52 |
| 2.2.3.4. Проточная цитофлуориметрия | 53 |
| 2.2.3.5. Создание стабильных клеточных линий | 54 |
| 2.2.3.6. Флуоресцентный и биолюминесцентный имиджинг | 54 |
| 2.2.3.6.1. Измерения в мышином фантоме | 54 |
| 2.2.3.6.2. Имиджинг клеток | 55 |
| 2.2.3.6.3. In vivo имиджинг | 56 |
| 2.2.3.6.4. <i>Ex viv</i> o имиджинг | 58 |
| 2.2.4. Расчёт оптических свойств биологических тканей | 58 |
| 2.2.5. Статистическая обработка данных | 60 |

| 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ | 61 |
|--|-----------|
| 3.1. Получение ближнеинфракрасного однодоменного мономерного | |
| флуоресцентного биомаркера на бактериального фитохрома | 61 |
| 3.1.1. Направленный мутагенез GAF домена бактериального фитохрома RpBphP1 | 61 |
| 3.1.2. Фотофизические свойства и связывание хромофоров GAF-FP | 63 |
| 3.1.3. Физико-химиеские и биохимические свойства GAF-FP | 67 |
| 3.1.4. Структура GAF-FP и ее устойчивость к пептидным вставкам | 71 |
| 3.1.5. Экспрессия GAF-FP в клетках млекопитающих | 73 |
| 3.2. Флуоресцентные и биолюминесцентные биомаркеры на основе бактериальных | |
| фитохромов | 76 |
| 3.2.1. Создание химерных белков на основе GAF-FP и RLuc8 | 76 |
| 3.2.2. Биолюминесцентный и флуоресцентный имиджинг GAF-FP—RLuc8 в | |
| мышином фантоме | 77 |
| 3.2.3. Создание химерных белков на основе iRFP670, iRFP720 и RLuc8 | 79 |
| 3.2.4. Выбор субстрата для фиолетовой биолюминесценции RLuc8 | 81 |
| 3.2.5. Многоцветный биолюминесцентный и флуоресцентный имиджинг клеток | |
| млекопитающих с использованием ближнеинфракрасных химерных люцифераз | |
| 3.2.6. Определение чувствительности биолюминесцентного и флуоресцентного | |
| имиджинга <i>in vivo</i> с использованием ближнеинфракрасных химерных люцифераз | |
| 3.2.7. Оптические свойства тканей млекопитающих | 90 |
| 3.2.8. Биолюминесцентный и флуоресцентный <i>in vivo</i> имиджинг кинетики роста | |
| раковых опухолей с использованием iRFP670—RLuc8 и iRFP720—RLuc8 | <u>92</u> |
| 3.2.9. Биолюминесцентный и флуоресцентный <i>in vivo</i> и <i>ex vivo</i> имиджинг | |
| метастаз раковых опухолей с использованием iRFP670—RLuc8 и iRFP720—RLuc8 | 94 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 99 |
| ВЫВОДЫ | 100 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ | 101 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | 103 |
| ПРИЛОЖЕНИЯ | 119 |
| БЛАГОДАРНОСТИ | 124 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

В медико-биологических исследованиях для наблюдения за процессами, происходящими в тканях животных, широко используются оптические методы исследования. Они позволяют неинвазивно собирать информацию о структуре и функциях организма и его систем. В настоящее время значительное внимание уделяется исследованиям с использованием генетически кодируемых флуоресцентных и биолюминесцентных биомаркеров, расширяющих границы применения оптических методов исследования благодаря новым возможностям наблюдения за объектами исследования в масштабах целого организма и на фоне множества параллельно происходящих процессов [1-4].

В связи с этим многие исследовательские группы заняты поиском новых биомаркеров, отвечающих потребности в прижизненном и неинвазивном исследовании биологических процессов, происходящих глубоко в тканях и органах. Большинство современных биомаркеров не обладают свойствами, необходимыми для проведения подобных исследований, поскольку они поглощают или излучают свет в видимом диапазоне спектра, в то время как ткани животных и особенно млекопитающих обладают наибольшей «прозрачностью» в ближней инфракрасной области спектра от 650 нм до 900 нм [5, 6]. Наиболее перспективным источником для создания ближнеинфракрасных флуоресцентных белков (FP) стали бактериальные фитохромы (BphP), использующие биливердин IX α (BV) в качестве хромофора [5, 7]. Естественный спектр поглощения BphP, смещенный в ближнюю инфракрасную область, и доступность BV в тканях млекопитающих сделали FP на их основе широко востребованными биомаркерами, позволяющими достичь высокой чувствительности визуализации молекулярно-биологических процессов в масштабах всего организма. Усилиями различных научных коллективов на основе BphP был получен ряд ярких ближнеинфракрасных FP, нашедших широкое применение [2, 8-10].

Олнако до последнего времени оставались нерешенными задачи создания ближнеинфракрасного мономерного биомаркера небольшого размера и генетически кодируемых источников яркой ближнеинфракрасной биолюминесценции. Склонность к димеризации является отличительной чертой BphP и необходима для их функционирования, но в то же время, передаваясь производным FP, она становится значительным недостатком. Необходимость участия двух доменов BphP в связывании хромофора также приводит к созданию ближнеинфракрасных FP с молекулярной массой в полтора раза большей, чем у GFP-подобных FP, что является существенным препятствием для успешного применения биомаркеров на основе BphP. Уменьшение размеров и улучшение биохимических характеристик ближнеинфракрасных FP позволило бы расширить их использование благодаря востребованности, например, в качестве репортеров активации генов или меток целевых белков.

В то же время несмотря на большое разнообразие пар люцифераза – субстрат, их спектры биолюминесценции не выходят за границы видимого диапазона спектра [4, 11], ограничивая возможности их применения в биомедицинских исследованиях. Недавний прогресс в создании химерных люцифераз, использующих резонансный перенос энергии, путем слияния люциферазы и GFP-подобных FP видимого спектрального диапазона, позволил увеличить яркость и спектральное разнообразие генетически кодируемых источников биолюминесценции [12, 13]. Тем не менее сдвиг спектров биолюминесценции химерных конструктов в ближнюю инфракрасную область невозможен с использованием приведенного подхода из-за отсутствия ярких ближнеинфракрасных GFP-подобных FP и необходимых для них эффективных доноров энергии. Широкий спектр поглощения ближнеинфракрасных FP на основе BphP позволил бы использовать яркие люциферазы синего и фиолетового диапазонов спектра в качестве доноров энергии, что привело бы к созданию ярких ближнеинфракрасных химерных люцифераз, которые расширили цветовое разнообразие и увеличили бы значительно чувствительность биолюминесцентного имиджинга тканей и органов животных. Решению этих задач и посвящена данная работа.

Цели и задачи

<u>Целью</u> работы являлось получение однодоменных мономерных флуоресцентных биомаркеров, а также биолюминесцентных биомаркеров на основе бактериальных фитохромов с максимумами эмиссии в ближней инфракрасной области спектра, обладающих яркой флуоресценцией или биолюминесценцией и предназначенных для визуализации молекулярнобиологических процессов в клетках, тканях и органах животных. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие <u>задачи</u>:

- Методами молекулярного клонирования, случайного и сайт-специфического мутагенеза на основе гена бактериального фитохрома создать яркий однодоменный мономерный флуоресцентный биомаркер, флуоресцирующий в ближней инфракрасной области с максимумом спектра более 650 нм, и сравнить его характеристики с существующими ближнеинфракрасными флуоресцентными биомаркерами.
- Определить механизм и условия связывания хромофоров в новом однодоменном флуоресцентном биомаркере.
- На основе нового однодоменного флуоресцентного белка и разработанных ранее ближнеинфракрасных флуоресцентных белков серии iRFP получить ближнеинфракрасные химерные люциферазы, способные к биолюминесценции с длиной волны максимума более 650 нм.

6

 Проанализировать возможность практического использования ближнеинфракрасных химерных люцифераз в клеточной биологии и биомедицине на модели рака молочной железы мышей.

Научная новизна

Впервые показано, что возможно создание мономерного ближнеинфракрасного флуоресцентного биомаркера на основе GAF домена бактериального фитохрома.

Показано, что мономерный ближнеинфракрасный флуоресцентный биомаркер GAF-FP способен связывать BV и PCB в качестве хромофоров даже в отсутствие кислорода.

Впервые показан резонансный перенос энергии в химерных белках на основе RLuc8 и ближнеинфракрасных биомаркеров (GAF-FP, iRFP670 и iRFP720) между возбужденным состоянием целентеразин-подобного субстрата RLuc8 (ProlumePurple) и биливердином с переводом последнего в возбужденное состояние, отвечающее коротковолновой полосе поглощения, и возникновением в конечном итоге ближнеинфракрасной биолюминесценции.

Показано, что ближнеинфракрасная химерная люцифераза iRFP720—RLuc8 имеет наиболее длинноволновый максимум эмиссии биолюминесценции среди известных к настоящему времени генетически кодируемых биолюминесцентных маркеров.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработан молекулярно-биологический подход, позволяющий осуществлять разработку ближнеинфракрасных однодоменных мономерных флуоресцентных биомаркеров на основе GAF домена бактериальных фитохромов.

Обнаружена возможность резонансного переноса энергии от возбужденного состояния целентеразин-подобного субстрата RLuc8 (ProlumePurple) к биливердину, с переводом последнего в возбужденное состояние, отвечающее коротковолновой полосе поглощения.

Разработанные в настоящем исследовании ближнеинфракрасные химерные люциферазы на основе RLuc8 и ближнеинфракрасных биомаркеров (iRFP670 и iRFP720) могут быть использованы для практического применения в биолюминесцентном имиджинге клеток, тканей и органов животных в биомедицинских исследованиях, включая процесс разработки диагностирования и лечения раковых заболеваний.

Положения, выносимые на защиту

 Ближнеинфракрасный однодоменный флуоресцентный биомаркер GAF-FP совмещает стерическое и ковалентное связывание биливердина и фикоцианобилина с образованием холобелка, обладающего спектрами поглощения, возбуждения флуоресценции и флуоресценции, характерными для ближнеинфракрасных флуоресцентных белков на основе бактериальных фитохромов.

- 2. Аминокислотный остаток цистеина в положении 110 аминокислотной последовательности GAF-FP ответственен за ковалентное связывание биливердина и фикоцианобилина как в аэробных, так и в анаэробных условиях.
- 3. На основе на основе модифицированной люциферазы *Renilla reniformis* (RLuc8) и ближнеинфракрасных биомаркеров (GAF-FP, iRFP670 и iRFP720) получены и охарактеризованы ближнеинфракрасные химерные люциферазы, обладающие яркой биолюминесценцией.
- 4. Ближнеинфракрасная флуоресценция и биолюминесценция химерных люцифераз iRFP670—RLuc8 и iRFP720—RLuc8 позволяет проводить одновременный двухцветный мониторинг и продолжительные неинвазивные исследования роста и метастазирования опухолей *in vivo* и *ex vivo*, с возможностью количественного анализа метастазировавших клеток.

Апробация результатов работы

Апробация диссертационной работы состоялась 23 июня 2016 года на совместном научном семинаре Лаборатории структурной динамики, стабильности и фолдинга белков, Лаборатории молекулярных основ клеточной подвижности и Лаборатории клеточной патологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук. Результаты работы были представлены на 59-м ежегодном съезде Американского биофизического общества (7-11 февраля 2015 г., Балтимор, штат Мэриленд, США); на международном съезде, посвященном передовой микроскопии «Super-resolution in different dimensions» (2-3 июня 2015 г., Москва, Россия); на всероссийской конференции «Фотосинтез и фотобиотехнология: фундаментальные и прикладные аспекты» (1-6 июня 2015 г., Пущино, Россия).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ в отечественных и зарубежных рецензируемых изданиях (4 статьи и 6 тезисов).

Статьи в рецензируемых журналах:

- Rumyantsev, K.A. Minimal domain of bacterial phytochrome required for chromophore binding and fluorescence / K.A.Rumyantsev, D.M.Shcherbakova, N.I.Zakharova, A.V.Emelyanov, K.K.Turoverov, V.V.Verkhusha // Scientific Reports. - 2015. - N 5:18348. - P.1-10.
- Румянцев, К.А. Получение ближнеинфракрасного однодоменного флуоресцентного белка GAF-FP на основе бактериального фитохрома / К.А.Румянцев, Д.М.Щербакова, Н.И.Захарова, А.В.Емельянов, К.К.Туроверов, В.В.Верхуша // Цитология. - 2016. - Т. 58. N 10. - С.744-754.

8

- Осипов, Л.В. Заглянуть в человека: визуализация в медицине / Л.В.Осипов, М.Б.Долгушин, А.И.Михайлов, Б.З.Эпель, К.А.Румянцев, К.К.Туроверов, В.В.Верхуша, Е.Ю.Куликова // Вестник РГМУ. - 2016. - N 4. - C.4-14.
- Rumyantsev, K.A. Near-infrared bioluminescent proteins for two-color multimodal studies / K.A.Rumyantsev, K.K.Turoverov, V.V.Verkhusha // Scientific Reports. - 2016. - N 6:36588. -P.1-10.

Тезисы:

- Rumyantsev, K.A. Engineering of a single domain of bacterial phytochrome into a small nearinfrared fluorescent protein / K.A.Rumyantsev, D.M.Shcherbakova, K.K.Turoverov, V.V.Verkhusha // Biophysical Society 59th Annual Meeting, Baltimore, Maryland. - 2015. -Addendum and Late Abstracts Listing. - P.19.
- Rumyantsev, K.A. A small near-infrared fluorescent protein developed from a single domain of bacterial phytochrome / K.A.Rumyantsev, D.M.Shcherbakova, N.I.Zakharova, K.K.Turoverov, V.V.Verkhusha // Super-resolution in different dimensions, Moscow. - 2015. - Program and Abstracts. - P.77.
- 3. Румянцев, К.А. Ближне-инфракрасный однодоменный флуоресцентный белок на основе бактериального фитохрома / К.А.Румянцев, Д.М.Щербакова, Н.И.Захарова, К.К.Туроверов // Всероссийская В.В.Верхуша, конференция «Фотосинтез И фотобиотехнология: Фундаментальные и прикладные аспекты.» Пущино. - 2015. -Сборник тезисов. - С.78.
- 4. Румянцев, К.А. Создание однодоменного ближне-инфракрасного флуоресцентного белка на основе бактерильного фитохрома / К.А.Румянцев, Д.М.Щербакова, Н.И.Захарова, В.В.Верхуша, К.К.Туроверов // V съезд биофизиков Росси. Ростов на Дону. 2015. Материалы докладов. N 1. С.182.
- Rumyantsev, K.A. New molecular evolution pathway for developing of small single domain near-infrared fluorescent proteins based on bacterial phytochromes / K.A.Rumyantsev, D.M.Shcherbakova, N.I.Zakharova, K.K.Turoverov, V.V.Verkhusha // Proceedings of the 7th European Conference on Biology and Medical Sciences, Vienna. - 2015. - Biological sciences, Section 1. - P.8.
- Румянцев, К.А. Новый ближне-инфракрасный однодоменный флуоресцентный биомаркер на основе бактериального фитохрома / К.А.Румянцев, Д.М.Щербакова, Н.И.Захарова // Современные тенденции развития науки и технологий, Белгород. - 2015. - Сборник научных трудов по материалам III Международной научно-практической конференции. -С.32.

Финансовая поддержка

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума Российской Академии наук «Молекулярная и клеточная биология» (грант К.К. Туроверова) и Национальных институтов здоровья США (гранты CA164468, GM073913 и GM108579 В.В. Верхуши).

Личный вклад автора

Все экспериментальные процедуры, описанные в работе, проведены автором лично. Материалы, вошедшие в представленную работу, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научными руководителями.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Ближнеинфракрасные флуоресцентные белки на основе бактериальных фитохромов 1.1.1. Ближнеинфракрасное окно прозрачности тканей

Электромагнитное излучение ультрафиолетового (от 200 до 400 нм), видимого (от 400 до 700 нм) и ближнего инфракрасного (от 700 до 1400 нм) диапазонов традиционно называется светом [14]. Биологические ткани, равно как и большинство окружающих нас веществ, непрозрачны для света в результате его поглощения и рассеяния молекулами среды [15]. В биологических тканях присутствие таких веществ, как гемоглобин, вода, липиды, коллаген и меланин, вносит основной вклад в поглощение света, в то время как размер и сложность структуры клеток и их внутриклеточных компонентов (например, ядра, митохондрий, аппарата Гольджи и др.) определяют величину светорассеяния [16, 17]. В видимом и инфракрасном диапазонах света значения коэффициента светорассеяния, лежащие в пределах от 5 до 30 см⁻¹. существенно превышают усредненные значения коэффициента поглощения, лежащие в лиапазоне от 0.02 до 2 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ [18]. Значительное поглошение света гемоглобином в области менее 600 нм и поглощение света водой в области более 1100 нм ограничивают проницаемость тканей вне границ этого диапазона до нескольких миллиметров. В то же время в так называемом ближнеинфракрасном окне прозрачности биологических тканей от 650 до 900 нм поглощение света в большинстве случаев остается достаточно низким (менее 0.2 M⁻¹·см⁻¹), а светорассеяние снижено по сравнению с видимым диапазоном (рис. 1). Сочетание этих факторов позволяет свету ближнего инфракрасного диапазона проникать на глубину нескольких сантиметров и предоставляет возможность использовать его для неинвазивных исследований объектов, расположенных на относительно большей глубине.

Наиболее перспективными источником для разработки флуоресцентных биомаркеров, использующих преимущества ближнеинфракрасного окна прозрачности тканей, стали бактериальные фитохромы (BphP от англ. <u>b</u>acterial <u>p</u>hytochrome <u>p</u>hotoreceptors), максимумы поглощения спектров которых находятся в ближнеинфракрасной области спектра.



Рисунок 1 Спектры поглощения основных компонентов биологических тканей в видимой и инфракрасной областях спектра [19]. *Красная кривая* – поглощения оксигемоглобина. *Синяя кривая* – поглощение гемоглобина. *Жёлтая кривая* – поглощения липидов мембран. Зеленая кривая – поглощение воды.

1.1.2. Бактериальные фитохромы

Фитохромы являются белками, отвечающими за восприятие организмом света. Они встречаются в грибах, растениях, бактериях и цианобактериях [20-22]. В фитохромах процесс фоторецепции происходит за счет обратимых конформационных изменений в ковалентно присоединенном хромофоре, индуцируемых светом определённых длин волн и передаваемых затем через структуру белка к эффекторному домену [23]. Хромофорами фитохромов являются линейные тетрапирролы, или билины, такие как биливердин IXα (BV от англ. biliverdin) у BphP, фикоцианобилин (PCB от англ. phycocianobilin) у фитохромов цианобактерий (рис. 2) и др [20, 21]. Большинство линейных тетрапирролов является продуктом метаболизма гема. BV синтезируется из гема при участии всего лишь одного фермента – гемоксигеназы, которая часто закодирована в геноме бактерий в том же опероне, что и фитохром [24-26]. Более того, ВV, в отличие от других линейных тетрапирролов, в достаточно больших количествах синтезируется в тканях млекопитающих [27]. Это определяет возможность использования BphP и белков на их основе в качестве биомаркеров для биомедицинских исследований без экспрессии гемоксигеназы или введения экзогенного хромофора для биомедицинских исследований. Как уже было отмечено, BphP также обладают естественным спектром поглощения, сдвинутым в ближнюю инфракрасную область спектра по сравнению с другими типами фитохромов.



Рисунок 2 Химическая структура хромофоров фитохромов [28]. А – фикоцианобилин (РСВ). Б – биливердин IXα (BV). *Латинскими буквами* обозначены пиррольные кольца билинов.

Анализ кристаллических структур и аминокислотных последовательностей BphP, фитохромов растений и цианобактерий позволил выделить их основные структурные элементы. Общим для большинства фитохромов является фотосенсорный модуль, представленный PAS (от англ. акронима <u>Per-ARNT-Sim</u>), GAF (от англ. акронима c<u>G</u>MP phosphodiesterase/adenylate cyclase/<u>FhlA</u>) и PHY (от англ. <u>phy</u>tochrome-specific) доменами, соединёнными α -спиральными линкерными участками [20, 21, 29-33]. Фотосенсорный модуль, согласно своему названию, отвечает за восприятие сигнала путем изменения его третичной структуры и передает конформационные изменения на эффекторный домен, который может быть представлен гистидиновой киназой, GGDEF/EAL, PAS/PAC или PAS9 доменами [21, 34-36]. В связывании хромофора BphP участвуют только PAS и GAF домены (рис. 3). Хромофор, удерживаемый в кармане GAF домена, автокаталитически ковалентно связывается с консервативным остаток цистеина на N-концевом пептиде PAS домена [37, 38]. Основные взаимодействии между хромофором и белком происходят в GAF домене, в то время как PHY домен защищает BV от молекул растворителя. α -спирали GAF домен же могут участвовать в образовании гомодимеров BphP [29, 39, 40].

Фотофизические свойства BphP напрямую связаны с выполняемой ими функцией фоторецепции. BphP могут находиться в двух состояниях, называемых Pr и Pfr (puc. 4). В темноте большинство BphP находятся в Pr состоянии, отвечающему поглощению в диапазоне длин волн от 690 до 710 нм. На свету BphP обратимо переходят в Pfr состояние, отвечающее поглощению в диапазоне длин волн от 740 до 760 нм. У большинства BphP Pr состояние отвечает основной неактивной форме, однако некоторые BphP, называемые «bathy» BphP, в темноте находятся в Pfr состоянии [25, 32, 41]. Помимо полосы поглощения в ближнеинфракрасной области спектра BphP также имеют полосу поглощения в фиолетовой области с максимумом при 380 нм (рис. 4).

Согласно правилу Каша, согласно которому переход из возбужденного состояния в основное с излучением фотона всегда происходит с низшего возбуждённого уровня, возбуждение любой из двух полос поглощения Pr состояния BphP вызывает появление ближнеинфракрасной флуоресценции с максимумом в диапазоне длин волн от 700 до 720 нм [8, 38, 42, 43]. Флуоресценция BphP в Pfr состоянии на настоящий момент не была зафиксирована, вероятно, в силу чрезвычайно короткого (субпикосекундного) времени жизни возбужденного состояния и, соответственно, незначительного квантового выхода [44].



Рисунок 3 Структура *Rhodopseudomonas palustris Rp*BphP1 со связанным BV [6, 35]. А – упрощенное изображение доменов *Rp*BphP1 и его ковалетно связанного хромофора. Б – пространственная структура PAS и GAF доменов *Rp*BphP1 на основе данных рентгеноструктурного анализа (Protein Data Bank: 4GW9). PAS и GAF домены окрашены в *фиолетовый* и *серый цвета*, соответственно.



Рисунок 4 Спектры поглощения *Rp*BphP1 в Pr и Pfr состояниях [45].

Процесс фотопереключения BV из Pr состояния в Pfr состояние под действием дальнекрасного света, если Pr состояние является основным, включает в себя вращение пиррольного кольца D вокруг метиновой группы между пиррольными кольцами C и D (рис. 2). Обратное переключение из Pfr в Pr может происходить либо относительно медленно до нескольких часов в процессе безызлучательной тепловой релаксации, либо быстро под действием ближнеинфракрасного света [23, 33]. Во время вращения кольца D хромофор может находится в различных метастабильных состояниях, а также участвовать в переносе протона. Удаление PHY домена или аминокислотных остатков на N-конце PAS домен приводит к потере хромофором способности находиться в Pfr состоянии [29, 38]. Ведение аминокислотных замен в PAS и GAF домены может существенно влиять на такие фотофизические процессы в BphP, как скорость и эффективность переключения между Pr и Pfr состояниями, стабильность этих состояний, квантовый выход флуоресценции [38, 43, 44, 46, 47], а также на нефотофизические переходы, например, темновую релаксацию [29, 32, 39].

1.1.3. Постоянно флуоресцирующие белки

Создание флуоресцентных биомаркеров на основе зеленого флуоресцентного белка (GFP от англ. green fluorescent protein) сформировало мощный инструментарий для исследований в области молекулярной и клеточной биологии [1, 48, 49]. С увеличением потребности в изучении процессов, происходящих на уровне целого организма или глубоко в его тканях, возникла необходимость в создании флуоресцентных биомаркеров, способных наиболее эффективно использовать преимущества ближнеинфракрасного окна прозрачности тканей. Сниженные поглощение, рассеяние света и автофлуоресценция в этом диапазоне могли бы значительно увеличить чувствительность флуоресцентного имиджинга животных [50-53]. Однако фотофизические характеристики ближнеинфракрасных и дальнекрасных GFP-подобных FP обладают рядом значительных недостатков. Максимумы спектров возбуждения флуоресценции и флуоресценции ближнеинфракрасных GFP-подобных FP (например, eqFP670 [54], TagRFP657 [55], TagRFP675 [56], mCardinal [57], mNeptune681 и mNeptune684 [58]) не превосходят 684 нм, находясь на границе окна прозрачности тканей. Усредненная эффективная яркость ближнеинфракрасной флуоресценции GFP-подобных FP (зависящая от молекулярной яркости изучаемого FP, его уровня экспрессии и стабильности в клеточных культурах), остается относительно низкой или существенно снижается со смещением их спектров в ближнюю инфракрасную область [49, 57]. Сдвиг спектров флуоресценции GFP-подобных FP в дальнюю красную или ближнюю инфракрасную области спектра преимущественно достигается за счет увеличения Стоксова сдвига (спектрального сдвига между максимумами спектров возбуждения флуоресценции и флуоресценции), что требует возбуждения их флуоресценции в видимой области спектра. Наконец, нормальное распределение молекулярной яркости GFP-подобных FP, отложенной относительно максимумов их спектров флуоресценции, предполагает наличие фундаментального предела в фотофизических свойствах хромофоров GFP-подобных FP, препятствующего дальнейшему сдвигу их спектров в ближнюю инфракрасную область без

потери яркости [59, 60]. По этой причине в качестве основы для получения ярких ближнеинфракрасных FP вместо стали использоваться BphP.

Первый ближнеинфракрасный FP на основе BphP, названный IFP1.4, был получен в 2009 году из PAS и GAF доменов *Deinococcus radiodurans Dr*BphP. IFP1.4 имеет ближнеинфракрасные спектры возбуждения флуоресценции и флуоресценции с максимумами при 684 и 708 нм, соответственно (табл. А.1, рис. Б.1) [42]. Создание IFP1.4 заложило основу для нового класса ближнеинфракрасных флуоресцентных биомаркеров, однако наиболее важной вехой в развитии этой области послужило создание яркого и стабильного ближнеинфракрасного FP на основе PAS и GAF доменов *Rhodopseudomonas palustris Rp*BphP2 – iRFP713 (рис. Б.1) [8]. В сравнении с IFP1.4 максимум флуоресценции iRFP713 имеет больший сдвиг в ближнюю инфракрасную область, а также iRFP713 обладает более яркой флуоресценций как *in vitro*, так и *in vivo* не требуя введения экзогенного BV (табл. А.1). Благодаря своим уникальным свойствам iRFP713 стал стандартом для сравнения всех последующих ближнеинфракрасных FP. Тем не менее к немногочисленным недостаткам iRFP713 можно отнести его относительно большую молекулярную массу, чем у GFP-подобных FP, и склонность к гомодимеризации, унаследованную от BphP, что ограничивает применение iRFP713 в качестве метки для целевых белков.

В 2012 году был разработан новый ближнеинфракрасный FP на основе PAS и GAF доменов *Dr*BphP, названный Wi-Phy (рис. Б.1) [47]. Несмотря на то, что характеристики Wi-Phy не были изучены в клетках или *in vivo*, кристаллическая структура *Dr*BphP, полученная в этом исследовании, позволила провести глубокий анализ природы фотофизических процессов переключения BV хромофора, а также изучить его аминокислотное окружение.

В 2013 году на основе на основе PAS и GAF доменов *Rp*BphP2 и *Rp*BphP6 была получена серия ближнеинфракрасных iRFP, флуоресцирующих с максимумами при 670, 682, 702 и 720 нм (табл. А.1) [2]. По яркости флуоресценции и сродству к BV новые FP не уступают iRFP713, а значительные различия спектральные различия между iRFP позволили впервые провести многоцветный ближнеинфракрасный имиджинг *in vivo*.

В 2014 году методом направленного мутагенеза был разработан улучшенный вариант IFP1.4, названный IFP2.0 (рис. Б.1) [61]. IFP2.0 содержит несколько важных мутаций, которые увеличили яркость его флуоресценции и стабильность *in vitro*. (табл. А.1). Однако, несмотря на эти улучшения, IFP2.0, как и его предшественники, является димером и требует введения экзогенного BV или увеличения его синтеза внутри клеток при проведении *in vivo* экспериментов [62]. В том же году была получена кристаллическая структура IFP1.4, что предоставило возможность подробно проанализировать механизм флуоресценции ближнеинфракрасных FP на основе BphP и при помощи аминокислотных замен изменить время жизни возбужденного

состояния хромофора [63]. Увеличения этого параметра удалось достичь путем обратной мутации His207, расположенного в непосредственно близости от хромофора, и привело к увеличению квантового выхода на 1.7 % по сравнению с IFP1.4 (IFP1.4rev, рис. Б.1).

В последующие годы различные исследовательские группы сконцентрировали свои усилия на создании спектрально различных, ярких в клетках животных, но в то же время мономерных ближнеинфракрасных FP на основе BphP. Несмотря на то, что исходно FP серии IFP (рис. Б.1) считались мономерными согласно *in vitro* экспериментам, эти данные не нашли подтверждения в более поздних работах (табл. А.1) [61, 64]. В 2015 году был обнаружен *Bradyrhizobium sp. Br*BphP, имеющий ослабленное взаимодействие белков в димере, что позволило разработать на основе его PAS и GAF доменов два мономерных ближнеинфракрасных FP, названных mIFP и iBlueberry (рис. Б.1, табл. А.1) [62, 65]. Несмотря на то, что фотофизические характеристики FP серии mIFP, измеренные *in vitro*, сравнимы с характеристиками FP серии iRFP (табл. А.1), применение mIFP *in vivo* значительно затруднено из-за низкого сродства к BV и требует повышения естественной концентрации хромофора в клетках для достижения оптимальной яркости флуоресценции.

В то же время на основе PAS и GAF доменов RpBphP1 (рис. 3, Б) была получена серия спектрально различных ближнеинфракрасных мономерных белков miRFP, флуоресцирующих с максимумами при 670, 703 и 709 нм (рис. Б.1) [64]. В настоящее время они являются наиболее яркими мономерными биомаркерами как для многоцветной микроскопии высокого разрешения, так и визуализации молекулярно-биологических процессов на уровне целого организма согласно данным экспериментов *in vitro* и *in vivo* (табл. А1). В отличие от mIFP miRFP обладают высоким сродством к BV, расширяя их область применения *in vivo* в качестве биомаркеров.

1.1.4. Фотоактивируемые флуоресцентные белки

Подгруппа фотоактивируемых ближнеинфракрасных FP в настоящее время представлена только двумя спектрально различными PAiRFP (от англ. photoactivatable) PAS, GAF и PHY доменов *Agrobacterium tumefaciens C58 At*BphP2 (рис. Б.1) [9]. Наличие PHY домена позволило хромофору PAiRFP сохранить способность к фотопереключению, наблюдаемую у полноразмерных BphP, и тем самым переходить их неактивного нефлуоресцирующего состояния во флуоресцирующее под действием света с длиной волны порядка 660 нм (табл. А.1). Это исследование также пролило свет на механизм фотопереключения PAiRFP и BphP, благодаря анализу короткоживущих промежуточных состояний хромофора при его фотопереключении при низких температурах.

1.1.5. Сенсоры белок-белковых взаимодействий

Двухдоменная структура ближнеинфракрасных FP на основе BphP значительно облегчает создание сенсоров белок-белковых взаимодействий (P-PI от англ. protein-protein interactions), расширяя возможности метода бимолекулярной флуоресцентной комплементации (BiFC от англ. bimolecular fluorescence complementation) [66-68]. Принцип BiFC основывается на возникновении флуоресценции при восстановлении структуры полноценного FP в результате взаимодействия его разделенных частей, которые чаще всего представлены либо крупными структурированными участками FP, либо его доменами. В 2013 году на основе PAS и GAF доменов iRFP713, за счет их разделения и применения направленного мутагенеза, был разработан первый ближнеинфракрасный сенсор P-PI, названный iSplit (рис. Б.1) [9]. Он сохраняет яркость, стабильность и сродство к BV исходного белка при восстановлении структуры, а также позволяет визуализировать P-PI с высоким контрастом BiFC in vivo. Тем не менее процесс объединения двух доменов, как и у большинства сенсоров P-PI на основе GFP-подобных FP, является необратимым (табл. А2) [67, 69]. По этой причине для обнаружения повторяющихся P-PI iSplit полагается на деградацию уже комплементировавших комплексов. Создание iSplit открыло путь для разработки сенсоров P-PI на основе других ближнеинфракрасных FP полученных на основе BphP.

В 2014 году были созданы несколько сенсоров P-PI на основе IFP1.4: IFP PCA (от англ. protein complementation assay) и фрагментированных IFP (от англ. fragmented IFPs) (табл. 1). IFP PCA представляет собой разделенные PAS и GAF домены IFP1.4 и не содержит дополнительных мутаций (рис. Б.1) [70]. Из-за этого IFP PCA унаследовал низкое сродство к BV исходного белка и, как следствие, низкую эффективную яркость. Однако низкая эффективность взаимодействия с BV, обсуждаемая подробнее в разделе 1.2.1., по-видимому, привела к декомплементации PAS и GAF доменов и, тем самым, к возможности визуализации динамики P-PI целевых белков в клетках, содержащих большое количество свободного BV (табл. 1). Фрагментированные IFP были разработаны путем отбора вариантов IFP1.4, содержащих разрыв в случайном месте последовательности FP и обладающих наибольшим контрастом BiFC для определенной пары взаимодействующих белков (табл. 1, рис. Б.1) [71]. Таким образом, фрагментированные IFP представляют собой набор сенсоров, оптимизированных для обнаружения взаимодействия в бактериях.

В 2015 году метод отбора оптимального сенсора P-PI из набора вариантов FP со случайным разрывом в полипептидной цепи были применен к PAS и GAF доменам iRFP713, в результате чего были получены iRFP BiFC системы (рис. Б.1) [72]. Они обладают относительно

высоким контрастом BiFC *in vivo* и, подобно фрагментированным IFP, оптимизированы для визуализации взаимодействия различных пар белков (табл. 1) как в животных клетках, так и при измерении *in vivo*.

| Таблица | 1 – | Свойства | ближ | неинфракрасных | сенсоров | белок-белковых | взаимодействий | на |
|-----------|-------|-----------|--------|----------------|----------|----------------|----------------|----|
| основе ба | ктери | альных фі | итохор | ООМОВ | | | | |

| Ближнеинфракрасный сенсор | BiFC контраст в клетках животных | Исследованные пары взаимодействующих белков или пептидов | Ссылка | |
|---------------------------|---|--|--------|--|
| iSplit | 20-50 (~18 в мышах) | E/K α-спиральные пептиды; FRB (рапамицин- связывающий домен белка mTOR) и FKBP (FK506-связывающий белок) | [9] | |
| IFP PCA | 2 (20-50 в дрожжах) | адаптерный белок Shc и белок 2, связанный с рецептор фактора роста, GRB2 (в клетках HeLa); субъединицы протеин киназы A (Tpk2 и Bcy1); гомодиммеризующийся F _{M1} мутант FKBP12; белки Ypd1 и Ssk1t (в дрожжах) | [70] | |
| Fragmented IFPs | — (22 в бактериях) | IAAL-E3 и IAAL-K3 пептиды, белки хемотаксиса бактерий CheA (гистидинкиназа) и CheY (аспартаткиназа) | [71] | |
| iRFP BiFC systems | 5-6 (то же в мышах) | домены с лейциновыми спиралями bJun и bFos; интеграза вируса иммунодефицита человека 1 и эпителиальный фактор роста LEDGF/p75 | [72] | |
| miSplit670 | 41 | FRB и FKBP; PHK-связывающие белки оболочки | [64] | |
| miSplit703 18 | | оактериофага (MS2 и PP7) и соответствующие им последовательности РНК (MBS и PBS) | | |

В 2016 году одновременно с мономерными FP серии miRFP на их основе были созданы сенсоры P-PI, названные miSplit (рис. Б.1) [64]. Спектральные различия между miSplit670 и miSplit709 и их мономерность позволили проводить одновременную двухцветную визуализации P-PI с высоким контрастом BiFC *in vivo* (табл. 1). Кроме того, использование miSplit позволило визуализировать взаимодействие белков в трёхкомпонентных системах благодаря тому, что мутации, отвечающие за спектральные различия miSplit, находятся только в GAF домене. Таким образом, объединение mGAF₆₇₀ или mGAF₇₀₉, соответствующих miSplit670 и miSplit709, с единым PAS доменом приводит к возникновению разных цветов флуоресценции (рис. 5).



Рисунок 5 Принцип обнаружения взаимодействий между тремя белками при помощи miSplit [64]. Взаимодействующие пары целевых белков обозначены *синим, желтым и фиолетовым цветами*.

1.2.1. Влияние третичной структурны на свойства ближнеинфракрасных белков на основе бактериальных фитохромов

Низкий квантовый выход флуоресценции природных BphP объясняется тем, что основной функцией этих рецепторов является восприятие бактериями изменений в освещении путем фотоперелючения хромофора с последующей передачей сигнала через активацию эффекторного домена [20-22]. Поэтому в первую очередь создание FP на основе BphP и усиление их флуоресценции требует блокирования фотопереключения хромофора, которое отвечает за значительные потери энергии возбуждающего света в результате его безызлучательной диссипации [73]. Этого удается достичь удалением PHY и эффекторного доменов, а также введением мутаций в GAF домен, что приводит к устранению взаимодействия консервативного аминокислотного остатка аргинина в PHY домене и аминокислотного остатка аспарагина GAF домена в положении 202 с хромофором (рис. Б.1) [5, 6, 38, 43, 74]. Как было отмечено в разделе 1.1.3., таким образом были получены ближнеинфракрасные FP на основе DrBphP [42, 47, 61, 63], BrBphP [62, 65], RpBphP1 [64], RpBphP2 и RpBphP6 [26,28].

В случае фотоактивируемых ближнеинфракрасных FP присутствие PHY домена необходимо для осуществления переключения между неактивным и активным флуоресцентным состояниями [5]. Помимо удаления эффекторного домена при создании фотоактивируемых FP на основе AtBphP2, потребовалось также применить направленный и случайный мутагенез для увеличения квантового выхода и времени жизни FP в активном состоянии [10]. Окончательные версии PAiRFP содержали до 24 аминокислотных замен по сравнению с исходным белком, но при этом основная роль была отведена Val244Phe, Ala276Val и Met163Leu заменам (нумерация аминокислот приведена для AtBphP2), которые присутствовали в обоих версиях FP (рис. Б.1) [10]. Было предположено, что аминокислотные остатки в положениях 244 и 276, как наиболее близкие к пропионовокислым цепям колец B и C BV (рис. 2), определяют чувствительность PAiRFP к свету активации, а аминокислотная замена в положении 163 отвечает за увеличение времени возврата к неактивному состоянию [10].

За ковалентное связывание хромофора у природных BphP отвечает аминокислотный остаток цистеина в положении 15 (Cys15, нумерация аминокислот здесь и далее приведена для *Rp*BphP2), расположенный в N-концевой части PAS домена [75, 76]. Первые ближнеинфракрасные FP, полученные на основе *Dr*BphP [42] и *Rp*BphP2 [8], сохранили естественный Cys15 (Cys^{PAS}) и обладают спектром флуоресценции, сдвинутым в ближне-инфракрасную область. Позднее было показано, что BV может также связываться с

аминокислотным остатком цистеина, введенным в консервативную последовательность –SPXH– в GAF домене ближнеинфракрасных FP (Cys^{GAF}), вызывая тем самым синее смещение спектров поглощения и флуоресценции на 30 – 40 нм [77]. Наиболее вероятной причиной данного явления, согласно данным кристаллографии и масс-спектрометрии, стала более короткая система π -связей в сравнении с BV-Cys^{PAS}. Этот механизм также ответственен за синее смешение спектров других ближнеинфракрасных FP на основе BphP [65, 77, 78]. Кристаллографические и массспектрометрические исследования BphP1-FP, имеющего Cys только в GAF домене (Cys^{GAF}, Cys253 последовательности BphP1-FP, созданного на основе *Rp*BphP1), показали, что BV в этом FP ковалетно связан с Cys^{GAF} как через C3¹, так и C3² атомы углерода боковой цепи пиррольного кольца A (рис. 2), что однако не вызывает спектральных различий у двух форм BphP1-FP [77]. Для объяснения относительно более высокого квантового выхода у FP с синим смещением спектров (табл. A.1) было предположено, что введение Cys^{GAF} может снижать подвижность пиррольного кольца A в BV-Cys^{GAF} или уменьшать чувствительность хромофора с более короткой системой π -связей к перемещениям этого пиррольного кольца [79].

Взаимодействие между BV и Cys^{GAF} в димерных ближнеинфракрасных FP на основе BphP, содержащих только Cys^{GAF}, осложнено аллостерическими эффектами внутри мономеров [78]. Исследование мутантов нескольких димерных ближнеинфракрасных FP на основе BphP, содержащих только Cys^{GAF}, показало, что ковалентное связывание BV с одним из мономеров частично препятствует связыванию хромофора в другом, который его удерживает стерически. В следствии этого фракция нековалентно связанного BV значительно уменьшает квантовый выход FP и приводит к появлению плечей с коротковолновой стороны спектров поглощения и флуоресценции. Введение Cys^{PAS} дополнительно к Cys^{GAF} позволяет BV ковалентно связываться с обоими мономерами [78], увеличивает квантовый выход FP не менее чем на 14.5 %, а также убирает плечи у спектров поглощения и флуоресценции [78, 80]. В дополнение к этому, объединение Cys^{PAS} и Cys^{GAF} в одном FP увеличивает его стабильность и сродство к хромофору по сравнению с FP, содержащими только один из Cys [78].

Анализ круговых пермутантов iRFP713 показал, что разрыв его полипептидной цепи невозможен на участке последовательности, входящей в узел [81]. Однако новые N- и C- концы могут быть сформированы в N-концевой части PAS домена, неструктурированной петле между PAS и GAF доменами и близкой к ней α-спирали, а также в петле между β-слоями в PAS домене. Анализ положения сайтов, по которым проводили разделение доменов в сенсорах P-PI на основе IFP1.4, выявил такое же их расположение, как и у описанных выше круговых пермутантов iRFP713 [71]. Для создания iSplit iRFP713 был разделен на PAS и GAF домены в петле, соединяющей их в полноразмерном белке [9]. Сенсоры, относящиеся к iRFP BiFC системам, были разделены в петле между β-слоями в PAS доменами,

причем последние обладали большим BiFC контрастом [72]. Эти результаты, а также отсутствие обратимости взаимодействия, указывают на то, что большинство сенсоров P-PI на основе FP серий iRFP и IFP (рис. Б.1), в процессе комплементации способны восстанавливать узел как у их полноразмерных форм.

IFP PCA выделяется из перечня ближнеинфракрасных сенсоров P-PI тем, что способен к обратимой комлементации [70]. Однако наличие сформированного узла не позволило бы IFP PCA легко распасться на исходные компоненты после комплетемнации, поскольку известно, что узлы сохраняются в белках даже при полной их денатурации [82, 83]. Таким образом можно предположить, что обратимость IFP PCA вызвана либо отсутствием узла в собранном комплексе, либо нековалентным связыванием BV.

Для создания ближнеинфракрасного флуоресцентного сенсора протеазной активности был получен круговой пермутант IFP2.0 с новыми N- и C-концами, помещенными в петле между PAS и GAF доменами [84]. В этом конструкте, названом iProtease, старые N- и C- конца были соединены линкером, включающим в себя последовательность, узнаваемую протеазой. Длина линкера была выбрана таким образом, чтобы Cys в N-конце не мог взаимодействовать с BV, находящимся в кармане GAF домена, препятствуя созреванию белка и появлению флуоресценции. В свою очередь новые N- и C- концы iProtease были слиты с половинами sfGFP, которые удерживали части сенсора вместе после разрезания линкера протеазой. В результате этого линкер становится подвижен и Cys может присоединить BV, завершая созревание FP и вызывая появление ближнеинфракрасной флуоресценции.

Мономеризация IFP1.4 и IFP2.0, созданных на основе DrBphP, была достигнута путем замены аминокислотного остатка лизина в положение 331, с помощью чего разрушалось гидрофобное ядро, образованное α -спиралями GAF доменов в месте контакта двух мономеров в димере (рис. Б.1) [42]. Тем не менее после введения аминокислотной замены эти FP сохранили склонность к димеризации при повышении их концентрации в растворе [62]. Поэтому другой стратегией мономеризации FP стал поиск BphP, которые могли бы стать мономерными при удалении эффекторного и PHY доменов. Примером может служить BrBphP, область взаимодействия мономеров которого была предположительно ослаблена наличием полярного аминокислотного остатка треонина (Thr311 в последовательности BrBphP, рис. Б.1), послуживший основой для создания серии мономерных ближнеинфракрасных FP серии mIFP [62]. Создание мономерных ближнеинфракрасных FP на основе RpBphP1 стало возможным благодаря необычному взаимодействию мономеров фитохрома в димере согласно его кристаллической структуре [35]. Поскольку вместо активации гистидиновой киназы RpBphP1 имеет другой механизм передачи сигнала, заключающийся во взаимодействии PAS/PAC-Hos эффекторго домена с белком-партнером (RpPpsR2), взаимодействие между мономерами фитохрома происходит в основном за счет PHY и эффекторного доменов [64]. При удалении этих доменов в процессе создания FP, PAS-GAF производные не обладают склонностью к димеризации, а дополнительное введение положительно заряженных аминокислот в α-спирали GAF домена полностью устраняет взаимодействие между молекулами FP [64].

1.2.2. Влияние фотофизических характеристик хромофоров на свойства ближнеинфракрасных белков на основе бактериальных фитохромов

Увеличение квантового выхода ближнеинфракрасных FP на основе BphP имеет большое значение для улучшения характеристик флуоресцентного имиджинга. Основные позиции, по которым проводится направленный мутагенез, приходятся на Asp202, Ile203 и Tyr258 (рис. Б.1) [44, 47, 85], которые расположены в непосредственной близости от хромофора и способны ингибировать безызлучательную диссипацию энергии при его возбуждении [86]. Уменьшение подвижности хромофора также способствует увеличению интенсивности флуоресценции и достигается путем создания гидрофобного окружения вокруг кольца D BV (рис. 2) [43, 63]. Гидрофобный аминокислотный остаток лейцина, введенный В консервативную последовательность – PASDIP–, расположенную в области связывания хромофора в GAF домене, вместо аспарагина, увеличил квантовый выход FP Wi-Phy (табл. А.1) [59]. Было также обнаружено, что в Wi-Phy с аминокислотной заменой Asp307Leu, названном WiPhy2, уменьшилось количество молекул связанной воды вокруг BV в сравнении с окружением хромофоров Wi-Phy с His207 или DrPAS-GAF Asp207, что так привело к увеличению квантового выхода на 4 и 24 %, соответственно [59]. Изменение количества связанной воды оказало основное влияние на сеть водородных связей, включающую в себя пиррольные кольца А, В и С хромофора (рис. 2), а также ближайшие аминокислоты в положениях 207 и 263, и привело к прекращению переноса протона в возбужденном состоянии [59]. Квантово-механические расчёты на основе данных кристаллических структур FP серии IFP выявили возможность обмена молекулами воды между растворителем и окружением хромофора. а также позволили оценить влияние изменений в сети водородных связей на квантовый выход FP [87]. Было показано, что объемный аминокислотный остаток гистидина в положении 207 FP серии IFP способен эффективно препятствовать свободному перемещению молекул воды около хромофора, но в то же время вращение его имидазольного кольца способно влиять на отклонение пиррольных колец А и В хромофора от единой плоскости, снижая квантовый выход. В то же время аминокислотный остаток треонина, также способный блокировать доступ молекул воды к хромофору благодаря гидрофобной метильной группе, не меняет конфигурацию колец хромофора, что подтверждается более высоким квантовым выходом у IFP2.0, имеющим The207, по сравнению с другими FP

серии IFP, имеющих His207 (табл. А.1) [61]. Эти данные подтверждают, что His207 не является строго необходимым для усиления флуоресценции FP на основе BphP, как считалось ранее [47]. Более того, IFP1.4rev, содержащий аминокислотную замену His207Asp, обладает наибольшим квантовым выходом среди FP на основе *Dr*BphP (табл. А.1) [63]. На примере iRFP713 было также показано, что на флуоресценцию белка могут оказывать влияние замены аминокислотных остатков, которые не входят в непосредственное окружение хромофора [88].

Данных о влиянии единичных аминокислотных замен на спектральные свойства ближнеинфракрасных FP известно меньше. Как было описано ранее, синее смещение спектров поглощения и флуоресценции от 30 до 40 нм возможно за счет введения Cys^{GAF} в дополнение к консервативному Cys^{PAS} [65, 77, 78]. Тем не менее значительный интерес также представляет незначительное смещение спектров флуоресценции для оптимизации проб для многоцветного имиджинга. Было показано, что аминокислотная замена Val86Met в FP на основе DrBphP вызывает синее смещение спектров флуоресценции на 10 нм (рис. Б.1). Для объяснения влияния данной аминокислотной замены на спектры флуоресценции было предположено, что либо разветвленная цепь валина предоставляла большее пространства для релаксации хромофора, либо более длинная боковая цепь метионина стала препятствовать взаимодействию хромофора и его окружения [63]. Еще одним примером влияния единичной аминокислотной замены, приводящей к сдвигу спектров флуоресценции, может послужить вариация Leu201 и Phe201 в iRFP703 и iRFP709, соответственно. Спектры поглощения и флуоресценции этих FP смещены на 9 и 6 нм друг относительно друга, соответственно (рис. Б.1) [64]. Было предположено, что в данном случае имеет место батохромный сдвиг спектров, наблюдаемом у желтых GFP-подобных FP, вызванный взаимодействием ароматических колец BV и фенилаланина [89, 90]. Однако подтверждения этой гипотезы требуются дополнительные исследования.

1.3. Применение ближнеинфракрасных флуоресцентных белков на основе бактериальных фитохромов 1.3.1. Базовые методы флуоресцентного анализа

1.3.1.1. Флуоресцентные биомаркеры

Со времени создания первого ближнеинфракрасного FP на основе BphP, этот новый тип биомаркеров нашел широкое применение для решения ряда задач биомедицины и молекулярной биологии. Наиболее востребованным применением ближнеинфракрасных FP, как и GFPподобных FP, тканей организма. Для экспрессии является мечение клеток И ближнеинфракрасных FP на основе BphP чаще всего используются наиболее распространенные линии опухолевых или трансформированных клеток, такие как HeLa, HEK293, U87 и др [2, 8, 10, 42, 56, 57, 61, 62, 64, 91, 92]. Однако экспрессия ближнеинфракрасных FP, например, в клетках первичных нейронов (от англ. primary neuronal cells), где концентрация BV относительно низка, позволяет выявить FP, обладающие низким сродством к хромофору. Например, для флуоресцентного имиджинга FP серий IFP и mIFP в культуре клеток первичных нейронов гиппокампа требуется введение экзогенного BV или одновременная экспрессия гемоксигеназы [61, 62, 64, 92]. В то же время биомаркер iRFP713 неоднократно использовался для мечения нейронов гиппокампа, нейронов сетчатки глаза [93] или конфокальной микроскопии нейронов коры головного мозга живых мышей [94] без введения экзогенного BV к исследуемым клеткам. Помимо этого, было показано, что FP серии miRFP ярко флуоресцируют без введения экзогенного BV (рис. 6) [64].



Рисунок 6 Флуоресцентный имиджинг клеток первичных нейронов, экспрессирующих miRFP [64]. А – miRFP670. Б – miRFP703. В – miRFP709. *Масштабный отрезок* равен 10 мкм.

Эффективное проникновение ближнеинфракрасного изучения через биологические ткани, в сочетании с низкой автофлуоресценцией в этом спектральном диапазоне, способствует широкому применению ближнеинфракрасных FP в качестве меток для визуализации процессов миграции клеток в процессе регенерации или метастазирования в организме животных. В частности, продолжительное наблюдение за клетками предшественниками миокарда, экспрессирующими iRFP713, выявило детали восстановления сердечной мышцы мышей после

инфаркта миокарда [95]. Гемопоэтические стволовые клетки, меченные iRFP713, были успешно использованы для наблюдения за восстановлением клеток крови у облученных мышей [96]. Кроме того, iRFP713 зарекомендовал себя в качестве надежного флуоресцентного биомаркера для имиджинга роста различных раковых опухолей на животных моделях: человеческого воспалительного рака молочной железы [97], аденокарциномы молочной железы [97], первичной меланомы [98] и рака простаты [99].

Высокая стабильность и сродство к ВV ближнеинфракрасных FP серии iRFP позволили применять их не только в клетках животных, но в других организмах, достигая такого же охвата, как и у GFP-подобных FP. Список организмов, в которых экспрессировались различные ближнеинфракрасные FP на основе BphP, включает в себя: бактерии (*Escherichia coli*) [2, 8, 42, 62, 64, 91], дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae, Kluyveromyces lactis, Pichia pastoris*) [70, 100], простейшие (несколько видов *Leishmania*) [100-102], насекомые (*Drosophila*) [61, 62, 84] и рыбы (*Danio rerio*) [62, 65]. Примечательно, что экспрессия iRFP713 в клетках лейшмании не только продемонстрировало высокое сродство FP к BV, но и позволила наблюдать за распространением клеток простейших в организмах зараженных ими мышей [101, 102].

Низкая цитотоксичность и стабильные уровни экспрессии iRFP713 в клетках животных предоставили возможность разработать высокопроизводительные методы анализа для подсчета клеток в культуре, которые были использованы для поиска противораковых препаратов и испытания терапевтических средств [103, 104]. Более того, на основе iRFP713 были созданы трансгенные мыши, которые экспрессировали ближнеинфракрасный FP во всех клетках и органах и тканях, включая нервную, сосудистую, и пищеварительные системы [96].

Ближнеинфракрасные FP на основе BphP широко применяются в имиджинга органов и опухолевых образований в масштабах целого организма. FP серии iRFP многократно использовали для визуализации глубоко расположенных органов и раковых опухолей в живых мышах [2, 8, 57, 92, 105, 106]. Уникальные оптические свойства фотоактивируемых PAiRFP сделали возможными фотоактивацию и мечение целевых участков раковых опухолей, а также обнаружение раковых опухолей на ранних стадиях с высоким контрастом *in vivo* [10].

Спектральное разнообразие ближнеинфракрасных FP на основе BphP значительно расширило возможности многоцветного мечения и визуализации клеток, тканей и органов. Проточная цитофлуориметрия в сочетании с дополнительной обработкой сигнала позволила одновременно различать до пяти популяций клеток, меченных различными iRFP [107]. При помощи алгоритмов обработки сигнала также возможно различать до пяти подкожно расположенных раковых опухолей, меченных iRFP [2]. Даже без применения сложных этапов обработки изображений, разница не менее 39 нм между максимумами флуоресценции пар таких

белков как iRFP670 и iRFP720, miRFP670 и miRFP709 предоставляет возможность получать двуцветные изображения клеток и органов [2, 64, 65].

1.3.1.2. Флуоресцентные метки целевых белков

Склонность к димеризации первого поколения FP на основе BphP ограничивала возможности их применения в качестве меток целевых белков и использования наравне с мономерными GFP-подобными FP [57]. Недавний прогресс в области создания полностью мономерных ближнеинфракрасных FP на основе BphP значительно расширил цветовую палитру биомаркеров, пригодных визуализации тонкой структуры клеток. Помимо широко распространённых методов флуоресцентной микроскопии, к которым можно отнести обычную и конфокальную микроскопии, FP серий mIFP и miRFP предоставили возможность применения микроскопии сверхвысокого разрешения в ближнем инфракрасном диапазоне спектра, используя технику структурного освещения (от англ. structured illumination) (рис. 7, А–Б) [62, 64]. Более того, высокая яркость, фотостабильность и значительное красное смешение спектров флуоресценции miRFP703 предоставили возможность его применения в многоцветной микроскопии сверхвысокого разрешения (рис. 7, В) [64].



Рисунок 7 Микроскопия сверхвысокого разрешения с использованием miRFP [64]. Микрофотографии клеток HeLa, полученные при помощи техники структурного освещения, экспрессирующих α-тубулин (А) или гликопротеин лизосомальной мембраны LAMP1 (Б), меченные miRFP703. В – трехцветная микрофотография фиксированных клеток HeLa, полученная при помощи техники структурного освещения. Митохондрии окрашены TagGFP2 (*зеленый*), α-тубулин мечен FP mCherry (*красный*), гистон H2B мечен miRFP703 (*пурпурный*). *Масштабный отрезок* равен 5 мкм.

1.3.1.3. Флуоресцентные сенсоры

Флуоресцентные методы анализа внутриклеточных процессов позволили по-новому взглянуть на биохимические процессы, происходящие внутри клеток, отдельных клеточных

компартментах и на их границах [1, 48, 49]. Поскольку большинство созданных на данный момент флуоресцентных сенсоров излучают свет в видимом диапазоне спектра, изучение внутриклеточных процессов в масштабах целого организма было затруднено и требует использования таких специальной техники для наблюдения за клетками, как, например, прижизненная микроскопия [57, 108, 109]. Однако с появлением ярких ближнеинфракрасных FP стали разрабатываться различные флуоресцентные сенсоры на их основе.

Благодаря двухдоменной структуре ближнеинфракрасных FP на основе BphP были созданы различные сенсоры для наблюдения P-PI как в клетках, так и *in vivo*. iSplit послужил основой для создания сенсора взаимодействия FRB и FKBP под действие рапамицина для применения в клетках, живых мышах, а также *ex vivo* (табл. 1) [9]. iRFP BiFC системы были успешно использованы для визуализации взаимодействия между интегразой вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и мембранным фактором роста, а также для поиска новых лекарств против ВИЧ *in vivo* (табл. 1) [72]. Обратимое взаимодействие в IFP PCA позволило изучить пространственно-временную динамику P-PI белков и пептидов в дрожжах (табл. 1) [70].

Мономерные miRFP стали основой для создания первых мономерных двуцветных сенсоров P-PI [64]. miSplit670 и miSplit709 предоставили возможность обнаруживать P-PI в клетках между тремя различными белками одновременно (рис. 5) [64]. Используя пару высокоаффиных PHK-связывающих белков бактериофага (МСР и РСР), слитых с miSplit, удалось обнаружить матричные PHK (мPHK), содержащие участки связывания белков бактериофага (МВР и PBS, соответственно) в клетках HeLa с высоким контрастом (рис. 8).



Рисунок 8 Обнаружение мРНК при помощи miSplit [64]. А – miSplit670. Б – miSplit709. Живые клетки HeLa экспрессировали PAS-MCP и PCP-GAF вместе с мРНК, меченной ECFP (циановый FP, *синий*) и содержащей 12 повторов сайтов связывания белков бактериофага. Сближение PAS и GAF доменов при связывании с молекулами мРНК вызывало их комплементацию и возникновение ближнеинфракрасной флуоресценции, отмечая положение мРНК в клетке с высоким контрастом (*красный*). *Масштабный отрезок* равен 10 мкм.

Круговой пермутант mIFP послужил основой для создания ближнеинфракрасных сенсоров протеазной активности iTEV и iHCV, способных визуализировать активность протеазы вируса табачной мозаики (от англ. tobacco etch virus) и протеазы вируса гепатита C (от англ.

<u>h</u>epatitis <u>C</u> virus), соответственно [65]. Помимо этого, сенсор iCasper, также созданный на основе кругового пермутанта mIFP и активируемый каспазами 3 и 7, позволил визуализировать апоптоз клеток во время морфогенеза или роста опухолей в личинках дрозофилы [65]. Ближнеинфракрасные сенсоры для обнаружения апоптоза также были разработаны на основе химерных конструктов FP mKate2—iRFP713 и eqFP650—iRFP713, использующих механизм ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET, от англ. <u>F</u>örster resonance <u>energy transfer</u>) [110]. В отличие от iCasper, которому необходим sfGFP для поддержания целостности молекулы кругового пермутанта mIFP после активации, сенсоры на основе FRET позволяют проводить многоцветный имиджинг и были использованы для визуализации динамики регулятора апоптоза Вах, меченного EGFP, совместно с визуализацией активности каспаз.

флуоресцентных Для разработки сенсоров также успешно применяются немодифицированные ближнеинфракрасные FP на основе BphP. Например, для наблюдения за ответом клеток на действие фактора некроза опухолей а (TNFa от англ. tumor necrosis factor alpha) на основе miRFP703 был разработан сенсор деградации ядерного фактора ІкВа (от англ. kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha), участвующего в ингибировании универсального фактора транскрипции NF-кВ (от англ. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) [64]. При активации NF-кВ введением TNFa, липополисахаридов бактерий или цитокинов происходила деградация белка слияния miRFP703—ІкВа и, как следствие, уменьшение ближнеинфракрасной биолюминесценции (рис. 9, A). На основе miRFP также был получен ближнеинфракрасный сенсор фаз клеточного цикла, позволяющий отслеживать продвижение синхронизированных культур клеток по клеточному циклу в реальном времени in vivo [64]. miRFP670v1 (менее яркая версия miRFP670) и miRFP709 были слиты с укороченными факторами репликации геминином (от англ. Geminin) и Cdt1, соответственно. Деградация этих факторов в зависимости от фазы клеточного цикла приводила к деградации соответствующего FP и изменению цвета флуоресценции клеточных культур, стабильно экспрессирующих miRFP670v1-hGem(1/110) и miRFP709-hCdt1(1/100) (рис. 9, Б).



Рисунок 9 Ближнеинфракрасные сенсоры на основе miRFP [64]. А – Деградация ближнеинфракрасного сенсора miRFP703—ІкВ α в модели острого воспаления печени у мышей, вызванного введением липополисахаридов бактерий. Б – визуализация культур синхронизированных клеток, введенных в жировую ткань молочных желез мышей и экспрессирующих ближнеинфракрасный сенсор клеточного цикла. Клетки в G₂ и M фазах (отмечены *зеленой стрелкой*), накапливающие miRFP670v1-hGem(1/110), и клетки в G₁ фазе (отмечены *красной стрелкой*), накапливающие miRFP709-hCdt1(1/100), вводили в правую и левую молочные железы мыши.

1.3.2. Методы прижизненной визуализации процессов глубоко в тканях

Уникальные фотофизические характеристики ближнеинфракрасных FP на основе BphP сделали биологические ткани более прозрачными для исследования оптическими методами и, таким образом, усилили и расширили возможности анализа молекулярно-биологических процессов, происходящих глубоко в тканях животных с пространственным и временным разрешением, недостижимым для оптических методов, использующих свет видимого диапазона.

1.3.2.1. Флуоресцентная томография

Одним их основных требований флуоресцентного имиджинга животных в масштабах всего организма является возможность реконструкции трехмерных изображений для повышения точности пространственных и количественных измерений. К методам, позволяющим проводить подобный анализ, относится флуоресцентная молекулярная томография (FMT от англ. fluorescence molecular tomography) [111-113]. Для получения изображения этим методом стандартный способ освещения образца заменяется на его сканирование лучом возбуждающего света [114]. Затем при помощи математической модели, учитывающей распространение света в биологических тканях, на основе серии полученных изображений реконструируется трехмерное

31

изображение источника флуоресценции. Высокая точность реконструкции изображений при помощи FMT позволила получить двуцветные трехмерные изображения близкорасположенных опухоли и печени мыши, экспрессирующих различные iRFP [2]. Комбинирование возможностей FMT с методами рентгеновской, позитронно-эмиссионной томографии и магнитно-резонансной томографией предоставляет возможность более глубокого анализа распределения сигнала и положения изучаемых образцов. Например, FMT в сочетании с рентгеновской томографией были применены для трехмерного флуоресцентного имиджинга клеток лёгочной аденокарциномы человека, экспрессирующих iRFP713 и введённых в легкие мышей (рис. 10) [115]. Сочетание FMT, позитронно-эмиссионной и рентгеновской томографий сделало возможным обнаружение и реконструкцию трехмерных изображений ортотропных опухолей простаты в живых мышах [116].



Рисунок 10 Флуоресцентная и рентгеновская томография клеток A549, экспрессирующих iRFP713, после их введения в легкие мыши [115]. Ближнеинфракрасная флуоресценция выделена *зелёным* и *желтым*. Сигнал рентгеновской томографии приведен в виде *оттенков серого*. Расположение проекций в пространстве отмечено *белыми стрелками*.

1.3.2.2. Измерение времени жизни флуоресценции

Достижение высокой чувствительности флуоресцентного имиджинга в условиях значительной автофлуоресценции возможно при использовании технологии измерений времен жизни флуоресценции [117, 118]. Этот метод заключатся в возбуждении флуоресценции при помощи коротких пикосекундных импульсов и последующим измерением затухания флуоресценции для каждого пикселя изображения. Затем, основываясь на известных значениях времен жизни флуоресценции для биомаркера и хромофоров в ткани животного, возможно отделение этих сигналов друг от друга и построение окончательного изображения. Таким образом, технология измерений времен жизни флуоресценции позволяет значительно повысить отношения сигналов флуоресценции к сигналу автофлуоресценции и была успешно применена для обнаружения вплоть не менее $5 \cdot 10^4$ клеток, введенных в легкие мышей и экспрессирующих iRFP720 [119]. Более того, эта технология также обладает возможностями многоцветного флуоресцентного имиджинга, что достигается даже при использовании одной комбинации каналов возбуждения флуоресценции и флуоресценции благодаря различным временам жизни возбужденного состояния у разных iRFP. Сочетание измерения времен жизни флуоресценции с рентгеновской томографией позволило провести высокоточную реконструкцию опухолей, экспрессирующих iRFP720 и расположенных в мозге мыши (рис. 11) [119].



Рисунок 11 Флуоресцентный имиджинг с использованием измерения времен жизни флуоресценции и рентгеновская томография опухолевых клеток, экспрессирующих iRFP720, в мозге мыши [119]. А – флуоресцентное изображение головы мыши. Автофлуоресценция тканей выделена *зеленым*, в флуоресценция iRFP720 – *красным*. Б – комбинированное изображение костной ткани (*серый*) и опухоли в мозге мыши (*оранжевый*).

1.3.2.3. Фотоакустика

Ближнеинфракрасные FP на основе BphP являются перспективными биомаркерами для применения в фотоакустическом (PA от англ. photoacoustic) имиджинге глубоко в тканях. Эта технология основывается на преобразовании энергии мощного возбуждающего излучения в ультразвуковые волны, генерируемые в результате термоупругого расширения красителя во время поглощения коротких импульсов излучения [120, 121]. РА имиджинг позволяет достичь высокого пространственного разрешения и глубины измерения сигнала благодаря более низкому рассеянию регистрируемых ультразвуковых волн по сравнению с рассеянием флуоресценции ближнего инфракрасного или видимого диапазонов спектра [121]. По сравнению с GFP-подобными FP применение FP серии iRFP в PA имиджинге предоставляет больше возможностей благодаря их ближнеинфракрасным спектрам поглощения и высоким коэффициентам экстинкции. Например, проточная PA цитофлуореметрия *in vivo* позволила наблюдать за клетками, экспрессирующими iRFP713, в сосудах живой мыши [122]. Использование iRFP713 в качестве биомаркера для PA томографии предоставило возможность визуализировать клетки

глиобластомы на глубине 4 мм под поверхностью кожи мышей [123] и достичь 0.1 мм разрешения при визуализации опухоли в мозге мыши [124, 125]. Использование iRFP670 и iRFP720 сделало возможным двухцветную PA томографию опухолей в теле мышей с субмиллиметровым разрешением на глубине 8 мм [126].

Поскольку РА техника регистрирует ультразвуковые волны, а не излучение флуоресценции, любой краситель, поглощающий возбуждающий свет, будет виден на окончательном изображении [120, 121]. Подобный подход успешно применяется для визуализации таких естественных красителей, как, например, гемоглобин, поглощающий в широком диапазоне длин волн (рис. 1) и находящийся в изобилии в эритроцитах и органах сосудистой системы [127]. С другой стороны, гемоглобин способен мешать измерению ближнеинфракрасных биомаркеров за счет частичного поглощения ближнеинфракрасного света и как следствие создания фонового сигнала. В связи с этим для повышения контраста РА измерений были применены обратимо переключаемые ближнеинфракрасные биомаркеры. Одной из таких проб стал *Rp*BphP1, послуживший основой для создания miRFP и способный к обратимому переключению между Pr и Pfr состояниями под действием света определенных длин волн (630 нм свет использовали для переключения в «включенное» Pfr состояние, а 780 нм для регистрации сигнала и переключения в «выключенное» Pr состояние) (рис. 4) [128]. В свою очередь переключение *Rp*BphP1 между Pr и Pfr состояниями вызывает модуляцию соответствующего РА сигнала при заданной длине волны (780 нм) возбуждающего излучения и позволяет проводить последовательную съемку объекта в разных состояниях. При математической обработке получаемых изображений вычитание неизменного фонового сигнала предоставляет возможность повысить в 21 раз контраст измерений пробы *Rp*BphP1, расположенной под 10 мм рассеивающей среды, по сравнению с традиционным РА имиджингом без фотопереключения [128]. Применение *Rp*BphP1 в качестве обратимо переключаемого биомаркера для in vivo PA имиджинга позволило проводить продолжительные измерения роста опухолей почек, мозга и печени в живых мышах, а также обнаружить ранние метастазы, расположенные глубоко в тканях (рис. 12) [128]. Agrobacterium tumefaciens AGP1 BphP был также успешно использован для РА визуализации подкожно расположенных клеток колоректального рака человека и морфологии образованных из них опухолей in vivo [129].



Рисунок 12 *In vivo* PA томография клеток U87, экспрессирующих *Rp*BphP1 и расположенных глубоко в тканях живых мышей [128]. А – опухоль почек мыши, расположенная на глубине 8 мм под поверхностью кожи. Б – опухоль мозга, расположенная на глубине 3 мм под поверхностью головы мыши. В – Первичная опухоль печени и вторичные опухоли, отмеченные *белыми* стрелками. РА сигнал *Rp*BphP1 представлен в виде *цветовой гаммы*, сигнал гемоглобина – *отменков серого*.

1.3.3. Методы флуоресцентного анализа для разных масштабов: от клеток до целых организмов

Возможность визуализации молекулярно-биологических процессов одновременно на разных масштабах признается важной частью инструментария клеточной биологии, необходимого для понимания взаимосвязи биологических процессов на разных уровнях: от внутриклеточных структур и клеток до тканей, органов и систем органов. Несмотря на то что ближнеинфракрасные биомаркеры предоставляют множество преимуществ для визуализации процессов на уровне всего организма и глубоко в тканях, их применение не ограничивается этими задачами.

Создание мономерных ближнеинфракрасных FP на основе BphP [62, 64, 65] расширило возможности микроскопии сверхвысокого разрешения, добавив новые ближнеинфракрасные цвета и возможности изучения внутриклеточной архитектуры. Высокая яркость и стабильность ближнеинфракрасных FP на основе BphP в целом обеспечивает простой переход от измерений *in vivo* к измерениям изолированных клеток тканей и органов *ex vivo*. FP серий iRFP и miRFP успешно применялись для многоцветного имиджинга изолированных опухолей молочных желез мышей [2, 64]. iRFP713 неоднократно применялся в качестве биомаркера для посмертного имиджинга органов мышей, содержащих инфицированные аденовирусом, метастазировавшие или искусственно введенные раковые клетки [2, 98, 116]. В *ex vivo* конфокальной микроскопии сердца мышей iRFP713 проявил чувствительность в определении клеток предшественников кардиомиоцитов сравнимую с чувствительностью EGFP [95].

РА томография, являясь мощным инструментом для имиджинга биомаркеров в масштабах всего организма, также имеет значительный потенциал в увеличении разрешающей способности и чувствительности микроскопии. РА техника способна плавно масштабировать ее разрешающую способность и глубину регистрации сигнала без уменьшения контраста изображений [120, 121]. Используя iRFP670 и iRFP720, РА микроскопия предоставила возможность построения объёмных двуцветных изображений опухолей миллиметрового размера *in vivo* [126]. Как было отмечено выше, с применением RpBphP1 РА томография достигла значительной чувствительности измерений глубоко в тканях [128]. Применение обратимого переключения RpBphP1 в РА микроскопии клеток также позволило в 75 раз повысить разрешающую способность этого метода по сравнению с обычными биомаркерами (рис. 13, А) [128]. Более того, высокое латеральное разрешение порядка 141 нм и возможность послойной реконструкции позволили РА микроскопии с использованием RpBphP1 получить четкие изображения нескольких слоев клеток U87 (рис. 13, Б) [128].



Рисунок 13 РА микроскопия клеток U87, экспрессирующих *Rp*BphP1 [128]. А – Сравнение РА микрофотографий близкорасположенных клеток в вертикальном сечении, полученных без (верхнее изображение) и с (нижнее изображение) использованием многократного фотопереключения биомаркера. *Масштабный отрезок* равен 10 мкм. Б – РА микрофотография нескольких слоев фиксированных клеток. Окраска клеток отражает относительное расстояние от фокальной плоскости, на котором они находятся, начиная от 0 мкм (*синий*) до 45 мкм (*красный*). Расположение проекций в пространстве отмечено *черными стрелками*. *Масштабный отрезок* равен 20 мкм.

1.4. Достоинства и недостатки современных ближнеинфракрасных биомаркеров на основе бактериальных фитохромов

Ближнеинфракрасные биомаркеры для *in vivo* флуоресцентного имиджинга имеют ряд уникальных характеристик. Во-первых, основным преимуществом использования
ближнеинфракрасных биомаркеров являются их спектральные свойства, которые позволяют использовать возможности ближнеинфракрасного окна прозрачности тканей и повышают чувствительность оптических методов, использующих этот спектральный диапазон [130, 131]. Во-вторых, наиболее совершенные ближнеинфракрасные FP на основе BphP не требуют введения экзогенного хромофора и способны ярко флуоресцировать, используя только эндогенный BV [2, 64, 128, 132]. В-третьих, большинство ближнеинфракрасных FP на основе BphP не обладают цитотоксичностью и не оказывают влияния на клеточный метаболизм. Например, FP серий iRFP и miRFP многократно использовались для визуализации роста и развития раковых опухолей как на протяжении периодов не менее 40 суток [2, 8, 64, 115, 124, 133, 134], так и достигая в некоторых случаях 80 суток [97-99], без уменьшения яркости флуоресценции (рис. 14). Однако ближнеинфракрасные FP на основе BphP также имеют ряд характеристик, которые требуют улучшения.



Рисунок 14 Продолжительный *in vivo* флуоресцентный имиджинг опухолей, экспрессирующих iRFP713 [97-99]. А – наблюдение за ростом опухоли простаты человека в мышах на протяжении 9 недель. Положение простаты отмечено *стрелкой*. Б – наблюдение за ростом остеосаркомы человека в кости мыши на протяжении 10 недель. В – наблюдения за ростом воспалительного рака молочной железы на протяжении 11 недель. Положение молочной железы отмечено *треугольником*.

К недостаткам ближнеинфракрасных FP можно отнести относительно низкий квантовый выход их флуоресценции (табл. А.1) как по сравнению с GFP-подобными FP голубого и зеленого спектральных диапазонов, так и по сравнению с ближнеинфракрасными органическими красителями [49, 52, 59, 135]. Это обстоятельство свидетельствует о том, что ближнеинфракрасные FP еще не достигли пределов в яркости их флуоресценции. Помимо этого, большинство ближнеинфракрасных FP на основе BphP имеют в два раза большую молекулярную массу, чем у GFP-подобных FP, и склонность к димеризации (табл. А.1). Наконец, существующее разнообразие ближнеинфракрасных FP [48, 49]. Среди сенсоров, обладающих ближнеинфракрасной

флуоресценцией, нет таких, которые бы являлись флуоресцентными таймерами, сенсорами свободного кальция, электрического или механического потенциалов и др. Перечисленные категории сенсоров были бы высоко востребованы, например, в нейробиологии и доклинических исследованиях.

1.5. Генетически кодируемые источники ближнеинфракрасной биолюминесценции 1.5.1. Принцип и применение биолюминесценции

Естественное явление излучения света живыми организмами с использованием энергии, извлекаемой из химических реакций для перевода соответствующих хромофоров в возбуждённое состояние с последующим излучением квантов света, называется биолюминесценцией [4]. В отличие от флуоресценции, которая вызывается поглощением флуорофором квантов света, возникновение биолюминесценции требует присутствия фермента, или люциферазы, субстрата и дополнительных кофакторов, к которым чаще всего относятся кислород, аденозинтрифосфат (АТФ) или ионы металлов, например Mg^{2+} (рис. 15) [136].



Рисунок 15 Реакции биолюминесценции люцифераз светлячка (A) *Renilla reniformis* (RLuc) и (Б) *Photinus pyralis* (FLuc) [136].

В современных биомедицинских исследованиях биолюминесцентные методы анализа активно применяется наравне с использованием ближнеинфракрасной флуоресценции, поскольку оба подхода обладают высокой чувствительностью и эффективностью измерений объектов глубоко в тканях животных и в масштабах всего организма [4, 137]. Различия в механизмах свечения являются определяющими в основных отличиях между двумя методами анализа. Флуорофоры позволяют проводить многократные короткие измерения их флуоресценции без вмешательства в изучаемый образец, но в то же время возбуждение флуоресценции создает относительно высокий фоновый сигнал, вызванный автофлуоресценцией [138]. Биолюминесценция, как правило, требует непосредственного введения субстрата люциферазы в исследуемый образец и более продолжительного накопления сигнала из-за его низкой интенсивности. Помимо этого, скорость распределения субстрата по тканям организма или его проникновение через мембраны клеток, а также кинетика биолюминесценции, вносят свой вклад в ограничения по времени и продолжительности измерений биолюминесценции на клеточных культурах и *in vivo*. Однако в биолюминесцентном имиджинге практически отсутствует фоновый сигнал, в виду отсутствия какого-либо излучения помимо биолюминесценции, что позволяет обнаруживать очень малые количества исследуемых объектов и проводить измерения с более высоким контрастом, чем у флуоресценции того же диапазона длин волн [139, 140].

1.5.2. Люциферазы, излучающие в видимом диапазоне спектра

Люциферазы представляют собой широкий круг ферментов, катализирующих реакции, сопряженные с высвобождением квантов света. Несмотря на то, что существует множество организмов, способных к биолюминесценции, наиболее изучены представители следующих категорий: насекомые, бактерии, водоросли, ракообразные, кольчатые черви, моллюски и кишечнополостные. Наиболее используемыми для биомедицинских исследований стали люциферазы *Renilla reniformis* (RLuc от англ. <u>R</u>enilla <u>luc</u>iferase) и *Photinus pyralis* (FLuc от англ. firefly <u>luc</u>iferase) [141, 142]. В природе RLuc катализирует реакцию окисления целентеразина с участием молекул кислорода и высвобождением квантов синего света с максимумом при 482 нм (рис. 15, A). Окисление D-люциферина FLuc, требующее присутствия ионов Mg^{2+} и молекул ATФ, приводит к излучению квантов зеленого света с максимумом при 562 нм (рис. 15, Б). Помимо этих двух примеров существует еще большое количество менее изученных люцифераз из различных организмов [143, 144], которые тем не менее находят все большее применение и, возможно, в скором времени заменят традиционно используемые RLuc и FLuc.

1.5.3. Ближнеинфракрасные люциферазы

Поскольку спектры большинства широко используемых в настоящий момент люцифераз лежат в видимом диапазоне они не удовлетворяют характеристикам, необходимым для эффективного использования ближнеинфракрасного окна прозрачности биологических тканей. По этой причине многие научные коллективы заняты поиском новых еще неизученных люцифераз, обладающих спектром биолюминесценции со значительным красным смещением, или созданием источников ближнеинфракрасной биолюминесценции на основе уже известных люцифераз.

Открытие новых люцифераз из *Pyrophorus plagiophthalamus* [145], *Photinus pyralis* [146], *Luciola italica* [147] и *Phrixothrix* [148] значительно расширило цветовое разнообразие биомаркеров для биолюминесцентного имиджинга, имеющих красное смещение биолюминесценции с их природными субстратами. Направленный и сайт-специфический мутагенез люцифераз видимого спектрального диапазона позволил дополнительно сдвинуть их спектры в сторону ближнеинфракрасных длин волн, однако, не позволив перейти границу в 650 нм [11].

Создание новых искусственных субстратов для различных люцифераз позволило значительно повлиять не только на спектральные характеристики последних, но также на кинетику реакции биолюминесценции и биосовместимость субстратов (в основном за счет повышения растворимости в водных растворах) [4, 11, 137]. Окисление таких модифицированных субстратов, как, например, AkaLumine-HCl и iLH2 люциферин, позволило FLuc излучать свет с максимумами при 677 и 706 нм, соответственно [149, 150]. Тем не менее синтез подобных субстратов представляет сложный химический процесс и большинство из недавно созданных модифицированных субстратов не являются коммерчески доступными.

Еще одним способом измерения спектров биолюминесценции природных люцифераз стало использование резонансного переноса энергии от субстрата люциферазы к различным флуорофорам со значительным сдвигом максимума излучаемого света биолюминесценции. Конъюгация ближнеинфракрасными люцифераз с различными органическими И неорганическими флуорофорами позволила значительно сдвинуть ИХ спектры биолюминесценции. Краситель AF750 [151] и квантовые точки [152] позволили RLuc и FLuc излучать свет с максимумами при 783 и 800 нм, соответственно. Однако подобные конъюгаты люцифераз не могут быть генетически закодированы и представляют ограниченный интерес для продолжительных биомедицинских исследований. По этой причине использование FP в качестве акцепторов биолюминесценции обладает значительно большим потенциалом. Химерные конструкты, образованные люциферазой и FP, обладают высокой яркостью биолюминесценции и позволяют проводить одновременный флуоресцентный и биолюминесцентный имиджинг [12, 13, 153]. Тем не менее создание ближнеинфракрасных химерных люцифераз на основе GFPподобных FP существенно затруднено из-за отсутствия ярких ближнеинфракрасных GFPподобных FP и необходимых для них доноров энергии. В связи с этим на данный момент биолюминесценция химерных люцифераз находится в диапазоне от 474 (CNL [13]) до 635 нм (TurboRFP [154, 155]) (рис. 16).



Рисунок 16 Биолюминесцентный имиджинг с использованием химерных люцифераз [153, 154]. А – биолюминесцентная визуализация 3 млн клеток HT1080, расположенных в легких мыши и экспрессирующих RLuc8.6—TurboFP (максимум биолюминесценции при 635 нм). Б – биолюминесцентная визуализация и трехмерное комбинированное изображение сигнала биолюминесценции и рентгеновской томографии 100 тыс. клеток A549, экспрессирующих GpNluc (максимум биолюминесценции при 509 нм), на 35 день после введения в легкие мыши.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 2.1. Материалы

Для приготовления буферных растворов использовали химические реактивы высокой степени очистки (химически чистые или особо чистые, Fisher Scientific, США). Субстраты ProlumePurple для люциферазы RLuc8 получали в лиофилизированном виде (NanoLight Technologies, США) и растворяли в концентрации 1 мг/мл в NanoFuel Solvent (NanoLight Technologies, США). Биливердин гидрохлорид и фикоцианобилин гидрохлорид (Frontier Scientific, США) использовали без дополнительной очистки. Концентрацию тетрапирролов определяли спектрофотометрически, принимая коэффициент молярной экстинкции ε_{376} равным 45500 M⁻¹·см⁻¹ для BV или 35500 M⁻¹·см⁻¹ для PCB [156, 157].

Плазмиды, кодирующие использованные в работе белки (*Rp*BphP1, iRFP670, iRFP720, RLuc8, FLuc, sfGFP, EGFP, mCherry), либо получены из коллекции в лаборатории В.В. Верхуши, либо были получены по запросу от фирмы Addgene, США. Плазмидную ДНК очищали из клеток *Escherichia coli* TOP-10 с использованием набора для экстракции ДНК QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, США) согласно рекомендациям производителя. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически с использованием спектрофотометра NanoDrop. Для проведения полимеразной цепной реакции использовали термоустойчивою полимеразу PrimeSTAR Max (Clontech, США) и термоциклер T100 (BioRad, США).

Клетки линии MTLn3 были любезно предоставлены проф. Медицинского колледжа им. А. Эйнштейна, США, Дж. И. Сегалом. Для *in vivo* экспериментов использовали мышей линии CFW (Charles River, США) или линии SCID/NCr (Taconic, США) возрастом от 4 до 6 недель. Мыши содержались в виварии с циклом день-ночь продолжительностью 12 ч. Количество мышей в клетке не превышало пяти. Для кормления мышей использовали корм AIN-93M (TestDiet, CША), снижающий уровень автофлуоресценции тканей.

2.2.1. Создание белковых конструктов

2.2.1.1. Мутагенез и отбор клонов из бактериальных библиотек мутантов флуоресцентного

белка

2.2.1.1.1. Случайный и сайт-специфический мутагенез

Амплифицированные фрагменты ДНК, кодирующие PAS и GAF домены RpBphP1 (первые 315 аминокислот) или только GAF домен (аминокислоты с 122 по 315), встраивали в вектор *pBAD/HisB* (LifeTechnologies / Invitrogen, США), несущий устойчивость к ампициллину, по рестриктным сайтам эндонуклеаз *BglII и EcoRI*. На основе этих конструктов проводили сайтспецифический и случайный мутагенез генов PAS и GAF доменов с использованием реагентов QuikChange Mutagenesis Kit и GeneMorph II Random Mutagenesis Kit (Stratagene, США), соответственно, согласно рекомендациям производителя. Случайный мутагенез проводили в таких условиях, чтобы на 100 амплифицированных пар нуклеотидов приходилось не менее 16 мутаций. Полученная мутантная плазмидная ДНК была использована для трансформации клеток *E. coli* путем электропорации. В работе использовали штамм бактериальных клеток *E. coli* LMG194, содержащий плазмиды *pWA23h* [2] или *pL-PCB* [158], несущие устойчивость к канамицину и обеспечивающие внутриклеточный синтез BV или PCB за счет экспрессии гемоксигеназы или гемоксигеназы и биливердинредуктазы, соответственно.

Бактериальные клетки. трансформированные ЛНК. полвергшейся мутагенезу, наращивали в течение ночи при 37 °С в среде RM (Fisher Scientific, CША), содержащей ампициллин и канамицин. Часть бактериальной культуры рассеивали на чашки Петри с агаризованной средой LB, содержащей ампициллин и канамицин, и культивировали в течение ночи при 37 °C, для анализа размера бактериальной библиотеки клонов. Для дальнейшей работы использовали библиотеки размером не менее 10⁶ клонов. После культивации в бактериальной культуре экспрессию FP индуцировали путем введения в среду арабинозы до 0.004 % (для индукции экспрессии с *pBAD/HisB*) и рамнозы до 0.04 % (для индукции экспрессии с *pWA23h*), после чего клетки культивировали от 6 до 8 ч. При дальнейшей культивации температуру последовательно снижали сначала до 30 °С и культивировали бактериальную культуру от 10 до 12 ч. затем температуру понижали до 18 °С и культивировали культуру еще в течение 24 ч. Бактериальные клетки осаждали при помощи центрифугирования, убирали супернатант и разводили осадок клеток в фосфатно-солевом буферном растворе до достижения оптической плотности 0.03 ед. при длине волны 600 нм. Затем библиотеку клонов анализировали с использованием клеточного сортера MoFlo XDP, укомплектованного аргоновым, криптоновым и гелий-неоновым газовыми лазерами (Beckman Coulter, США). Отбирали клетки с наиболее яркой флуоресценцией при возбуждении излучением с длиной волны 633 нм и регистрации флуоресценции с использованием фильтра, пропускающего свет с длиной волны более 647 нм.

Наиболее яркие клетки собирали в обогащенную среду SOC (Fisher Scientific, США) и инкубировали при 30 °C в течение 1 ч, после чего рассеивали на чашки Петри, содержащие агаризованную среду LB (от англ. lysogeny broth, Fisher Scientific, США), ампициллин, канамицин, 0.004 % арабинозы и 0.04 % рамнозы, и культивировали в течение ночи при 37 °C и еще 24 ч при 18 °C. Колонии бактерий анализировали с использованием флуоресцентного стереомикроскопа MZ16F (Leica, США), оснащенного 605/40 и 650/45 нм фильтрами в канале возбуждения флуоресценции (обозначение 605/40 нм означает, что фильтр пропускает свет с длиной волны от 585 до 625 нм), и фильтрами, пропускающими свет с длиной волны более 640 или 690 нм, в канале регистрации флуоресценции (Сhroma, США), а также ПЗС камерой. На основе анализа яркости флуоресценции бактериальных клеток отбирали порядка от 30 до 50 клонов из каждой библиотеки, а их плазмидную ДНК секвенировали. Смесь плазмид наиболее ярких из отобранных мутантов использовали для следующего раунда мутагенеза.

2.2.1.1.2. Создание мутантов с короткими пептидными вставками

Создание библиотек мутантов GAF-FP с короткими аминокислотными вставками проводили с использованием Mutation Generation System Kit (ThermoFisher Scientific, CIIIA) согласно рекомендациям производителя. Для этого 300 нг плазмиды *pBAD/HisB*, кодирующей GAF-FP, обрабатывали MuA транспозазой, которая встраивала транспозон M1-Cam^R, несущий устойчивость к хлорамфениколу, в случайную позицию в последовательности плазмиды. Полученную модифицированную плазмидную ДНК трансформировали в клетки E. coli TOP-10 путем электропорации. Трансформированные бактерии рассеивали на чашки Петри с агаризованной средой LB, содержащей ампициллин, и хлорамфеникол. После культивации в течение ночи колонии бактериальных клеток собирали и выделяли их них плазмидную ДНК, которую затем обрабатывали эндонуклеазами BglII и EcoRI. Обработанную ДНК анализировали при помощи электрофореза в агарозном геле [159]. Полосу ДНК, соответствующую по электрофоретической подвижности массе последовательности GAF-FP с транспозоном, вырезали из геля. После очистки ДНК от агарозы полученный фрагмент встраивали в вектор *pBAD/HisB*. Плазмидную ДНК затем трансформировали в клетки *E. coli* TOP-10, культивировали и снова выделяли. Затем плазмидную ДНК обрабатывали эндонуклеазой *NotI*, рестриктные сайты которой фланкировали последовательность транспозона. Обработанную ДНК анализировали при помощи электрофореза в агарозном геле [159], а полосу ДНК, соответствующую по электрофоретической подвижности массе последовательности GAF-FP в векторе *pBAD/HisB*,

вырезали из геля и очищали. После чего плазмидную ДНК лигировали и трансформировали ею клетки *E. coli* TOP-10. Бактериальные клетки с библиотекой GAF-FP со вставками, происходящими из лигированного 15-ти нуклеотидного сайта *NotI*, культивировали в течение ночи при 37 °C на чашках Петри с агаризованной средой LB, содержащей ампициллин, канамицин, 0.004 % арабинозы и 0.04 % рамнозы. После первой культивации для дозревания флуоресцентного белка бактерии культивировали еще 24 ч при 18 °C. Яркость флуоресценции оценивали с использованием эпифлуоресцентного микроскопа MZ16F, оснащенного 605/40 и 650/45 нм фильтрами в канале возбуждения флуоресценции, и фильтрами, пропускающими свет с длиной волны более 640 или 690 нм, в канале регистрации флуоресценции (Chroma, CША). На основе анализа яркости флуоресценции бактериальных клеток отбирали от 10 до 15 клонов из каждой библиотеки, а их плазмидную ДНК секвенировали.

2.2.1.2. Создание химерных белков

Для слияния GAF-FP и sfGFP [160] их амплифицированные фрагменты были вставлены в вектор pEGFP-N1 (Clontech, CША), несущий устойчивость к канамицину и неомицину, вместо гена, кодирующего EGFP, по рестриктным сайтам эндонуклеаз *Agel* и *Notl*. Линкер между белками состоял из пяти повторов последовательности аминокислот –GGGS–. Аминокислотная последовательность этого линкера и линкеров в других белках слияния была выбрана таким образом, чтобы обеспечить его наибольшую гидрофильность и подвижность, тем самым исключив влияние белков друг на друга в процессе сворачивания.

Для слияния GAF-FP и RLuc8 [12] их амплифицированные фрагменты были вставлены в вектор *pBAD/HisB* по рестриктным сайтам эндонуклеаз *BglII* и *EcoRI*. Для слияния iRFP670 или iRFP720 и RLuc8 их амплифицированные фрагменты были вставлены в вектор *pBAD/HisB* по рестриктным сайтам эндонуклеаз *BglII* и *EcoRI*, или они были в вставлены в вектор pEGFP-N1 вместо гена, кодирующего EGFP, по рестриктным сайтам эндонуклеаз *AgeI* и *NotI*. Линкер между флуоресцентным белком и люциферазой состоял из двух (–GT–), семи (–GGGGSGT–) или 14 (– GGGGSGTGGGGSGG–) аминокислотных остатков.

2.2.2. Анализ белков *in vitro* 2.2.2.1. Выделение и очистка белка

Холоформы GAF-FP и его мутантов, содержащие полигистидиновый С-пептид, экспрессировали в клетках *E. coli* LMG194, содержащих плазмиды *pWA23h* или *pPL-PCB*, и очищали согласно протоколу, представленному в работе Филонова и соавторов [8]. Для этого

культуры бактериальных клеток культивировали от 15 до 18 ч при 37 °C, а затем еще 24 ч при 18 °С в среде RM, содержащей ампициллин, канамицин, 0.004 % арабинозы и 0.04 % рамнозы. Бактериальные клетки осаждали при помощи центрифугирования, супернатант убирали, а осадок суспендировали в фосфатно-солевом буферном растворе. Затем суспензию клеток обрабатывали ультразвуковыми импульсами в течение 5 мин по 5 с через каждые 25 с. После этого к разрушенным клеткам вводили 1 ед. ДНКазы-I (Clontech, США) и центрифугировали при 15000 g в течение 30 мин. Полученный супернатант, содержащий FP, смешивали с 1.5 мл никельагарозы His-GraviTrap (GE Healthcare, Швеция) и инкубировали при 4 °C в течение 15 мин. Затем агарозу осаждали, супернатант убирали, а осадок суспендировали в фосфатно-солевом буферном растворе. Эту процедуру повторяли три раза, после чего агарозу переносили в колонку объемом 4 мл. Белок элюировании 300 мМ раствором имидазола и переводили в фосфатно-солевой буферном растворе с использованием обессоливающих колонок PD-10 (General Electric, США). Для получения апоформ GAF-FP экспрессию и очистку белка проводили описанному выше протоколу с внесением незначительных измерений. Для экспрессии использовали клетки E. coli LMG194 не содержащие плазмид для синтеза тетрапирролов, а в среду не вводили антибиотик и индуктор для соответствующих плазмид.

Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по поглощению при длине волны 280 нм согласно коэффициенту экстинкции флуоресцентного белка при этой длине волны, рассчитанному по методу Пейса и соавторов [161]. Чистоту полученных препаратов проверяли при помощи электрофореза в 12.5 % полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [162].

2.2.2.2. Спектральные и физико-химические свойства

Флуоресцентные измерения проводили с использованием спектрофлуориметра FluoroMax-3 (Horiba, Япония), а спектры поглощения – с использованием спектрофотометра U-2000 (Hitachi, Япония).

Коэффициент экстинкции GAF-FP—BV и GAF-FP—PCB в основной полосе поглощения при 630 нм определяли по соотношению максимумов основной полосы поглощения и полосы поглощения при 380 нм, приравниваемой к поглощению свободного хромофора.

Определение абсолютного квантового выхода FP проводили в сравнении с красителем Nile blue (Sigma-Aldrich, CША), имеющего максимум возбуждения флуоресценции при 634 нм и флуоресценции при 674 нм и квантовый выход флуоресценции 4 % в водном растворе [163]. Для этого в идентичных условиях готовили серию очень разбавленных растворов FP и Nile blue имеющих одинаковую оптическую плотность не более 0.1 усл. ед. Затем измеряли спектры

флуоресценции FP и Nile blue в одинаковых условиях. Зная квантовый выход флуоресценции Nile Blue, по соотношению площадей под спектрами флуоресценции, исправленных на чувствительности фотоумножителя для исследуемого диапазона длин волн, вычисляли квантовый выход флуоресценции, используя следующую формулу:

$$\frac{\text{площадь } FP}{\text{площадь } NB} = \frac{\varphi_{FP}}{\varphi_{NB}},\tag{1}$$

где *площадь FP* – площадь под спектром флуоресценции FP, усл. ед.;

площадь NB – площадь под спектром флуоресценции Nile Blue, усл. ед.;

 φ_{FP} – квантовый выход флуоресценции исследуемого FP;

 φ_{NB} – квантовый выход флуоресценции Nile Blue, принимаемый равным 0.04.

рН зависимость флуоресценции GAF-FP определяли путем приготовления серии растворов FP на основе буферных растворов с различными значениями pH (100 мМ ацетат натрия для диапазона pH от 2.5 до 5.0 и 100 мМ NaH₂PO₄ для диапазона pH от 4.5 до 9.0). Флуоресцентные белки разводили буферных растворах до концентрации 5 мкМ, инкубировали 2 ч при 25 °C и затем измеряли спектры возбуждения флуоресценции и флуоресценции.

Ковалентное связывание BV и PCB с GAF-FP и анализировали на очищенных препаратах соответствующих белков путем регистрации цинк-индуцируемой флуоресценции комплекса белка с хромофором в 12.5 % полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (по Лэммли) [162]. Для этого электрофорез проводили в присутствии 2 мM ZnCl₂. Флуоресценцию комплексов хромофор—Zn²⁺ возбуждали светом с длиной волны 390 нм и регистрировали с использованием камеры, оснащенной 550/50 нм фильтром.

Анализ конкурентного связывания хромофоров с апоформой GAF-FP проводили по предложенной ранее методике [30]. Холобелок получали *in vitro* посредством инкубации апобелка с 10-кратным избытком BV, PCB или их смеси в различных пропорциях. Для этого в 2.5 мкМ раствор апоформы GAF-FP вводили тетрапирролы до конечной концентрации 25 мкМ. Смесь белка с тетрапирролами инкубировали в течение 2 ч, а затем удаляли избыток тетрапирролов с использованием обессоливающих колонок PD-25 (General Electric, CША). На основе измеренных спектров поглощения растворов холобелка после инкубации мы оценивали эффективность связывания BV относительно PCB. Благодаря различиям в спектрах холоформ GAF-FP—BV и GAF-FP—PCB мы могли определить вклад каждой из них в спектр поглощения образца. На основе этих данных определяли соотношения между формами холобелка для каждого раствора и нормализовали полученные данные путем вычитания величины, соответствующей образцу, содержащему 100 % PCB. Таким образом, образец со 100 % PCB принимался за «0», а образец со 100 % BV за «100». На основе графика зависимости содержания BV в холобелке от соотношения тетрапирролов в исходном растворе можно определить какой из

тетрапирролов предпочтительнее связывается с апобелком. При равноценном связывании хромофоров с GAF-FP 50 % BV на графике должно приходится на соотношение BV к PCB равному 1, то есть середине оси абсцисс.

Гель-фильтрацию очищенного препарата GAF-FP—BV проводили с использованием хроматографической колонки HiLoad 16/600 Superdex 200 (GE Healthcare, CША), уравновешенной 10 мМ HEPES буферным раствором pH 7.4, содержащим 50 мкМ этилендиаминтетрауксусной кислоты, 10 % глицерина, 150 мМ NaCl, 1 мМ дитиотреитола, 0.1 % детергента EP-40 и 0.2 % бензодиазепина, и откалиброванной при помощи стандартов (BioRad, США). Флуоресцентный белок наносили на колонку в объеме 2 мл при концентрации 25 мкМ. Скорость протекания раствора поддерживали равной 1 мл/мин.

Измерение биолюминесценции *in vitro* проводили на суспензиях бактериальных клеток (GAF-FP—RLuc8) или лизатах клеток линии HeLa (iRFP720—RLuc8 и iRFP670—RLuc8). Клетки линии HeLa лизировали методом замораживания-оттаивания, проводи процедуру не менее трех раз. Для возбуждения биолюминесценции 20 мкл клеточного лизата смешивали с 20 мкл субстрата ProlumePurple (NanoLight Technologies, CША) в лунке 96-луночного белого планшета, после чего измеряли сигнал с использованием системы IVIS Spectrum (PerkinElmer, CША). Сигнал биолюминесценции нормировали на количество клеток, которое определяли либо по оптической плтности при 600 нм (для бактерий), либо прямым подсчетом в камере Горяева (для клеток животных).

Измерение резонансного переноса энергии проводили с использованием набора фильтров для измерения флуоресценции системы IVIS Spectrum (PerkinElmer, CША). Для расчета приблизительных значений эффективности резонансного переноса энергии использовали отношение интенсивности сигнала ближнеинфракрасной биолюминесценции (фильтр 680/20 нм) к интенсивности общей биолюминесценции (без фильтра) или к интенсивности сигнала люциферазы RLuc8 (фильтр 400/20 нм). При расчете полной эффективности резонансного переноса энергии использовали методику, предложенную ранее [154]. Значения эффективности резонансного переноса энергии использовали методику, предложенную ранее [154].

$$\Im P\Pi \Im = \left(\frac{\Box H \Box_{\Pi O \Pi H A \pi}}{C \Box_{\Pi O \Pi H A \pi}} - \frac{\Box H \Box_{D O H O D}}{C \Box_{D O H O D}}\right) \times 100, \tag{2}$$

где ЭРПЭ – эффективность резонансного переноса энергии в процентах;

БИБ_{полная} – интенсивность ближнеинфракрасной биолюминесценции химерного белка (отсекаемая фильтром, пропускающим свет с длиной волны более 610 нм), отн. ед.;

СБ_{полная} – интенсивность синей биолюминесценции химерного белка (отсекаемая фильтром, пропускающим свет с длиной волны менее 550 нм), отн. ед.;

БИБ_{донор} – интенсивность ближнеинфракрасной биолюминесценции люциферазы, отн. ед.;

СБ_{донор} – интенсивность синей биолюминесценции люциферазы, отн. ед.

Все количественные измерения на основе полученных изображений проводили с использованием программы прибора IVIS Spectrum (PerkinElmer, CША).

2.2.2.3. Биохимические и физико-химические свойства бактериальных клетокпродуцентов мутантных форм GAF-FP

Фотостабильность GAF-FP и iRFP670 оценивали в клетках *E. coli* LMG194, содержащих плазмиды pWA23h или pPL-PCB. Экспрессию ближнеинфракрасных FP на чашках Петри с агаризованной средой LB проводили по протоколу, приведенному в разделе 2.2.1.1.1. Фотообесцвечивание клеток бактерий проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа IX81 (Olympus, Япония), оснащенного 200 Вт металлогалогенной лампой Lumen220Pro (Prior, CША), 100-картным иммерсионным объективом UPlanSApo с 1.4 числовой апертурой и набором фильтров для измерения флуоресценции (Olympus, Япония). Для этого колонию бактериальных клеток накрывали покровным стеклом, чашку с колонией переворачивали и помещали над иммерсионным объективом с нанесенной каплей иммерсионного масла. Затем, после наведения фокуса на массу клеток, проводили их облучение короткими импульсами света от 1 до 15 с в канале возбуждения флуоресценции 605/40 нм поочередно с регистрацией остаточной интенсивности флуоресценции в том же канале возбуждения и регистрацией флуоресценции фильтром, пропускающим свет с длиной волны более 670 нм, с выдержкой 100 мс. Для управления микроскопом использовали программу SlideBook 4.1 (Intelligent Imaging Innovations, CША).

Значения интенсивности флуоресценции нормализовали с учетом коэффициента пропускания фильтра возбуждения флуоресценции, коэффициентов экстинкции FP и перекрывания их спектров поглощения со спектром излучения 200 Вт металлогалогенной лампы. На основе нормализованных значений строили график зависимости интенсивности флуоресценции от времени. Все количественные измерения на основе полученных изображений проводили с использованием программы ImageJ.

Исследование скорости сворачивания и созревания FP в клетках бактерий проводили по методике, приведенной ранее [164]. Для этого клетки *E. coli* LMG194, содержащие плазмиды *pWA23h* или *pPL-PCB* и трансформированные плазмидой с изучаемым белком, наращивали в течение ночи при 37 °C в среде RM, содержащей ампициллин, канамицин и 0.04 % рамнозы. Индукцию синтеза белка в клетках бактерий начинали введением арабинозы до 0.004 %. Через 1 ч бактерии отмывали от арабинозы и продолжали инкубировать при 37 °C, через равные интервалы времени отбирая аликвоты для оценки интенсивность флуоресценции клеточной

суспензии. Сигнал флуоресценции нормировали на количество бактерий в исследуемой аликвоте по ее светорассеянию при длине волны 600 нм.

Изучение анаэробного созревания FP также проводили в бактериальных клетках LMG194, содержащих плазмиды *pWA23h* или *pPL-PCB*. Для этого бактерии растили в течение ночи при 37 °С на чашках Петри с агаризованной средой, содержащей ампициллин, канамицин и 0.04 % рамнозы. После индукции синтеза белка распылением над колониями бактерий 400 мкл 0.2 % раствора арабинозы чашки Петри помещали в камеры с анаэробными условиями (Mitsubishi gas chemical, Япония) на 24 ч при 37 °С. После инкубации измеряли флуоресценцию колоний бактерий с использованием эпифлуоресцентного микроскопа MZ16F, оснащенного фильтрами 480/20, 570/30, 605/40 нм в канале возбуждения флуоресценции и 535/40, 615/40 нм фильтрами и фильтрами, пропускающими свет с длиной волны более 640 или 690 нм, в канале регистрации флуоресценции (Chroma, США). Незамедлительно после выполнения анализа флуоресценции чашки Петри с колониями бактерий помещали в термостат для инкубации в течение 24 ч при 4 °С в присутствии кислорода. В течение этого времени синтезированный за время анаэробной инкубации FP имел возможность присоединить хромофор, однако синтез нового белка был значительно замедлен [165]. После инкубации при 4 °C снова измеряли интенсивность флуоресценции колоний на чашках Петри. Окончательный уровень флуоресценции бактерий для каждого FP принимался за 100 %. Относительно этого уровня определялся уровень флуоресценции после анаэробной инкубации. Для сравнения созревания GFP-подобных FP и ближнеинфракрасных FP на основе BphP использовали зеленый и красный GFP-подобные FP EGFP и mCherry (54630, Addgene, США), при экспрессии которых клетки LMG194 не содержали плазмид для синтеза тетрапирролов.

Все количественные измерения на основе полученных изображений проводили с использованием программы ImageJ.

2.2.3. Экспрессия белков в клетках млекопитающих 2.2.3.1. Культивирование клеточных культур

Клетки линии HeLa CCL2 (раковая опухоль шейки матки человека, ATCC, CША) растили на среде Игла, модифицированной по способу Дульбекко (DMEM от англ. <u>D</u>ulbecco/Vogt modified Eagle's <u>minimal essential medium</u>, Life Technologies/Invitrogen, CША), содержащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, CША), 0.5 % пенициллина, 0.5 % стрептомицина и 2 мМ глутамина (Life Technologies/Invitrogen, США) в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °C. Клетки линии MTLn3 растили на альфа-модификации среды Игла (alpha-MEM от англ. <u>alpha</u> modified Eagle's <u>minimal essential medium</u>) с теми же добавками и в тех же условиях. При необходимости к клеткам вводили 25 мкМ растворы BV или PCB (Frontier Scientific, США) в диметилсульфоксиде (до конечной концентрации 10 мкМ) за 24 ч до проведения имиджинга.

2.2.3.2. Трансфекция клеток

Трансфекцию клеток линий HeLa и MTLn3 плазмидами, кодирующими изучаемые биомеркеры, осуществляли при помощи реагента Effectene (Qiagen, CША) в соответствии с рекомендациями производителя. За сутки до проведения трансфекции клетки рассеивали на 12луночные планшеты или чашки Петри со стеклянным дном (Corning, США) в таком количестве, чтобы к моменту проведения трансфекции их конфлюэнтность (от лат. confluere) составляла от 60 до 80 %. Далее готовили трансфекционную смесь. На примере 60 мм (21 см₂) чашки Петри: 1 мкг плазмидной ДНК растворяли в 150 мкл буфера ЕС; вводили 8 мкл раствора энхансера (от англ. Enhancer) и энергично перемешивали; инкубировали в течение 5 мин при 25 °C; вводили 25 мкл трансфицирующего реагента Effectene и энергично перемешивали не менее 10 с; инкубировали в течение 10 мин при 25 °C. За время последней инкубации трансфекционной смеси клетки в чашек Петри промывали 4 мл раствором фосфатно-солевого буфера, модифицированного по способу Дульбекко, и вводили 4 мл свежей среды для клеток, содержащей необходимые компоненты. После инкубации трансфекционной смеси ее объем доводили до 1 мл свежей средой для клеток, аккуратно перемешивали три раза и по каплям вносили в чашку Петри с клетками. По прошествии от 6 до 18 ч среду в чашках Петри с трансфицирующим реагентом заменяли на свежую.

2.2.3.3. Эпифлуоресцентная микроскопия

Эпифлуоресцентную микроскопию живых клеток линии HeLa, трансфицированных плазмидами, кодирующими изучаемые FP, проводили через 48 ч после трансфекции на чашках Петри со стеклянным дном использованием эпифлуоресцентного микроскопа IX81, оснащенного 200 Вт металлогалогенной лампой Lumen220Pro (Prior, США), 40-картным иммерсионным объективом UPlanSApo с 1.35 числовой апертурой и набором фильтров для измерения флуоресценции. Перед проведением микроскопии клетки промывали раствором фосфатносолевого буфера, модифицированного по способу Дульбекко, и вводили среду FluoroBrite DMEM (Invitrogen, США), обеспечивающую минимальную фоновую флуоресценцию и высокую жизнеспособность окрашиваемых клеток при продолжительных измерениях. Измерение ближнеинфракрасной флуоресценции проводили в канале возбуждения флуоресценции, оснащенного фильтром 605/40 нм, и фильтром, пропускающими свет с длиной волны более 640 нм, в канале регистрации флуоресценции. Измерение зелёной флуоресценции проводили в канале возбуждения флуоресценции оснащенного фильтром 480/40 нм и фильтром 535/40 нм в канале регистрации флуоресценции. Для управления микроскопом и работы с полученными изображениями использовали программу SlideBook 4.1.

2.2.3.4. Проточная цитофлуориметрия

Интенсивность ближнеинфракрасной флуоресценции клеток линий HeLa и MTLn3, трансфицированных плазмидами, кодирующими изучаемые FP, анализировали через 24 или 48 ч после трансфекции с использованием проточного цитофлуориметра LSRII, укомплектованного аргоновым, криптоновым и гелий-неоновым газовыми лазерами (Becton Dickinson, CША). Помимо плазмиды, кодирующей изучаемый ближнеифнаркрасный FP, клетки трансфицировали в 10 раз меньшим количеством плазмиды *pEGFP-N1*, кодирующей EGFP, для сравнения эффективности трансфекции в разных пробах. Ближнеинфракрасную флуоресценцию клеток, экспрессирующих GAF-FP или белки слияния на его основе, анализировали в канале возбуждения флуоресценции с излучением с длиной волны 640 нм и в канале регистрации флуоресценции, оснащённого фильтром, пропускающим свет с длиной волны более 647 нм. Ближнеинфракрасную флуоресценцию клеток, экспрессирующих iRFP670 или белки слияния на его основе, анализировали в канале возбуждения флуоресценции с излучением с длиной волны 640 нм и в канале регистрации флуоресценции, оснащённого фильтром 660/20 нм. Ближнеинфракрасную флуоресценцию клеток, экспрессирующих iRFP720 или белки слияния на его основе, анализировали в канале возбуждения флуоресценции с излучением с длиной волны 640 нм и в канале регистрации флуоресценции, оснащённого фильтром 730/30 нм. Зеленую флуоресценцию клеток, экспрессирующих GAF-FP—sfGFP или EGFP, анализировали в канале возбуждения флуоресценции с излучением с длиной волны 488 нм и в канале регистрации флуоресценции, оснащённого фильтром 530/30 нм.

Для сравнения яркости флуоресценции ближнеинфракрасных FP использовали усредненную интенсивность ближнеинфракрасной флуоресценции клеток, деленную на усредненную интенсивность их зелёной флуоресценции, тем самым учитывая разницу в эффективности трансфекции.

Все расчёты на основе полученных данных цитофлуориметрии проводили с использованием программы FlowJo (TreeStar, CША).

2.2.3.5. Создание стабильных клеточных линий

Для создания линий клеток MTLn3, стабильно экспрессирующих исследуемые биомаркеры, после проведения трансфекции соответствующими плазмидами, клетки культивировали в присутствии неомицина (Life Technologies/Invitrogen, CША) в концентрации не менее 400 мкг/мл. До момента образованная на чашке Петри единичных колоний клеток, устойчивых к антибиотику, среду заменяли каждые двое суток для поддержания стабильно высокой концентрации антибиотика. После образования единичных колоний клеток им давали вырасти до достижения конфлюэнтности от 70 до 90 %. Затем проводили анализ флуоресценции клеток с использованием клеточного сортера MoFlo XDP. Для дальнейшей культивации отбирали клетки с наиболее яркой флуоресценцией при возбуждении излучением с длиной волны 633 нм и регистрации флуоресценции с использованием фильтра, пропускающего свет с длиной волны более 647 нм. После отбора ярких клеток концентрацию антибиотика снижали до 100 мкг/мл. В случае необходимости отбор клеток по яркости проводили повторно.

2.2.3.6. Флуоресцентный и биолюминесцентный имиджинг

Флуоресцентный и биолюминесцентный анализ живых клеток линии HeLa и мышей проводили с использованием системы IVIS Spectrum (PerkinElmer, CША), укомплектованной набором фильтров для возбуждения флуоресценции и регистрации флуоресценции в диапазоне от 400 до 800 нм, а также ПЗС камерой с рабочей температурой минус 90 °C для достижения высокой чувствительности ближнеинфракрасного излучения. Выбор экспозиции оставляли в автоматическом режиме при измерении флуоресценции и биолюминесценции, за исключением экспериментов, отмеченных отдельно.

2.2.3.6.1. Измерения в мышином фантоме

Для имитации свойств светорассеяния и поглощения света биологическими тканями использовали фантом мыши XFM-2, изготовленный из материала, близкого по оптическим свойствам к тканям млекопитающих (рис. 17). В задней части фантома параллельно его продольной оси располагались два отверстия глубиной не менее 3 см и на расстоянии 7.0 и 18.0 мм от поверхности фантома.



Рисунок 17 Мышиный фантом XFM-2, имитирующий оптические свойства тканей млекопитающих (PerkinElmer/Caliper, США).

Для измерения биолюминесценции исследуемых белков 5 мкл 8 мкМ раствора очищенного белка в фосфатно-солевом буфере смешивали с 5 мкл 100 мкМ свежеприготовленного раствора субстрата ProlumePurple в фосфатно-солевом буфере. Незамедлительно после смешивания образцы помещали в одну из двух полостей мышиного фантома и проводили биолюминесцентный имиджинг. Оптимальный фильтр для регистрации биолюминесценции и фильтры для возбуждения флуоресценции и регистрации флуоресценции подбирали экспериментально. Мышиный фантом с 10 мкл фосфатно-солевого буферного раствора использовали для определения интенсивности автофлуоресценции.

Все количественные измерения на основе полученных изображений проводили с использованием программы Living Image 4.3.1 (PerkinElmer, CША).

2.2.3.6.2. Имиджинг клеток

Измерение биолюминесценции и флуоресценции клеток линии HeLa в 12-луночном планшете проводили через 24 ч после трансфекции плазмидами, кодирующими исследуемые белки. Для измерения ближнеинфракрасной флуоресценции использовали различные комбинации фильтров в каналах возбуждения и регистрации флуоресценции, соответствующих диапазону от 600 до 800 нм. Для измерения биолюминесценции химерных белков на основе RLuc8 непосредственно перед измерением к клеткам вводили 200 мкл 50 мкМ раствора субстрата ProlumePurple в фосфатно-солевом буфере, модифицированном по способу Дульбеко, после чего проводили последовательный имиджинг в каналах регистрации флуоресценции в диапазоне от 670 до 770 нм. Для контроля эффективности трансфекции клетки также трансфицировали в 10 раз меньшим количеством плазмиды *pEGFP-N1*, кодирующей EGFP. Измерение зеленой флуоресценции проводили в каналах возбуждения флуоресценции и регистрации флуоресценции, оснащённых фильтрами 490/30 и 540/20 нм, соответственно. Для сравнения уровней ближнеинфракрасной биолюминесценции часть клеток трансфицировали плазмидой *pFLuc–N1*, кодирующей люциферазу FLuc. Для измерения биолюминесценции Fluc непосредственно перед измерением к клеткам вводили 200 мкл 30 мг/мл раствора субстрата Dлюциферина в фосфатно–солевом буфере, модифицированном по способу Дульбеко, после чего проводили имиджинг в канале регистрации флуоресценции, оснащенного фильтром 560/20 нм.

Лунки 12-луночного планшета с нетрансфицированными клетками использовали для определения интенсивности автофлуоресценции и фонового сигнала биолюминесценции при введении растворов субстратов.

Полученные значения интенсивности флуоресценции и биолюминесценции нормировали на флуоресценцию EGFP, чтобы нивелировать различия эффективности трансфекции. Все количественные измерения на основе полученных изображений проводили с использованием программы Living Image 4.3.1.

2.2.3.6.3. In vivo имиджинг

Для измерения флуоресценции и биолюминесценции живых мышей их усыпляли смесью для анастезии (смесь 2 % изофлурана с кислородом), поле чего помещали на подогреваемый столик (36 °C) внутри системы IVIS Spectrum, к которому также был обеспечен доступ смеси для анестезии (рис. 18).



Рисунок 18 Схема визуализации флуоресценции (А) и биолюминесценции (Б) в живых мышах в системе IVIS Spectrum [153]. Во флуоресцентном режиме возбуждающий свет падает на объект (мышь) сверху, то есть в том же направлении, в котором ориентирована камера. В биолюминесцентном режиме источник возбуждающего излучения не активируется.

Для построения зависимости интенсивности сигналов биолюминесценции и флуоресценции в живых мышах от количества введенных клеток линии MTLn3, стабильно экспрессирующих iRFP670—RLuc8 или iRFP720—RLuc8, известное их количество вводили мышам линии CFW подкожно или через хвостовую вену. Перед инъекцией клетки, культивируемые на 100 MM чашке Петри, обрабатывали раствором трипсина с этилендиаминуксусной кислотой. Затем их аккуратно суспендировали и путем подсчета в камере Горяева определяли концентрацию клеток в суспензии. На основе суспензии с известной концентрацией клеток готовили серию суспензий клеток объемом 50 мкл в среде RPMI (от англ. Roswell Park Memorial Institute), повышающую выживаемость клеток в первые часы после введения в ткани мыши, но не обладающую сильным иммуностимулирующим эффектом. После приготовления и до проведения инъекции суспензии клеток держали на льду. Инъекции проводили шприцом объемом 100 мкл либо в хвостовую вену мышей, что приводило к задерживанию большей части клеток в тонких капиллярах легких, либо подкожно в область спины. Перед проведением подкожных инъекций шерсть мышей удаляли с использованием депиляционного крема (Veet, CША).

Измерение флуоресценции и биолюминесценции клеток в живых мышах проводили не более чем через 2 ч после проведения инъекций. Для измерения ближнеинфракрасной флуоресценции использовали различные комбинации фильтров в каналах возбуждения и регистрации флуоресценции, соответствующих диапазону от 600 до 800 нм. Для измерения биолюминесценции химерных белков на основе RLuc8 непосредственно перед измерением мышам под анестезией через хвостовую вену вводили 50 мкл раствора субстрата ProlumePurple в фосфатно-солевом буфере, модифицированном по способу Дульбеко, в количестве 0.7 мг субстрата на 1 кг веса животного. Затем незамедлительно проводили последовательный имиджинг в каналах регистрации флуоресценции в диапазоне от 670 до 770 нм. При повторном имиджинге биолюминесценции последовательность измерений в каналах регистрации флуоресценции изменяли на противоположенную для уменьшения влияния затухания биолюминесценции. По результатам двух экспериментов для каждой мыши значения биолюминесценции в каждом канале усредняли. Визуализацию малого количества клеток осуществляли с использованием канала регистрации флуоресценции, не содержащего фильтр. Для того, чтобы исключить влияние собственной биолюминесценции RLuc8, над областью измерений помещали фильтр, пропускающий свет с длиной волны более 610 нм.

Для изучения роста опухолей 2 млн клеток линии MTLn3, стабильно экспрессирующих iRFP670—RLuc8 или iRFP720—RLuc8, приготовленных по приведенному выше протоколу, вводили в молочную железу мышей линии SCID/NCr. Наблюдение проводили в течение 28 сут, используя биолюминесцентный или флуоресцентный режимы системы IVIS Spectrum по

57

приведенному выше протоколу. Для построения кривых зависимости флуоресценции и биолюминесценции опухолей, экспрессирующих iRFP670—RLuc8, от времени использовали каналы возбуждения флуоресценции и регистрации флуоресценции, оснащённые фильтрами 640/30 и 680/20 нм, соответственно. Для построения кривых зависимости флуоресценции и биолюминесценции опухолей, экспрессирующих iRFP720—RLuc8, от времени использовали каналы возбуждения флуоресценции и регистрации флуоресценции, оснащённые фильтрами 675/30 и 720/20 нм, соответственно.

Анализ биолюминесценции и флуоресценции клеток опухолей, экспрессирующих iRFP670—RLuc8 или iRFP720—RLuc8, метастазировавших в легкие мышей, по приведенному выше протоколу. Первичные опухоли, обладающие значительно большей интенсивностью биолюминесценции по сравнению с интенсивностью биолюминесценции метастазировавших клеток, закрывали непрозрачным материалом.

2.2.3.6.4. Ex vivo имиджинг

Измерение флуоресценции органов мышей, извлеченных посмертно, проводили при помощи системы IVIS Spectrum. Для проведения вскрытия мышей умерщвляли ингаляцией углекислого газа в течение не менее 10 мин. После извлечения органы помещали на чашку Петри и измеряли ближнеинфракрасную флуоресценцию с использованием различных комбинаций фильтров в каналах возбуждения и регистрации флуоресценции, соответствующих диапазону от 600 до 800 нм. Для анализа метастазировавших клеток методом проточной цитофуориметрии легкие мышей механически измельчали, полученную массу фильтровали через 40-микрометровый сетчатый нейлоновый фильтр и суспендировали в фосфатно–солевом буферном растворе. Цитофлуориметрию клеток легких проводили в условиях, соответствующих протоколу анализа клеток линии MTLn3, приведенному в разделе 2.2.3.4.

Все расчёты на основе полученных данных цитофлуориметрии проводили с использованием программы FlowJo (TreeStar, CША).

2.2.4. Расчёт оптических свойств биологических тканей

Расчет эффективного коэффициента затухания света для различных биологических тканей проводили согласно методу, приведенному ранее [45]. Оптические свойства тканей млекопитающих различаются от одного типа к другому и определяются различными факторами. Общие свойства тканей были рассмотрены в разделе 1.1.1. Однако, полное ослабление проходящего пучка света биологической тканью при заданной длине волны зависит от таких

параметров, как степень насыщения гемоглобина кислородом, объем протекающей крови, содержание воды, жировой ткани, концентрации эндогенных пигментов (например, билирубина, меланина, каротиноидов и др.), Рэлеевского светорассеяния и светорассеяния Ми [18]. Математически оптические свойства биологических тканей упрощенно определяются тремя параметрами: коэффициентом рассеяния (μ_s), коэффициентом поглощения (μ_a) и фактором анизотропии рассеяния (g).

Коэффициенты рассеяния и поглощения определяются как вероятность поглощения или рассеяния света на единицу пройдённого им пути, соответственно. Третий параметр, фактор анизотропии рассеяния, отвечает за рассеяние в мутных средах и определяется как косинус угла рассеяния. Таким образом, значения фактора анизотропии рассеяния лежат в пределах от минус 1 до плюс 1, определяя направление рассеяния. Для большинства биологических тканей значения фактора анизотропии рассеяния лежат в пределах от 0.70 до 0.99, что означает, что рассеяние фотонов в этих средах происходит преимущественно в направлении их движения. Используя фактор анизотропии рассеяния возможно вычислить приведенный коэффициент рассеяния, учитывающий анизотропию рассеяния света в изучаемой биологической ткани, используя следующее уравнение:

$$\mu'_{s} = (1 - g)\mu_{s}, \tag{3}$$

где *µ*'_s – приведенный коэффициент рассеяния;

g – фактором анизотропии рассеяния;

 μ_s – коэффициент рассеяния.

На практике, когда происходит изучение объёмных образцов биологических тканей, вычисление приведенных выше параметров существенно затруднено из-за множественных актов поглощения и рассеяния квантов света, выходящих за рамки данной модели. В связи с этим для описания свойств объемных образцов ткани используется параметр, называемый эффективным коэффициентом ослабления (μ_{eff}). Этот параметр обратно пропорционален длине пройденного светом пути, при котором происходит падение интенсивности потока излучения на величину 1/е, что приблизительно составляет 37 %. Отношение между рассматриваемыми параметрами описывается уравнением:

$$\mu_{eff} = \sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu'_s)},\tag{4}$$

где μ_{eff} – эффективный коэффициент ослабления;

µ^{<i>a} – коэффициентом поглощения;

 μ'_s – приведенный коэффициент рассеяния.

Многие исследовательские группы изучают оптические свойства тканей млекопитающих как с точки зрения фундаментальной науки, так и биомедицинских исследований, что позволяет найти в литературе экспериментально определенные значения коэффициента поглощения и приведенного коэффициента рассеяния для различных тканей [166-172]. Таким образом, становится возможным вычислить эффективный коэффициент ослабления для различных тканей, используя уравнение (4).

В таком случае ослабление параллельного монохроматического пучка света при распространении его в биологической ткани согласно закону Бугера – Ламберта – Бера будет описываться уравнением:

$$I(l) = I_0 e^{\left(-\mu_{eff}\lambda_l\right)} \tag{5}$$

где I(l) – интенсивность света, BT/cm^2 , прошедшего слой ткани толщиной l, мм;

 I_0 – интенсивность света на входе в ткань, Bт/см²;

 μ_{eff}^{λ} – эффективный коэффициент ослабления, мм⁻¹, при длине волны λ ;

На основе данных литературы, используя уравнения (4) и (5), были рассчитаны и построены зависимости падения мощности излучения света (Вт/см²) от толщины слоя биологической ткани, в которой распространяется свет. Для построения графиков использовали значения эффективного коэффициента ослабления, приведенные в таблице 2.

Таблица 2 – эффективные коэффициенты ослабления для различных биологических тканей

| Тип ткани | $\mu_{e\!f\!f}{}^{480}$ | $\mu_{e\!f\!f}$ 560 | $\mu_{e\!f\!f}$ ⁶⁷⁰ | $\mu_{e\!f\!f}$ 720 | Ссылка |
|-----------------|-------------------------|---------------------|--------------------------------|---------------------|--------|
| Мышцы | 0.63 | 0.49 | 0.24 | 0.13 | [166] |
| Молочная железа | 2.86 | 4.31 | 0.45 | 0.33 | [171] |
| Легкие | 4.11 | 3.66 | 1.10 | 0.85 | [172] |

В обратных миллиметрах

2.2.5. Статистическая обработка данных

Каждое измерение проводили не менее трех раз. Результаты считали достоверными при значениях р менее 0.05. Данные представлены в виде диаграмм с указанием максимального значения стандартного отклонения или в виде кривых с указанием минимального и максимального значений стандартного отклонения.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Получение ближнеинфракрасного однодоменного мономерного флуоресцентного биомаркера на бактериального фитохрома

3.1.1. Направленный мутагенез GAF домена бактериального фитохрома *Rp*BphP1

В качестве основы для разработки нового FP был выбран BV-связывающий бактериальный фитохром *Rhodopseudomonas palustris Rp*BphP1 [35], не использовавшийся ранее для создания FP. В соответствии с устоявшейся стратегией создания FP на основе BphP [62, 64, 65] для направленного мутагенеза использовали два домена *Rp*BphP1, участвующих в связывании хромофора: PAS домен, содержащий Cys19, необходимый для ковалентного связывания хромофора, и GAF домен, участвующий в стерическом связывании хромофора (рис. 3, Б).

В первую очередь мутагенезу подвергли аминокислотные остатки в позициях 201 и 202 GAF домена (нумерация аминокислотных остатков здесь и далее приведена для *Rp*BphP1), которые, согласно литературным данным [5, 6, 8], обладают наибольшим влиянием на квантовый выход хромофора, ингибируя безызлучательную диссипацию энергии [86]. Отобрав мутанты, обладающие более высокой флуоресценцией, чем у исходного конструкта, был проведен случайный мутагенез всей последовательности мутантов PAS—GAF конструкта (рис. 19). Среди отобранных мутантов, обладающих наиболее яркой флуоресценцией, был обнаружен слабо флуоресцирующий мутантный белок, названный PAS—GAF-FP, содержащий две важные аминокислотные замены: Cys19Ser и Ile252Cys. Было предположени, что поскольку PAS—GAF-FP не содержит канонического остатка цистеина в PAS домене, но обладает флуоресценцией, соответствующей ближнеинфракрасным FP, хромофор в FP должен быть ковалентно связан другим аминокислотным остатком. Соответственно была выдвинута гипотеза, что новый аминокислотный остаток цистеина в положении 252 GAF домена PAS—GAF-FP, расположенный в непосредственной близости от хромофора, взял на себя функцию его ковалентного связывания.

Опираясь на эту гипотезу, мы удалили PAS домен из PAS—GAF-FP, оставив аминокислотные остатки с 123 по 315, соответствующие GAF домену *Rp*BphP1. Результаты экспрессии в бактериальной культуре и последующей очистка GAF домена с Cys19Ser и Ile252Cys мутациями продемонстрировали низкую стабильность этого FP в фосфатно–солевом буферном растворе, наблюдаемую по образованию хлопьевидного осадка FP. Для того чтобы обнаружить участок аминокислотной последовательности, ответственный за агрегацию FP, было проведено выравнивание его аминокислотной последовательности с аминокислотными последовательностями GAF доменов фитохромов цианобактерий (*An*PixJ [173] и *Te*PixJ [174]), связывающих РСВ (рис. 2, А) в качестве хромофора без участия других доменов (рис. 20). По литературным данным, GAF домены фитохромов цианобактерий уже служили основой для создания стабильных FP, обладающих красной и оранжевой флуоресценцией [28, 175, 176].



Рисунок 19 Схема основных этапов создания GAF-FP. Интенсивность окраски компонента схемы соответствует яркости флуоресценции соответствующего белка.

По результатам проведенного анализа было обнаружено, что наибольшее различие между GAF доменом PAS—GAF-FP и GAF доменами фитохромов цианобактерий заключалось в отсутствии у последних узла, характерного для BphP. Таким образом, было решено удалить аминокислотные остатки с 225 по 247 включительно, соответствующие узлу в структуре GAF домена RpBphP1. Вместе с удалением узла были введены четыре мономеризующие мутации в С-концевую α -спираль GAF домена путем замены гидрофобных аминокислотных остатков на положительно заряженные аминокислотные остатки аргинина или лизина [47], что должно было вызвать нарушение гидрофобного ядра, образующегося при взаимодействии двух мономеров. Внесенные мутации значительно повысили стабильность FP, что позволило провести еще несколько раундов мутагенеза GAF домена PAS-GAF-FP для увеличения яркости его ближнеинфракрасной флуоресценции. Помимо случайного мутагенеза всей последовательности GAF домена PAS—GAF-FP был проведен сайт-специфический мутагенез аминокислотных остатков в позициях 201 и 202, а также аминокислотного остатка в позиции 178, который предположительно ответственен за повышение яркости ближнеинфракрасных FP на основе BphP

с синим смещением спектров флуоресценции [2]. Из бактериальной библиотеки мутантов GAF домена PAS—GAF-FP ли отобраны наиболее яркие клоны, аминокислотную последовательность которых определяли секвенированием соответствующей им плазмидной ДНК. Для повышения яркости и стабильности окончательного варианта FP на основе GAF домена мы собрали все мутации, повышающие яркость, в одном конструкте, который был назван GAF-FP.

В результате направленного мутагенеза нам удалось получить яркий однодоменный флуоресцентный белок, 15 % аминокислотной последовательности которого, не включая 22 аминокислотных остатка, соответствующих узлу, было заменено по сравнению с GAF доменом *Rp*BphP1 (рис. 20) [177].

| | | 123 | 130 | 140 | - | 150 | 160 | 17 | 70 |
|--|---|---|--|---|---|---|---|---|--|
| RpBphP1-GAF | (121) | RAGPPIE |) LSGTLA | PALERIR' | TAGSLRAI | LCDDTALI | LFQQCTG | YDRVMVYF | FDEQGH |
| GAF-FP | (1) | RAGP <mark>S</mark> II |)LSG <mark>M</mark> LA | PALERIR | TAGSLRAI | lcddt <mark>v</mark> li | LFQQCTG | YDRVMVYR | FD <mark>V</mark> QGH |
| AnPixJ-GAF2 | (1) | | MAVS | KVMEKIL | RVSNIDKI | I FQTTTQI | EIRQLLK | CDRVAVYF | FNPDWS |
| TePixJ-GAF | (1) | | | MAAVQLS | ELRDRQAI | IFETLVA | KGRELLA | CDRVIVYA | FDDNYV |
| | | 180 | 1 | 90 | 20 | 00 | 210 | 220 |) |
| RpBphP1-GAF | (157) | GEVFSEF | RHVPGLĖ | SYFG | -NRYPSSI | DIPQMARI | RLYERQRV | VRVLVDVS | YQPVPL |
| GAF-FP | (37) | DQVFSE <mark>C</mark> | HVPGLE | SY <mark>L</mark> G | -NRYPSS | 1V PQMAR | 2LY <mark>l</mark> rQrv | VR <mark>MR</mark> VD <mark>LI</mark> | YQ <mark></mark> |
| AnPixJ-GAF2 | (27) | GEFVAES | SVGSGWV | KLVGPDI | KTVWEDTH | HLQETQG | GRYRHQES | SFVVNDI- | YE |
| TePixJ-GAF | (23) | GTVVAES | SVAEGWP | QARD | -QVIEDPO | CFREHWVI | EAYRQGR | IQATTDI- | FK |
| | | 220 | 24 | \cap | 250 | 260 | | 270 | 200 |
| | | 230 | 24 | 0 | 230 | 200 | | 270 | 200 |
| RpBphP1-GAF | (225) | EPRLSPI | 24 LTGRDLD | U MSGCFLR | 230 SMSPIHL(| 200 QYLKNMGV | VRATLVVS | 270 SLVVGGKI | 200 WGLVAC |
| <i>Rp</i> BphP1-GAF GAF-FP | (225) (104) | 230 EPRLSPI | 24 LTGRDLD | U MSGCFLR <mark>G</mark> R | 230 SMSPIHL(SMSP <mark>C</mark> HL(| 280 2YLKNMG ¹ 2YLK <mark>D</mark> MG ¹ | VRATLVVS VRATLVVS | 270 SLVVGGKI SLVVGGKI | wglvac wglv <mark>v</mark> c |
| <i>Rp</i> BphP1-GAF GAF-FP <i>An</i> PixJ-GAF2 | (225) (104) (97) | EPRLSPI | 24 LTGRDLD | U MSGCFLR GR A | SMSPIHL(SMSP <mark>C</mark> HL(GHFSCHLE | 200 QYLKNMG7 QYLK <mark>D</mark> MG7 EILEQFE: | VRATLVVS VRATLVVS IKAYIIVI | 270 SLVVGGKI SLVVGGKI PVFAAEKI | / WGLVAC WGLV <mark>V</mark> C |
| <i>Rp</i> BphP1-GAF GAF-FP <i>An</i> PixJ-GAF2 <i>Te</i> PixJ-GAF | (225) (104) (97) (89) | EPRLSPI | LTGRDLD | U MSGCFLR GR A | J SMSPIHL(SMSP <mark>C</mark> HL(GHFSCHLE GLTECHLN | 200 QYLKNMG7 QYLK <mark>D</mark> MG7 EILEQFE: NQLRPLK7 | VRATLVVS VRATLVVS IKAYIIVI VRANLVVI | 270 SLVVGGKI SLVVGGKI PVFAAEKI PMVIDDQI | I WGLVAC WGLV <mark>V</mark> C WGLLAA |
| <i>Rp</i> BphP1-GAF GAF-FP <i>An</i> PixJ-GAF2 <i>Te</i> PixJ-GAF | (225) (104) (97) (89) | 230 EPRLSPI | 24 JTGRDLD | UMSGCFLR. <mark>G</mark> R A | SMSPIHLÇ SMSPIHLÇ SMSP <mark>E</mark> HLÇ GHFSCHLE GLTECHLN 300 | 200 QYLKNMG7 QYLK <mark>D</mark> MG7 EILEQFE: NQLRPLK7 310 | VRATLVVS VRATLVVS IKAYIIVI VRANLVVI 3 | 270 SLVVGGKI SLVVGGKI PVFAAEKI PMVIDDQI 20 | I WGLVAC WGLV <mark>V</mark> C WGLLAA |
| RpBphP1-GAF GAF-FP AnPixJ-GAF2 TePixJ-GAF RpBphP1-GAF | (225) (104) (97) (89) (261) | EPRLSPI | 24 | MSGCFLR G A A FELRAIC: | I SMSPIHLÇ SMSP <mark>E</mark> HLÇ GHFSCHLE GLTECHLN 300 I ELLAEAI <i>I</i> | 200 QYLKNMGV QYLK D MGV EILEQFE: NQLRPLKV 310 ATRITALI | VRATLVVS VRATLVVS IKAYIIVI VRANLVVI 3 ESFAQSQS | 270 SLVVGGKI SLVVGGKI PVFAAEKI PMVIDDQI 20 SELFV | I WGLVAC WGLV <mark>W</mark> C WGLLAA |
| <i>Rp</i> BphP1-GAF GAF-FP <i>An</i> PixJ-GAF2 <i>Te</i> PixJ-GAF <i>Rp</i> BphP1-GAF GAF-FP | (225) (104) (97) (89) (261) (119) | L EPRLSPI | 24 | MSGCFLR GR A FELRAIC: FELRAIC: | I SMSPIHLÇ SMSP <mark>O</mark> HLÇ GHFSCHLE GLTECHLN 300 I ELLAEAI <i>I</i> KRLAERI <i>I</i> | 200 2YLKNMGY 2YLKDMGY EILEQFE: NQLRPLKY 310 ATRITALI ATRITALI | VRATLVVS VRATLVVS IKAYIIVI VRANLVVI 33 ESFAQSQS ES | 270 SLVVGGKI SLVVGGKI PVFAAEKI PMVIDDQI 20 SELFV | I WGLVAC WGLV <mark>W</mark> C WGLLAA |
| <i>Rp</i> BphP1-GAF GAF-FP <i>An</i> PixJ-GAF2 <i>Te</i> PixJ-GAF <i>Rp</i> BphP1-GAF GAF-FP <i>An</i> PixJ-GAF2 | (225) (104) (97) (89) (261) (119) (111) | LSO EPRLSPI HHYLP HHYLP YQNSGTF | LTGRDLD LTGRDLD | MSGCFLR GR A FELRAIC FELRAIC SSFLTQV | SMSPIHLQ SMSP <mark>O</mark> HLQ GHFSCHLE GLTECHLN 300 ELLAEAI <i>I</i> KRLAERI <i>I</i> GLQFGIAJ | 200 QYLKNMGY QYLKDMGY EILEQFE: NQLRPLKY 310 ATRITALI ATRIALI ISHAEYLI | VRATLVVS VRATLVVS IKAYIIVI VRANLVVI S ESFAQSQS ES EQTRLQSI | 270 SLVVGGKI PVFAAEKI PMVIDDQI 20 SELFV EQMIR | I WGLVAC WGLV <mark>W</mark> C WGLLAA |

Рисунок 20 Выравнивание аминокислотных последовательностей GAF домена *Rp*BphP1, GAF-FP, а также GAF доменов фитохромов цианобактерий *An*PixJ and *Te*PixJ. Аминокислотные остатки GAF-FP, которые были изменены в процессе молекулярной эволюции, обозначены *черным шрифтом на красном фоне*. Нумерация аминокислотных остатков приведена для *Rp*BphP1.

3.1.2. Фотофизические свойства и связывание хромофоров GAF-FP

На основе сходства между GAF-FP и PCB-связывающими GAF доменами фитохромов цианобактерий было предположено, что GAF-FP будет способен связывать как BV (хромофор BphP), так и PCB (хромофор фитохромов цианобактерий), имеющий на две двойные связи меньше (рис. 3). По данным литературы известно, что благодаря различиям в химической

структуре двух тетрапирролов, FP, связывающие PCB в качестве хромофора, обладают более коротковолновыми спектрами поглощения и флуоресценции [30].

Для подтверждения данной гипотезы была проведена экспрессия GAF-FP в бактериях в присутствии РСВ. Появление характерной сине-зеленой окраски культуры бактерий показало, что FP действительно связывает РСВ. В связи с этим следующим шагом стало определение спектральных характеристик GAF-FP, связанного с BV или с PCB. Спектры поглощения, возбуждения флуоресценции и флуоресценцииGAF-FP в интервале длин волн от 260 до 800 нм были измерены на очищенных препаратах FP, экспрессированного в присутствии BV или PCB (рис. 21, А–Б). Полученные данные [177] свидетельствуют о том, что спектральные свойства GAF-FP полностью соответствует спектральным свойствам других ближнеинфракрасных FP на основе BphP [62, 64, 65], что в свою очередь указывает на правильное встраивание хромофоров и созревании GAF-FP. Спектр поглощения хромофора GAF-FP обладает двумя максимумам: в фиолетовой и в дальней красной областях спектра (рис. 21, А). Стоксов сдвиг флуоресценции составил 35 и 32 нм для GAF-FP—BV и GAF-FP—PCB, соответственно (рис. 21, Б). Квантовый выход флуоресценции и коэффициенты экстинкции (для ближнеинфракрасного максимума поглощения) GAF-FP также соответствуют усредненным значениям этих параметров для ближнеинфракрасных FP на основе BphP с синим смещением спектров флуоресценции [2, 65]. Хараеткристика фотофизических свойств GAF-FP с различными хромофорами представлена в таблице 3.



Рисунок 21 Спектральные свойства GAF-FP. А – спектры поглощения GAF-FP—ВV и GAF-FP— PCB. Б – спектры возбуждения флуоресценции (*сплошные кривые*) и флуоресценции (*штриховые кривые*) GAF-FP—BV и GAF-FP—PCB.

| | Коротко- | Длинно- | Макен | Коэффи- | Кванто- | Молеку | Время | | |
|-------------|----------|----------|----------|------------------------|----------|---------------|----------|------------------|------------------|
| Φινοpequeu- | волновый | волновый | илакси- | циент | вый | париза | полусо- | | |
| тный белок | максимум | максимум | оресцен- | экстин- | выход | пкость | зревания | pKa ₁ | pKa ₂ |
| TIBIN OCHOR | поглоще- | поглоще- | пии ни | кции, | флуорес- | лркоств, % | при 37 | | |
| | ния, нм | ния, нм | ции, ши | $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ | ценции | 70 | °С, ч | | |
| GAF-FP— | 370 | 635 | 670 | 19800 | 0.073 | 100 | 4.0 | 10 | 78 |
| BV | 517 | 055 | 070 | 47000 | 0.075 | 100 | 4.0 | 4.0 | 7.0 |
| GAF-FP— | 350 | 625 | 657 | 80500 | 0.121 | 268 | 3.5 | 16 | 83 |
| PCB | 559 | 023 | 037 | 80300 | 0.121 | 200 | 5.5 | 4.0 | 0.5 |

Таблица 3 – Фотофизические свойства GAF-FP, связанного с BV или PCB

Примечательно, что молекулярная яркость флуоресценции GAF-FP—PCB 2.68 раз превышает молекулярную яркость флуоресценции GAF-FP—BV, что соответствует замеченной закономерности увеличения яркости флуоресценции дальнекрасных FP при синем смещении максимумов их спектров флуоресценции [59, 60].

Для определения эффективности связывания BV был проведен анализ очищенного препарата GAF-FP, экспрессированного в присутствии BV, в сравнении со спектрально похожим двухдоменным ближнеинфракрасным FP iRFP670 на основе BphP, полученным и очищенным в тех же условиях, методом электрофореза по Лэммли (рис. 22, A). Сравнение цинк-индуцированной флуоресценции BV, связанного с FP в полосе полиакриламидного геля, показало, что GAF-FP и iRFP670 имеют одинаковое сродство к хромофору *in vitro*.



Рисунок 22 Связывание хромофоров с GAF-FP. А – Сравнение электрофоретической подвижности и связывания BV с GAF-FP и iRFP670. Показаны изображения геля, окрашенного Кумасси бриллиантовым синим или демонстрирующего цинк-индуцированную флуоресценцию тетрапирролов. Б – анализ ковалентного связывания BV и PCB с GAF-FP или его Cys110Ser мутантом. В – конкурентное связывание BV и PCB с апоформой GAF-FP. Штриховая линия – 50% насыщение GAF-FP BV. Пунктирная линия – соотношение концентраций BV и PCB в растворе, с 50% насыщение GAF-FP BV.

Для подтверждения того, что ковалентное связывание хромофоров происходит посредством взаимодействия с цистеиновым остатком в позиции 110 (нумерация аминокислотного остатка приведена для GAF-FP; Cys252 в GAF домене PAS-GAF-FP), он был заменен на сериновый остаток. Затем GAF-FP и его Cys110Ser мутант экспрессировали в бактериях в присутствии BV или PCB. После очистки FP мы провели анализ препаратов FP методом электрофореза по Лэммли. Анализ цинк-индуцированной флуоресценции тетрапирролов показал, что как BV, так PCB не связываются с Cys110Ser мутантом GAF-FP ковалентно. На основе этих данных был сделан вывод, что именно Cys110 ответственен за ковалентное связывание хромофоров GAF-FP (рис. 22, Б).

66

Различия в сродстве GAF-FP к BV и к PCB мы оценивали методом конкурентного связывания, заключающимся в инкубации очищенной апоформы GAF-FP со смесью хромофоров в различном соотношении последних (от 1 до 100). Соотношение между BV и PCB, связавшимися с белком после инкубации, определяли спектрофотометрически, благодаря различию спектров поглощения двух форм GAF-FP (рис. 21, A). Таким образом мы определили, что апобелок связывает PCB в 1.75 раз эффективнее, чем BV. На основе сравнения литературными данными, которые показывают, что конструкты на основе нативных PAS и GAF доменов BphP связывают BV в 4 раза более эффективно, чем PCB [30], можно заключить, что в результате мутагенеза GAF-FP потерял специфичность в выборе тетрапирролов.

3.1.3. Физико-химиеские и биохимические свойства GAF-FP

Следующим этапом работы стало определение биохимических свойств GAF-FP. В качестве контроля был использован iRFP670. Анализ pH зависимости флуоресценции iRFP670 и GAF-FP с различными хромофорами проводили с использованием набора буферных растворов с заданным рН (рис. 23, А). Мы обнаружили, что, в отличие от двухдоменного ближнеинфракрасного FP, GAF-FP имеет колоколообразную зависимость интенсивности флуоресценции. Максимум интенсивности приходится на pH 6.0, как и у iRFP670. С увеличением значений pH интенсивность флуоресценции как GAF-FP—BV, так и GAF-FP—PCB быстро снижется, в то время как интенсивность флуоресценции iRFP670 снижается не более чем на 15 %. Два перехода GAF-FP из нефлуоресцентного состояния во флуоресцентное состояние и обратно можно охарактеризовать двумя константами диссоциации-ассоциации (pKa): при pH 4.5 (pKa₁) и при pH 8.0 (pKa₂) (табл. 3), в то время как iRFP670 имеет pKa только при низких значениях pH 4.5 [2, 177]. Дополнительная pKa GAF-FP и более резкий наклон кривой зависимости интенсивности флуоресценции от pH свидетельствуют, что удаление PAS домена привело к снижению стабильности FP в растворе в целом и особенно при высоких значениях pH. Вероятно, удаление PAS домена сделало хромофор GAF-FP более доступным для воздействия растворителя [32, 39], что оказало значительное влияние на рН зависимость флуоресценции. Тем не менее, при физиологических значениях pH 7.2 GAF-FP обладает 70 % от максимальной интенсивности флуоресценции, что не ограничивает возможности его применения для мечения клеток бактерий и животных. Измерение спектров возбуждения флуоресценции и флуоресценции GAF-FP при различных pH раствора показало (рис. 23, Б), что полученная нами зависимость интенсивности флуоресценции от pH (рис. 23, А) не вызвана смещением спектров при изменении рН.



Рисунок 23 Зависимость флуоресценции GAF-FP—BV и GAF-FP—PCB от pH в сравнении с iRFP670. А – Кривые зависимости интенсивности флуоресценции (ИФ) от pH с шагом в 1 ед. в диапазоне от 2 до 10 включительно. Б –зависимость спектров возбуждения флуоресценции и флуоресценции GAF-FP—BV от pH (*кривая 1* – pH = 6; *кривая 2* – pH = 5; *кривая 3* – pH = 7; *кривые 4-5* – pH = 4, 8; *кривые 6-10* – pH = 2, 3, 9, 10).

Для исследования скорости сворачивания и созревания GAF-FP в бактериальных клетках в сравнении с iRFP670 проводили наблюдение за ростом интенсивности флуоресценции бактерий после короткой индукции синтеза FP. Время достижения половины от максимальной интенсивности флуоресценции как для iRFP670, так и для GAF-FP с различными хромофорами находится в пределах от 3.5 до 4.0 ч (табл. 3, рис. 24, А) [177].

Фотообесцвечивание GAF-FP в культуре бактериальных клеток выявило, что и GAF-FP— BV и GAF-FP—PCB обладают значительно более высокой фотостабильностью, чем iRFP670 (табл. 3, рис. 24, Б). Фотообесцвечивание GAF-FP обладает сложной кинетикой, состоящей из двух компонент. В течение первых 200 с происходит быстрое падение интенсивности флуоресценции до 80 %, которое затем значительно замедляется и остается на высоком уровне в течение более 2000 с. Значительные отличия в кинетике фотообесцвечивания GAF-FP и iRFP670 указывают на то, что, вероятно, в бактериях GAF-FP представлен двумя фракциями белка, обладающими различной фотостабильностью.

68



Рисунок 24 Скорость созревания и стабильности GAF-FP в бактериальной культуре. А –кинетика роста флуоресценции GAF-FP—BV и GAF-FP—PCB в бактериальной культуре при 37 °C в сравнении с iRFP670. Б – кинетика фотообесцвечивания GAF-FP—BV и GAF-FP—PCB в сравнении с iRFP670.

Изучение олигомерного состояния очищенного белка проводили методом гельфильтрации на носителе Superdex-200. Для этого очищенный GAF-FP—BV с полигистидиновым N-пептидом нанесли на хроматографическую колонку, откалиброванную стандартами молекулярных масс. Анализ хроматограммы продемонстрировал, что GAF-FP элюируется одним основным пиком, соответствующим молекулярной массе мономера 20 кДа (рис. 25) [177]. Таким образом было экспериментально подтверждено, что введенные ранее мономеризующие мутации, представляющие собой замену гидрофобных аминокислотных остатков на заряженные аминокислотные остатки, эффективно препятствуют взаимодействию молекул GAF-FP и могут является эффективным способом для мономеризации других FP на основе BphP.



Рисунок 25 Гель-фильтрация GAF-FP—BV на носителе Superdex-200. *На врезке* приведен калибровочный график. Относительный объем элюции, определяемый как объем элюции FP, деленный на мертвый объем хроматографической колонки, для GAF-FP—BV составил 1.9

Для того чтобы определить влияние кислорода на процесс присоединения хромофора, GAF-FP экспрессировали в бактериальной культуре в отсутствии доступа кислорода. В качестве контроля были использованы широко применяемые GFP-подобные FP EGFP и mCherry, для созревания хромофоров которых требуется молекулярный кислород [1]. Экспрессия GAF-FP в анаэробных условиях выявила его способность к образованию холобелка в отсутствии кислорода в отличие от EGFP и mCherry (рис. 26). GAF-FP—BV и GAF-FP—PCB достигли 82 и 60 % от максимально яркости флуоресценции в анаэробных условиях, в то время как яркость GFP-подобных FP не превысила 10 % [177]. Способность связывать хромофор в отсутствии кислорода является значительным преимуществом для биомаркеров, поскольку позволяет применять их в таких условиях, как, например, растущие опухоли, доступ кислорода в которые ограничен из-за отсутствия развитого кровоснабжения [178]. В перспективе эта особенность созревания GAF-FP может расширить применение и других FP на основе BphP там, где применение GFP-подобных FP будет затруднено из-за недостатка кислорода.



Рисунок 26 Эффективность созревания GAF-FP—BV и GAF-FP—PCB в анаэробных условиях в сравнении с флуоресцентными белками EGFP и mCherry. Приведен процент от максимальной интенсивности флуоресценции (ИФ), которой достигают флуоресцентные белки в анаэробных условиях.

Суммируя результаты анализа биохимических свойств GAF-FP, можно заключить, что новый ближнеинфракрасный FP обладает рядом уникальных свойств, уступая другим ближнеинфракрасным FP на основе BphP только в pH стабильности.

3.1.4. Структура GAF-FP и ее устойчивость к пептидным вставкам

Следующей задачей стало исследование структуры GAF-FP и ее стабильности. Для решения этой задачи был использован метод создания библиотеки мутантов целевого белка, содержащих небольшие (из пяти аминокислот) пептидные вставки в случайном месте последовательности этого белка [179]. Следуя протоколу, мы создали библиотеку мутантов GAF-FP со случайными пептидными вставками, которую экспрессировали в бактериях в присутствии BV. На основе яркости флуоресценции колоний бактерий мы отобрали наиболее яркие клоны. В виду того, что аминокислотная последовательность вставок различалась, они были заменены на пептидные вставки с одинаковой последовательностью. Четыре наиболее ярких мутанта GAF-FP были названы GAF-FP i1, i2, i3 и i4 по положению пептидной вставки в аминокислотной последовательностью. 2010 вставки в аминокислотной последовательностью.



Рисунок 27 Выравнивание аминокислотных последовательностей GAF-FP и его мутантов с пептидными вставками: GAF-FP i1, GAF-FP i2, GAF-FP i3 и GAF-FP i4. Пептидные вставки отмечены *черными буквами на синем фоне*. Положение α-спиралей в структуре GAF-FP отмечено *красными кривыми*. Положение β-слоев в структуре GAF-FP отмечено *желтыми стрелками*.

Анализ биохимических свойств мутантов GAF-FP с пептидными вставками и с различными хромофорами не выявил значительных отличий от свойств GAF-FP (табл. В.1), что свидетельствует о значительной устойчивости структуры GAF-FP. В перспективе найденные позиции в аминокислотной последовательности GAF-FP можно будет использовать для создания флуоресцентных сенсоров, например, путем замены пептидных вставок на сайты различных протеаз [84] или путем создания круговых пермутантов GAF-FP и сенсоров на их основе [179].

В результате анализа положения пептидных вставок в аминокислотной последовательности GAF-FP относительно положения элементов его вторичной структуры (рис. 27), был сделан вывод, что пептидные вставки, не обладавшие сильным влиянием на флуоресценцию GAF-FP, находятся в неструктурированных участках аминокислотной последовательности (рис. 28). Поскольку для определения положения элементов вторичной структуры была использована пространственная структура исходного GAF домена *Rp*BphP1, был сделан вывод, что GAF-FP в процессе мутагенеза созранил вторичную и, вероятно, третичную структуры полипептидной цепи неизменными.


Рисунок 28 Пространственная структура GAF домена *Rp*BphP1, построенная на основе данных рентгеноструктурного анализа (Protein Data Bank: 4GW9) [35].

3.1.5. Экспрессия GAF-FP в клетках млекопитающих

Для того чтобы оценить возможности применения GAF-FP в *in vivo* исследованиях, была проведена его экспрессия в клетках линии HeLa, интенсивность флуоресценции которых оценивали методами проточной цитофлуориметрии и эпифлуоресцентной микроскопии. На первом этапе, чтобы способствовать экспрессии GAF-FP в клетках млекопитающих, был сконструирован белок слияния GAF-FP и sfGFP [160] (от англ. superfolder GFP), содержащий гибкий линкер из 20 аминокислотных остатков между белками. Анализ флуоресценции клеток, экспрессирующих GAF-FP—sfGFP проводили через 48 ч после трансфекции. Поскольку концентрация BV в клетках могла быть недостаточной для насыщения всего синтезированного апобелка, а PCB в клетках млекопитающих не синтезируется, часть клеток культивировали в среде, содержащей 10 мкМ BV или PCB, введенныех за 24 ч до анализа. Согласно данным цитофлуориметрии, клетки, экспрессирующие GAF-FP без введения экзогенного хромофора, были в 12 раз ярче, чем контрольные клетки, не подвергавшиеся трансфекции, то есть соответствующие уровню автофлуоресценции (рис. 29, А). При введении экзогенных хромофоров яркость флуоресценции клеток, экспрессирующих GAF-FP, выросла в 65 и 45 раз для BV и PCB, соответственно [177].



Рисунок 29 Экспрессия GAF-FP в клетках животных. А – сравнение ближнеинфракрасной флуоресценции (БИФ) клеток линии HeLa, экспрессирующих GAF-FP–sfGFP, методом проточной цитофлуориметрии. Б – фотографии БИФ и зеленой флуоресценции (ЗФ) живых клеток линии HeLa, экспрессирующих GAF-FP–sfGFP. Время экспозиции для крайнего левого изображения в ближнеинфракрасном канале было в 6.5 раз больше, чем для центрального и крайнего правого изображений. *Масштабный отрезок* равен 20 мкм.

Исследование клеток линии HeLa, экспрессирующих GAF-FP, методом эпифлуоресцентной микроскопии продемонстрировало равномерное распределение сигналов зеленой и ближнеинфракрасной флуоресценции в цитоплазме клеток, что свидетельствует об

отсутствии агрегатов GAF-FP—sfGFP в клетке (рис. 29, Б). Яркое окрашивание ядра клеток указывает на то, что небольшой молекулярный вес GAF-FP даже в составе белка слияния позволяет ему свободно преодолевать ядерную мембрану.

3.2. Флуоресцентные и биолюминесцентные биомаркеры на основе бактериальных фитохромов

3.2.1. Создание химерных белков на основе GAF-FP и RLuc8

Биолюминесценция широко используется в биомедицине и является эффективным инструментом для обнаружения и наблюдения за малыми количествами исследуемых объектов, например, метастазирующих опухолевых клеток [139, 140]. Основным преимуществом биолюминесценции перед флуоресценцией является практически полное отсутствие фонового сигнала, вызываемого автофлуоресценцией [138]. Одной из перспективных стратегий создания генетически кодируемых источников с различными максимумами спектров биолюминесценции стало создание химерных белков, использующих механизм резонансного переноса энергии, где в качестве донора энергии выступает люцифераза, а в качестве акцептора – FP.

Создание ближнеинфракрасной химерной люциферазы на основе нового однодоменного мономерного ближнеинфракрасного биомаркера GAF-FP стало возможным благодаря его широкому спектру поглощения. Поскольку на данный момент выбор ярких источников биолюминесценции, спектры которых имеют значительное перекрывание с длинноволновой полосой поглощения хромофора GAF-FP, значительно ограничен, в качестве донора энергии для возбуждения ближнеинфракрасной флуоресценции GAF-FP была использована яркая мономерная модифицированная люцифераза *Renilla reniformis* (RLuc8). Благодаря тому, что спектр биолюминесценции RLuc8 с целентеразин-подобным коммерчески доступным субстратом ProlumePurple II имеет максимум биолюминесценции при 400 нм, он значительно перекрывается с коротковолновой полосой поглощения хромофора GAF-FP—BV в области от 380 до 400 нм (рис. 30, А). Учитывая, что, согласно литературным данным [12, 13], эффективность резонансного переноса энергии от возбуждённого состояния субстрата люциферазы к хромофору FP сильно зависит от расстояния между белками и их ориентации друг относительно друга, были созданы несколько химерных конструктов с различной очередностью белков и длиной линкера между ними. Таким образом было получено 6 химерных белков.

Для выбора оптимальной конструкции была проведена оценка интенсивности их ближнеинфракрасной биолюминесценции. Для этого химерные белки экспрессировали в клетках бактерий, после чего бактерии лизировали и добавляли субстрат. Проведенный нами анализ показал, что наиболее ярким оказался конструкт, обладающий наименьшим линкером, состоящим из двух аминокислот, и с люциферазой, расположенной на C-конце химерного белка (рис. 30, Б). Полученный химерный белок был назван GAF-FP—RLuc8 [177].



Рисунок 30 Резонансный перенос энергии и отбор химерных белков на основе GAF-FP и RLuc8. А – спектральная картина резонансного переноса энергии биолюминесценции от RLuc8 к GAF-FP. *Кривая 1* – спектр поглощения GAF-FP—BV. *Кривая 2* – спектр биолюминесценции RLuc8. *Кривая 3* – спектр флуоресценции GAF-FP—BV. Б – поиск оптимальной структуры химерного белка. Для сравнения использовали интенсивность ближнеинфракрасной биолюминесценции (БИБ) химерных белков, экспрессированных в бактериях. Образец с максимальным сигналом был принят за 100%, в то время как образец с минимальным сигналом был принят за 0%.

3.2.2. Биолюминесцентный и флуоресцентный имиджинг GAF-FP—RLuc8 в мышином фантоме

Следующей задачей стала оценка практического применения GAF-FP—RLuc8 в сравнении с другими биомаркерами, для чего был использован фантом мыши, имитирующий поглощение, светорассеяние и автофлуоресценцию тканей животного. Этот фантом уже ранее использовался для сравнения свойств ближнеинфракрасных FP на основе BphP и позволил провести их всестороннее сравнение, например, с дальнекрасными GFP-подобными FP при проведении флуоресцентного имиджинга [2].

Для проведения эксперимента с мышиным фантомом равные количества очищенных белков (GAF-FP—RLuc8, смесь GAF-FP с RLuc8 или только RLuc8) смешивали с субстратом, немедленно помещали в фантом на глубину 7.0 или 18.1 мм от поверхности фантома и производили биолюминесцентный и флуоресцентный имиджинг в различных спектральных каналах (рис. 31, A, B). На основе полученных изображений для исследуемых проб были рассчитаны интенсивность их ближнеинфракрасной биолюминесценции и соотношение их

77

сигналов ближнеинфракрасной флуоресценции к сигналу автофлуоресценции фантома. Было установлено, что в канале 680/20 нм биолюминесценция GAF-FP—RLuc8 в 10 раз превосходит яркость смеси GAF-FP с RLuc8 и более чем в 100 раз яркость RLuc8 (рис. 31, Б). В то же время ближнеинфракрасная флуоресценция GAF-FP обладает высоким соотношением сигнала флуоресценции к сигналу автофлуоресценции (рис. 31, Г) [2]. Для химерного белка это соотношение составило 2.3 и 1.2 для глубин в 7.0 и 18.1 мм, соответственно.



Рисунок 31 Оценка оптических свойств GAF-FP—RLuc8 в мышином фантоме. А – биолюминесцентный имиджинг белков в мышином фантоме. *Цветная шкала* обозначает интенсивность ближнеинфракрасной биолюминесценции (БИБ, фотон·c⁻¹·cм⁻²·cp⁻¹). Б – сравнение интенсивностей БИБ белков внутри мышиного фантома на различной глубине. В – флуоресцентный имиджинг белков в мышином фантоме. *Цветная шкала* обозначает

интенсивность ближнеинфракрасной флуоресценции (БИФ, (фотон·c⁻¹·cм⁻²·cp⁻¹)/(мкВт·см⁻²)). Г – сравнение отношений интенсивности флуоресценции (ИФ) к интенсивности автофлуоресценции (автоИФ) для флуоресцентных белков внутри мышиного фантома на различной глубине. *Красными прямоугольниками* отмечены области, для которых рассчитывались интенсивности биолюминесценции или флуоресценции.

3.2.3. Создание химерных белков на основе iRFP670, iRFP720 и RLuc8

Обнаружив на примере GAF-FP-RLuc8 уникальный подход к получению новых ближнеинфракрасных химерных люцифераз, было принять решение расширить их палитру путем создания химерных белков на основе iRFP670 и iRFP720 [2]. Эти двухдоменные флуоресцентные белки, полученные ранее в лаборатории В.В. Верхуши, проявили себя как яркие, стабильные и хорошо спектрально различимые ближнеинфракрасные биомаркеры для биомедицинских исследований. Следуя методике, апробированной при получении GAF-FP-RLuc8, в первую очередь был создан набор химерных конструктов на основе iRFP670, iRFP720 и RLuc8, различающихся по очередности белков и длине линкера между ними. Таким образом было получено 8 химерных белков. Для того чтобы выбрать наиболее яркий химерный белок, была произведен анализ интенсивности их флуоресценции и биолюминесценции относительно исходных белков в клетках линии HeLa методами проточной цитофлуориметрии и биолюминесцентного имиджинга in vitro (рис. 32, А). Результаты анализа химерных белков выявили, что конструкты с относительно более длинным линкером из 7 аминокислот обладают более высокой интенсивность сигнала, чем конструкты с линкером из 2 аминокислот. Поскольку эти данные не согласовывались с данными, полученными для GAF-FP—RLuc8, была выдвинута гипотеза, что высокая яркость биолюминесценции конструктов с более длинным линкером вызвана тем, что проводилось измерение биолюминесценцию конструктов для всех длин волн, ближнеинфракрасную биолюминесценцию iRFP, так И включая как фиолетовую биолюминесценцию RLuc8, необходимую для сравнения с биолюминесценцией свободной RLuc8. Для сравнения интенсивности только ближнеинфракрасной биолюминесценции химерных белков, как это было сделано при отборе GAF-FP-RLuc8, была измерена относительная эффективность резонансного переноса энергии между возбужденным состоянием субстрата RLuc8 и хромофором iRFP. На данном этапе оценка абсолютных значений эффективности резонансного переноса энергии не проводилась из-за большого количества образцов. Анализ относительной эффективности резонансного переноса энергии (в отн. ед.) между донором и акцептором в химерных белках показал, что, как и ожидалось, конструкты с относительно более коротким линкером и люциферазой на С-конце химерного белка обладают большей эффективностью (подчеркнуты, рис. 32, Б). Новые ближнеинфракрасные химерные люциферазы с коротким линкером были названы iRFP670—RLuc8 и iRFP720—RLuc8 [134].

Измерение спектров ближнеинфракрасной биолюминесценции iRFP670—RLuc8 и iRFP720—RLuc8 позволило убедиться, что слияние люциферазы и ближнеинфракрасных FP не привело к изменению спектров последних. Результаты измерения спектров при помощи набора фильтров с узкой полосой пропускания также свидетельствуют о том, что сигналы ближнеинфракрасной биолюминесценции химерных люцифераз хорошо спектрально различимы (рис. 32, В).



Рисунок 32 Создание ближнеинфракрасных люцифераз на основе iRFP670 и iRFP720. А – интенсивность флуоресценции (ИФ) химерных конструктов, определенная методом проточной цитофлуориметрии и отложенная относительно интенсивности их биолюминесценции (ИБ). Яркость исходных белков (iRFP670, iRFP720 и RLuc8) принята за 100%. Б – оценка относительной эффективности резонансного переноса энергии (ЭРПЭ) биолюминесценции в

химерных конструктах. В – спектры ближнеинфракрасной биолюминесценции (БИБ) iRFP670— RLuc8 (*серая кривая*) и iRFP720—RLuc8 (*красная кривая*).

3.2.4. Выбор субстрата для фиолетовой биолюминесценции RLuc8

Прежде чем перейти к дальнейшим экспериментам с новыми ближнеинфракрасными химерными люциферазами, было необходимо выбрать субстрат RLuc8, обеспечивающий наиболее высокую эффективность резонансного переноса энергии. Первоначально выбранный нами коммерчески доступный целентеразин-подобный субстрат ProlumePurple II (PPII) вызывал биолюминесценцию RLuc8 с наиболее коротковолновым максимумом при 400 нм (табл. 4), что, предположительно, обеспечивало наибольшее перекрывание спектра биолюминесценции RLuc8 и спектра поглощения GAF-FP (рис. 30, А). Однако, принимая во внимание сильные различия в яркости фиолетовой биолюминесценции RLuc8 с различными субстратами серии ProlumePurple при незначительных различиях в максимумах их спектров биолюминесценции (табл. 4), было решено провести дополнительный анализ параметров биолюминесценции ближнеинфракрасных химерных люцифераз с различными субстратами.

| Название субстрата | Prolume Purple (PPI) | Prolume Purple II (PPII) | Prolume Purple III (PPIII) | Prolume Purple IV (PPIV) |
|---|---|---|--|--|
| Рациональная формула | C ₂₉ H ₂₅ N ₃ O ₃ | C ₂₈ H ₂₅ N ₃ O ₃ | C ₂₉ H ₂₄ FN ₃ O ₂ | C ₂₇ H ₂₂ IN ₃ O ₂ |
| Молекулярный вес, Да | 463.5 | 451.5 | 465.5 | 547.4 |
| Максимум биолюминесценции с RLuc8, нм | 405 | 400 | 410 | 410 |
| Стабильности в фосфатно– солевом буфере при 25 °С, мин, не менее | 20 | 15 | 10 | 5 |
| Яркость биолюминесценции RLuc8, нормированная на яркость биолюминесценции с субстратом 400a, или DeepBlueC | 13 | 5 | 10 | |

Таблица 4 – Целентеразин-подобные субстраты для фиолетовой биолюминесценции RLuc8

В первую очередь была исследована кинетика биолюминесценции химерных люцифераз с различными субстратами серии ProlumePurple в лизатах клеток линии HeLa, экспрессирующих iRFP720—RLuc8 (рис. 33, A) [134]. Было установлено, что PPIII и PPIV вызывают наиболее короткоживущую биолюминесценцию iRFP720—RLuc8 с временами полужизни порядка 48 с,

что является значительным недостатком при измерении биолюминесценции как *in vitro*, так и *in vivo*. РРІ и РРІІ вызывали более долгоживущую биолюминесценцию iRFP720—RLuc8 с временами полужизни порядка 153 и 217 с, соответственно. Поскольку технические ограничения не позволяют регистрировать сигнал непосредственно после смешивания субстрата и люциферазы, более медленная кинетика биолюминесценции способна обеспечить накопление большего сигнала биолюминесценции.



Рисунок 33 Оценка свойств субстратов для фиолетовой биолюминесценции RLuc8. А – кинетика изменения интенсивности биолюминесценции (ИБ) лизатов клеток линии HeLa, экспрессирующих iRFP720—RLuc8, с различными субстратами RLuc8 серии ProlumePurple. Б - оценка эффективности резонансного переноса энергии (ЭРПЭ) биолюминесценции в химерных конструктах с различными субстратами серии ProlumePurple.

Исследование эффективности резонансного переноса энергии между донором и акцептором в ближнеинфракрасных химерных люциферазах iRFP670—RLuc8 и iRFP720— RLuc8 с различными субстратами серии ProlumePurple показало, что последние не имеют значительных отличий по этому параметру (рис. 33, Б) [134].

Известно, что целентеразин-подобные субстраты обладают низкой растворимостью в водных растворах, что оказывает влияние на их эффективность в *in vivo* экспериментах. По этой причине, было проведено исследование стабильности субстратов серии ProlumePurple в фосфатно–солевом буферном растворе (табл. 4) [134]. Для этого субстраты, хранившиеся в спиртовом растворе в концентрации 1 мг/мл, растворяли в фосфатно–солевом буферном растворе до конечной концентрации 50 мкМ и наблюдали за появлением желтого осадка субстрата. По данным этого эксперимента было установлено, что стабильность PPI значительно превосходит стабильность других субстратов (табл. 4).

Таким образом, на основе данных об устойчивости субстратов в водных растворах и данных кинетики биолюминесценции для дальнейших экспериментов в клетках и *in vivo* был выбран субстрат ProlumePurple PPI. Примечательно, что спектральное расстояние между максимумом биолюминесценции донора (PPI—RLuc8, 405 нм) и биолюминесценцией наиболее длинноволнового акцептора (iRFP720—BV, 720 нм) составил 315 нм [134].

3.2.5. Многоцветный биолюминесцентный и флуоресцентный имиджинг клеток млекопитающих с использованием ближнеинфракрасных химерных люцифераз

Для изучения возможностей iRFP670—RLuc8 и iRFP720—RLuc8 в многоцветном имиджинге клеток млекопитающих, химерные люциферазы экспрессировали в клетках линии HeLa, расположенных в 12-луночном планшете. В качестве дополнительного цвета биолюминесценции была использована широко применяемую люциферазу FLuc с максимумом биолюминесценции при 562 нм. В качестве дополнительного цвета флуоресценции и для контроля эффективности трансфекции был использован EGFP. Имиджинг 12-луночного планшета с клетками, экспрессирующими перечисленные выше биомаркеры, проводили с использованием чувствительную систему для *in vivo* имиджинга IVIS Spectrum, обладающей возможностью спектрального разложения сигналов и, тем самым, позволяющей различать перекрывающиеся сигналы биолюминесценции или флуоресценции. Таким образом мы смогли различить три цвета биолюминесценции (Fluc, iRFP670—RLuc8 и iRFP720—RLuc8) и три цвета флуоресценции (EGFP, iRFP670—RLuc8 и iRFP720—RLuc8) (рис. 34, A) [134].

По соотношениям сигналов биолюминесценции и флуоресценции в различных каналах был рассчитан контраст двухцветного имиджинга ближнеинфракрасных химерных люцифераз в клетках млекопитающих (рис. 34, Б-В). Определение контраста двуцветного имиджинга было важно для понимания насколько хорошо можно различать объекты, меченные двумя разными ближнеинфракрасными химерными люциферазами, при помощи биолюминесцентного и флуоресцентного имиджинга. Было установлено, что биолюминесцентный имиджинг iRFP670-RLuc8 и iRFP720—RLuc8 обладает контрастом в 5.0 и 2.5 раза в каналах регистрации флуоресценции 680/20 и 720/20 нм, соответственно, что советует контрасту в 12.5 раз при использовании двух каналов. Флуоресцентный имиджинг iRFP670—RLuc8 и iRFP720—RLuc достигает контраста в 9.5 и 2.3 раза в каналах регистрации флуоресценции 605/680 и 675/740 нм, соответственно, что советует контрасту в 21.9 раз при использовании двух каналов. Таким образом, при одновременный биолюминесцентный И флуоресцентный имиджинге ближнеинфракрасных химерных люцифераз с использованием двух каналов биолбминесценции и двух каналов флуоресценции может достигать контраста в 274 раза, что явлется несомненным преимуществом при созданиисистем высокопроизводительного отбора клеток, например, для поиска новых лекарств [72]. Кроме этого, iRFP670—RLuc8 и iRFP720—RLuc8 продемонстрировали высокие соотношения сигналов интенсивности флуоресценции к сигналу автофлуоресценции при флуоресцентном имиджинге клеток (рис. 34, Г).



Рисунок 34 Многоцветный флуоресцентный и биолюминесцентный имиджинг клеток животных. А – биолюминесцентные и флуоресцентные изображения 12-луночного планшета с клетками линии HeLa, трансфицированными плазмидами, кодирующими iRFP670—RLuc8, iRFP720—RLuc8, FLuc и EGFP, после применения процедуры спектрального разложения. Б – сравнение интенсивности биолюминесценции (ИБ, фотон · c⁻¹· cm⁻²· cp⁻¹) люцифераз в различных каналах. В – сравнение интенсивности ближнеинфракрасной флуоресценции (БИФ, (фотон · c⁻¹· cm⁻²· cp⁻¹)/(мкВт· cm⁻²)) iRFP670—RLuc8 и iRFP720—RLuc8 для различных сочетаний каналов возбуждения/регистрации флуоресценции. Г – сравнение отношений интенсивности флуоресценции (автоИФ) для iRFP670—RLuc8 и iRFP720—RLuc8 и iRFP720—RLuc8 и iRFP720—RLuc8 и iRFP670—RLuc8 и iRFP670—RLuc8 и iRFP670—RLuc8 и интенсивности флуоресценции.

3.2.6. Определение чувствительности биолюминесцентного и флуоресцентного имиджинга *in vivo* с использованием ближнеинфракрасных химерных люцифераз

Низкие значения фонового сигнала биолюминесценции являются определяющим фактором высокой чувствительности биолюминесцентного имиджинга, широко применяемого в качестве неинвазивного способа изучения молекулярно-биологических процессов и для наблюдения за ростом и метастазированием раковых опухолей в животных. Для определения пределов чувствительности этого метода и была поставлена задача измерить минимальное количество клеток, меченных iRFP670—RLuc8 или iRFP720—RLuc8, которое можно обнаружить в мышах при помощи биолюминесцентного и флуоресцентного имиджинга.

В качестве объекта для анализа были использовали клетки линии MTLn3, происходящей из клеток аденокарциномы молочных желез крысы, стабильно экспрессирующие iRFP670— RLuc8 или iRFP720—RLuc8. Этот агрессивный вид рака является хорошо изученной моделью для анализа и сравнения свойств биомаркеров [2].

Прежде чем приступить к *in vivo* имиджингу было решено вернуться к выбору субстрата RLuc8, обеспечивающего наибольшую эффективность резонансного переноса энергии и яркость биолюминесценции. Поскольку в *in vitro* экспериментах субстраты ProlumePurple PPI и PPII показали близкие значения эффективности резонансного переноса и продемонстрировали близкую кинетику биолюминесценции, был проведен дополнительный анализ их кинетики биолюминесценции *in vivo*. Для этого был измерен сигнал биолюминесценции 10⁶ клеток, инъецированных мышам подкожно в область спины, с каждым из двух субстратов (рис. 35) [134].



Рисунок 35 Кинетика изменения интенсивности биолюминесценции (ИБ, фотон·c⁻¹·cм⁻²·cp⁻¹) клеток линии MTLn3, экспрессирующих iRFP720—RLuc8 и инъецированных мышам подкожно, с субстратами RLuc8 серии ProlumePurple PPI и PPII.

Анализ кинетики биолюминесценции клеток, экспрессирующих iRFP720—RLuc8, с субстратами ProlumePurple PPI и PPII *in vivo* показад, что несмотря на близкую форму кривых кинетики биолюминесценции, яркость биолюминесценции iRFP720—RLuc8 с субстратом PPI в 3.2 раза превосходит яркость биолюминесценции той же люциферазы с PPII. Эти данные позволили окончательно остановить выбор на субстрате PPI, обеспечивающим наиболее оптимальные условия для проведения биолюминесцентного имиджинга клеток внутри организма мышей.

На первом этапе определения пределов чувствительности был проведен флуоресцентный и биолюминесцентный имиджинг от 10^2 до 10^6 клеток, инъецированных мышам подкожно в область спины. Для этого были приготовлены суспензии с известным количеством клеток на основе клеточной среды. После инъекции суспензий клеток проведен их биолюминесцентный и флуоресцентный имиджинг (рис. 36 А–Б). Поскольку по литературным данным известно, что в результате иммунной реакции и механического стресса в процессе подготовки большое количество инъецированных клеток гибнет в течении первых 12 ч после инъекции [119], имиджинг мышей проводили не более чем через 2 ч после инъекции. По полученным данным были построены калибровочные графики, показывающие зависимость интенсивности биолюминесценции или флуоресценции от количества введенных клеток (рис. 35, В-Г). Из предел графиков было установлено, что чувствительности биолюминесценции ближнеинфракрасных химерных люцифераз при имиджинге меченых ими подкожно расположенных клеток лежит в пределах от 10^3 до 10^4 клеток (рис. 36 A, B), что на порядок превышает чувствительность флуоресценции ближнеинфракрасных химерных люцифераз при имиджинге тех же клеток (рис. 36 Б, Г).



Рисунок 36 Определение пределов чувствительности биолюминесцентного и флуоресцентного *in vivo* имиджинга под поверхностью ткани с использованием химерных люцифераз. А – биолюминесцентный имиджинг клеток линии MTLn3, инъецированных мышам подкожно в область спины и экспрессирующих iRFP670—RLuc8 или iRFP720—RLuc8. *Цветная шкала* обозначает интенсивность ближнеинфракрасной биолюминесценции (БИБ, фотон · c⁻¹· cm⁻²· cp⁻¹). *Желтые окружности* обозначают места проведения инъекций. Б – флуоресцентный имиджинг тех же клеток. *Цветная шкала* обозначает интенсивность ближет интенсивность ближней биолюминесценции (БИБ, фотон · c⁻¹· cm⁻²· cp⁻¹). *Желтые окружности* обозначают места проведения инъекций. Б – флуоресцентный имиджинг тех же клеток. *Цветная шкала* обозначает интенсивность ближней фракрасной флуоресценции (БИФ, (фотон · c⁻¹· cm⁻²· cp⁻¹)/(мкВт· cm⁻²)). В – зависимость БИБ от количества клеток, инъецированных мышам подкожно. Г – зависимость БИФ от количества клеток, инъецированных мышам подкожно.

На основе различий в биолюминесцентном и флуоресцентном имиджинге подкожно расположенных клеток была выдвинута гипотеза, что биолюминесценция будет обладать еще большим преимуществом перед флуоресценцией при имиджинге клеток, расположенных

87

глубоко в тканях. Для подтверждения этой гипотезы, был проведен биолюминесцентный и флуоресцентный имиджинг от $3 \cdot 10^3$ до $3 \cdot 10^6$ клеток линии MTLn3, экспрессирующих iRFP670— RLuc8 или iRFP720—RLuc8 и расположенных в легких мышей (рис. 37, А–Б) [134]. Для того чтобы доставить раковые клетки в легки мышей был использован широко известный метод инъекции клеток через хвостовую вену мышей [119]. При инъекции клеток подобным образом они сначала попадают в сосуды печени, после чего направляются к сердцу и по малому кругу кровообращения попадают в тонкую сеть капилляров легких, в которых большая часть из них задерживается.

Как и в случае инъекции клеток подкожно, были приготовлены суспензии с известным количеством клеток. которые затем инъецировали мышам через хвостовую вену. Биолюминесцентный и флуоресцентный имиджинг также проводили не более чем через 2 ч после инъекции клеток. Согласно полученным данным, чувствительность флуоресцентного имиджинга iRFP670—RLuc8 или iRFP720—RLuc8 оказалась недостаточной для анализа исследуемого диапазона количества клеток, расположенных в легких. В то же время чувствительность биолюминесцентного имиджинга iRFP670—RLuc8 или iRFP720—RLuc8 позволила построить калибровочные графики (рис. 37, В) [134]. Измерения проводили в двух режимах: двухцветного имиджинга с использованием нескольких каналов для регистрации биолюминесценции, но более никой чувствительностью, и одноцветного имиджинга с использованием канала без фильтра, что позволило повысить чувствительность за счет регистрации биолюминесценции в более широком диапазоне спектра. Для того чтобы исключить влияние фиолетовой биолюминесценции RLuc8 на определение чувствительности имиджинга в одноцветном режиме, над мышью помещали фильтр, пропускающий свет с длиной волны более 610 нм. По полученным калибровочным графикам удалось определить, что при двухцветном имиджинге химерных люцифераз. с временем экспозиции в каждом канале менее 1 мин, ближнеинфракрасная биолюминесценция позволяет визуализировать порядка 3.10⁵ клеток, экспрессирующих iRFP670—RLuc8 или iRFP720—RLuc8. При одноцветном имиджинге без использования фильтров с узкой полосой пропускания ближнеинфракрасная биолюминесценция позаоляет увидеть порядка 3.10⁴ или 10⁴ клеток, экспрессирующих iRFP670—RLuc8 или iRFP720—RLuc8, соответственно.







Рисунок 37 Определение пределов чувствительности биолюминесцентного и флуоресцентного *in vivo* имиджинга глубоко под поверхностью ткани с использованием химерных люцифераз. Биолюминесцентный имиджинг клеток линии MTLn3, инъецированных мышам через хвостовую вену и экспрессирующих iRFP670—RLuc8 или iRFP720—RLuc8, проводили в двухцветном режиме (A) с использованием нескольких каналов регистрации биолюминесценции или в

одноцветном режиме (Б) с использованием канала регистрации без фильтра. Цветная шкала обозначает интенсивность ближнеинфракрасной биолюминесценции (БИБ, фотон $\cdot c^{-1} \cdot cm^{-2} \cdot cp^{-1}$). Желтые окружности обозначают область грудной клетки мышей. В – зависимость БИБ от количества клеток, расположенных в легких мышей, как при одновременном имиджинге двух конструктов одновременно, так и каждого по-отдельности. Серые линии – зависимость интенсивности сигнала iRFP670—RLuc8 при двухцветном имиджинге. Красные линии – зависимость интенсивности сигнала iRFP670—RLuc8 при двухцветном имиджинге. Синяя линия – зависимость интенсивности сигнала iRFP670—RLuc8 при двухцветном имиджинге. Зеленая линия – зависимость интенсивности сигнала iRFP670—RLuc8 при одноцветном имиджинге.

К сожалению, в настоящее время в литературе отсутствуют данные об аналогичном способе анализа чувствительности биолюминесцентного имиджинга клеток, расположенных глубоко в тканях животных. Однако, продемонстрированная чувствительность биолюминесцентного имиджинга ближнеинфракрасных химерных люцифераз находится на уровне чувствительности таких передовых методов анализа как имиджинг времен жизни флуоресценции, позволяющий визуализировать $1.4 \cdot 10^3$ подкожно расположенных клеток или $5 \cdot 10^4$ клеток, расположенных в легких мышей [119].

3.2.7. Оптические свойства тканей млекопитающих

Для того чтобы объяснить наблюдаемые различия в пределах чувствительности биолюминесцентного *in vivo* имиджинга клеток, расположенных глубоко в тканях, с использованием iRFP670—RLuc8 и iRFP720—RLuc8 (3·10⁴ или 10⁴ клеток, соответственно) и сравнить ее с чувствительностью биолюминесцентного имиджинга других люцифераз, было решено изучить влияние оптических свойств тканей млекопитающих на ослабление света разных длин волн. Для равнения были использовали длины волн, соответствующие максимумам биолюминесценции наиболее широко используемых люцифераз с их природными субстратами (480 нм для Rluc8—целетнеразин и 560 нм для FLuc—D-люциферин), и длины волн максимумов биолюминесценции iRFP670—RLuc8 и iRFP720—RLuc8 (670 и 720 ни, соответственно).

Используя литературные данные [166, 171, 172], были рассчитаны эффективные коэффициенты ослабления в разных тканях для различных длин волн (табл. 2). Используя полученные коэффициенты и уравнение (5) были построены зависимости падения интенсивности излучения различных длин волн в мышечной ткани, ткани молочной железы и ткани легких (рис. 38) [134].



Рисунок 38 Оптические свойства тканей млекопитающих. А – ослабление света различных длин волн при прохождении через мышечную ткань. Б – ослабление света различных длин волн при прохождении через ткань молочной железы. В –ослабление света различных длин волн при прохождении через ткань легких.

При сравнении расстояний оптической проницаемости тканей для различных длин волн было установлено, что в мышечной ткани, оказавшейся наиболее светопроницаемой тканью среди изученных, свет с длиной волны 720 нм проникает на глубину в 1.9, 3.9 и 5.0 раз большую при сохранении 50 % от исходной интенсивности излучения, чем свет с длиной волны 670, 560 и 480 нм, соответственно (рис. 38, А). В богатой липидами ткани молочной железы разница в глубине проникновения света с динами волн 720 нм и 670 нм, при сохранении 50 % от их исходной интенсивности излучения, и в 670 нм, при сохранении 50 % от их исходной интенсивности в 1.4 раза, в то время как свет длин волн 480 и 560 нм проникал на глубину в 12.9 и 8.6 раз меньшую, соответсвенно, чем свет с длиной волны 720 нм (рис. 38, Б). Для ткани легких, самой гетерогенной ткани среди изученных, было установлено, что свет с длиной волны 720 нм проникает на глубину в 1.3, 4.3 и 4.8 раз большую,

при сохранении 50 % от исходной интенсивности излучения, чем свет с длиной волны 670, 560 и 480 нм, соответственно (рис. 38, В). Таким образом, расчётные данные позволяют объяснить различия в чувствительности биолюминесцентного имиджинга клеток, меченных iRFP670— RLuc8 и iRFP720—RLuc8 и расположенных глубоко в тканях. Более того, разница в глубине проникновения ближнеинфракрасного излучения (670 и 720 нм) и излучения видимого диапазона (480 и 560 нм) подтверждает преимущества приминения ближнеинфракрасных биомаркеров, излучающих в ближнеинфракрасном окне прозрачности тканей. На основе рассчитанных данных удалось также определить, что интенсивность биолюминесценции видимого спектрального диапазона а должна превышать интенсивность биолюминесценции ближнего инфракрасного спектрального спектрального диапазона не менее чем в 4 раза, для достижения одинаковой чувствительности имиджинга [134].

3.2.8. Биолюминесцентный и флуоресцентный *in vivo* имиджинг кинетики роста раковых опухолей с использованием iRFP670—RLuc8 и iRFP720—RLuc8

Следующей задачей стало изучение кинетики роста опухолей и их метастазирования с использованием ближнеинфракрасных химерных люцифераз. Для этого $2 \cdot 10^6$ клеток MTLn3, стабильно экспрессирующих iRFP670—RLuc8 или iRFP720—RLuc8, были инъецированы в молочные железы мышей. Эта модель раковой опухоли ранее многократно использовалась для изучения возможностей применения ближнеинфракрасных FP в *in vivo* имиджинге [2, 8, 10]. Наблюдение за ростом опухолей, образующихся на месте инъекции, проводили на протяжении 29 сут путем регулярного биолюминесцентного и флуоресцентного имиджинга (рис. 39).

Полученные данные кинетики роста опухолей показали, что она соответствует профилю, характерному для данного типа клеток и места инъекции [2]. Высокая чувствительность биолюминесцентного и флуоресцентного имиджинга, в также значительный спектральный сдвиг между максимумами биолюминесценции / флуоресценции iRFP670—RLuc8 и iRFP720—RLuc8 позволили проводить двухцветный имиджинг опухолей, начиная от ранних стадий их развития (рис. 39, А–Б, 1 сут) и вплоть до поздних стадий (рис. 39, А–Б, 29 сут). Примечательно, что по усредненным данным биолюминесцентного и флуоресцентного имиджинга группы из 6 мышей опухоли, экспрессирующие iRFP670—RLuc8, обладали более быстрой кинетикой роста, чем опухоли, экспрессирующие iRFP720—RLuc8 (рис. 39, В–Г). Например, в период с 13 по 21 сутки интенсивность биолюминесценции и флуоресценции опухолей, экспрессирующих iRFP670— RLuc8, в 1.2 раза превысила интенсивность сигнала опухолей, экспрессирующих iRFP720— RLuc8. Тем не менее, на 29 сут разница в интенсивностях сигналов между различными видами опухолей значительно сократилась. Предположительно, наблюдаемые явления были вызваны различиями в стабильных линиях клеток MTLn3, экспрессирующих iRFP670—RLuc8 или iRFP720—RLuc8, которые готовились в разное время.



Рисунок 39 Кинетика роста опухолей, экспрессирующих iRFP670—RLuc8 или iRFP720—RLuc8. А – двухцветный биолюминесцентный имиджинг опухолей в молочных железах мыши. Б – двухцветный флуоресцентный имиджинг опухолей в молочных железах мыши. В – зависимость интенсивности ближнеинфракрасной биолюминесценции (БИБ, фотон · c⁻¹· cm⁻²· cp⁻¹) опухолей от времени. Г – зависимость интенсивности ближнеинфракрасной флуоресценции (БИФ, (фотон · c⁻¹· cm⁻²· cp⁻¹)/(мкВт· cm⁻²)) опухолей времени.

По результатам анализа кинетики роста опухолей с использованием ближнеинфракрасных химерных люцифераз можно заключить, что iRFP670—RLuc8 или iRFP720—RLuc8 обладают

высокой чувствительностью и широкими возможностями в качестве биомаркеров для наблюдения биомедицинских исследований раковых опухолей на животных моделях.

3.2.9. Биолюминесцентный и флуоресцентный *in vivo* и *ex vivo* имиджинг метастаз раковых опухолей с использованием iRFP670—RLuc8 и iRFP720—RLuc8

Достигнув высокой чувствительности биолюминесцентного имиджинга клеток, расположенных глубоко в тканях, и раковых опухолей с использованием iRFP670—RLuc8 и iRFP720—RLuc8, было решено приступить к решению следующей задачи, которой являлся имиджинг клеток опухолей метастазировавших в легкие мышей. По литературным данным известно, что клетки MTLn3 являются очень агрессивным раком, для которого характерно образование метастаз [133, 180]. В связи с этим на поздних этапах роста основных опухолей мышей стал проводиться биолюминесцентный имиджинг грудной области мышей, где, предположительно, должны были начать накапливаться метастазировавшие клетки. Из-за того, что чувствительная камера системы IVIS Spectrum обладает ограниченным динамическим диапазоном регистрации сигнала, было необходимо закрывать основные опухоли непрозрачным материалом во время имиджинга метастаз. В результате этого удалось обнаружить значительную ближнеинфракрасную биолюминесценцию в области грудной клетки мышей, соответствующую метастазировавшим клеткам (рис. 40, A) [134].

Исходно для анализа кинетики роста опухолей были импользованы как мышей только с одной опухолью, экспрессирующей iRFP670—RLuc8 или iRFP720—RLuc8, так и одновременно с двумя (рис. 39, А–Б). При исследовании метастазировавших клеток с использованием биолюминесцентного имиджинга в мышах с одной опухолью наблюдалась только одна популяция метастазировавших клеток, соответствующая типу опухоли (рис. 40, А, верхний ряд). Однако, в мышах с двумя различными опухолями, при помощи спектрального разложения сигнала, в легких мышей удалось одновременно наблюдать две популяции метастазировавших клеток (рис. 40, А, нижний ряд) и оценить вклад каждой и популяций в общий сигнал ближнеинфракрасной биолюминесценции (рис. 40, Б).



Рисунок 40 Анализ метастазов раковых клеток, экспрессирующих iRFP670—RLuc8 или iRFP720—RLuc8, в легких мышей *in vivo*. А – биолюминесцентный имиджинг грудной области мышей, зараженных одной или двумя различными опухолями, экспрессирующими iRFP670—RLuc8 или iRFP720—RLuc8, на 29 сут после инъекции раковых клеток. Б – сравнение интенсивностей ближнеинфракрасной биолюминесценции (БИБ, фотон·c⁻¹·cm⁻²·cp⁻¹) легких мышей с разными видами опухолевых клеток.

Используя калибровочные графики зависимости интенсивности ближнеинфракрасной биолюминесценции от количества клеток, экспрессирующих iRFP670—RLuc8 или iRFP720— RLuc8, в легких мышей, построенный ранее на основе экспериментов по определению чувствительности имиджинга (рис. 37, В), была проведена оценка количества клеток, метастазировавших в легкие мышей. Для мышей с одной опухолью интенсивность ближнеинфракрасной биолюминесценции легких соответствовала $3.7 \cdot 10^6$ клеток ± $9.5 \cdot 10^5$ клеток, экспрессировавших iRFP670—RLuc8, и $5.4 \cdot 10^5 \pm 3.3 \cdot 10^5$ клеток, экспрессировавших iRFP720—RLuc8. Для мышей с двумя различными опухолями интенсивности ближнеинфракрасной биолюминесценции в соответствующих каналах соответствовали $2.2 \cdot 10^6$ клеток $\pm 3.9 \cdot 10^5$ клеток и $2.7 \cdot 10^6$ клеток $\pm 1.3 \cdot 10^5$ клеток, экспрессировавших iRFP670—RLuc8 и iRFP720—RLuc8, соответственно.

Полученные данные не имеют известных в литературе аналогов и свидетельствуют об уникальных свойствах ближнеинфракрасных химерных люцифераз в качестве биомаркеров для неинвазивного наблюдения за метастазированием раковых опухолей и в перспективе могут быть использованы, например, визуализации дремлющих раковых или стволовых клеток [95, 181, 182].

Возможность сочетания высокой чувствительности биолюминесценции с широким набором методов флуоресцентного имиджинга *ex vivo* позволила перейти к следующему этапу анализа клеток метастазировавших в легкие мышей. После умерщвления мышей были изъяты их внутренние органы (сердце, правая и левая доли легких, селезенка и одна доля печени) и проведен флуоресцентный имиджинг органов *ex vivo* (рис. 41, А). В качестве контроля для определения интенсивности автофлуоресценции мы использовали ближнеинфракрасную автофлуоресценцию сердца, как органа наименее подверженного заражению метастазами [183]. На основе этих данных были определены сигналы ближнеинфракрасной биолюминесценции, соответствующие каждой популяции метастазировавших клеток (рис. 41, Б). Полученное распределение интенсивностей флуоресценции iRFP670—RLuc8 и iRFP720—RLuc8 в легких мышей с одной или двумя различными опухолями полностью соответствовало распределению их интенсивностям биолюминесценции, определенными *in vivo*.

Поскольку iRFP670 и iRFP720 зарекомендовали себя как эффективные биомаркеры для анализа популяций меченых ими клеток методом проточной цитофлуориметрии, эта возможность была использована для анализа клеток легких мышей с метастазами на более детальном уровне (рис. 42). Для этого легкие мышей трипсинизировали и суспендировали полученные клетки в фосфатно-солевом буферном растворе. Исследование популяций клеток легких проводили в тех же условиях, что и анализ стабильных линии клеток MTLn3, экспрессирующих iRFP670—RLuc8 или iRFP720—RLuc8 и использовавшихся для инъекций в молочные железы мышей (рис. 42, А). Результаты анализа цитофлуориметрии выявили, что интенсивность флуоресценции метастазировавших клеток не изменилась со времени их введения 42. Б-Г), что свидетельствует о стабильно высоком уровне (рис. экспрессии ближнеинфракрасных химерных люцифераз на протяжении порядка 30 суток и, следовательно, об их низкой цитотоксичности. Эти данные ставят iRFP670-RLuc8 и iRFP720-RLuc8 в один ряд с другими биомаркерами на основе BphP, способными поддерживать стабильный уровень экспрессии в клеточных культурах in vivo [97-99].

Данные о распределении популяций метастазировавших клеток в легких мышей, полученные методами биолюминесцентного *in vivo* и флуоресцентного *ex vivo* имиджинга, а также *ex vivo* цитофлуориметрии, хорошо согласуются между собой, что демонстрирует надежность использования ближнеинфракрасных химерных люцифераз для сложного многокомпонентного анализа как на уровне целого организма, так и отдельных клеток.



Рисунок 41 Анализ метастазов раковых клеток, экспрессирующих iRFP670—RLuc8 или iRFP720—RLuc8, в органах мышей *ex vivo*. А – флуоресцентный имиджинг сердца, правого и левого легких, печени и селезенки мышей, зараженных одной или двумя различными опухолями, экспрессирующими iRFP670—RLuc8 или iRFP720—RLuc8. Б –сравнение интенсивности ближнеинфракрасной флуоресценции (БИФ, (фотон·c⁻¹·cm⁻²·cp⁻¹)/(мкВт·см⁻²)) легких мышей с разными видами опухолевых клеток.



БИФ в канале iRFP670, усл. ед.

Рисунок 42 Анализ клеточного состава легких мышей, зараженных одной или двумя различными опухолями, экспрессирующими iRFP670—RLuc8 или iRFP720—RLuc8, методом проточной цитофлуориметрии. А – сравнительный анализ клеток линии MTLn3, использовавшихся для инъекций в молочные железы мышей. Б – анализ флуоресценции клеток, экстрагированных из легких мышей, зараженных опухолью, экспрессирующей iRFP670—RLuc8. В – анализ флуоресценции клеток, экстрагированных из легких мышей iRFP720—RLuc8. Г – анализ флуоресценции клеток, экстрагированных из легких мышей, зараженных двумя различными опухолями. Для каждого канала указан процент попавших в него клеток от общего количества клеток, анализированных в данном образце.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований были апробированы новые молекулярнобиологические подходы для создания однодоменных ближнеинфракрасных флуоресцентных биомаркеров и ближнеинфракрасных химерных люцифераз на основе BphP. Введение цистеинового остатка в GAF домен *Rp*BphP1, позволившее объединить стерическое и в ковалентное связывание хромофора ЭТОМ домене, открыло путь к созданию ближнеинфракрасных биомаркеров небольшого размера. Последующий направленный мутагенез GAF домена с аминокислотной заменой Ile110Суѕ привел к созданию самого маленького на данный момент ближнеинфракрасного флуоресцентного биомаркера на основе BphP – GAF-FP. Способность GAF-FP ковалентно связывать два хромофора (BV и PCB, синтезируемые в животных и растительных клетках, соответственно) позволит в будущем проводить изучение молекулярно-биологических процессов в клетках различных организмов. В то же время, высокая стабильность GAF-FP будет способствовать получению новых флуоресцентных биосенсоров на его основе.

Слияние GAF-FP с люциферазой RLuc8 выявило возможность эффективного резонансного переноса энергии от возбужденного состояния субстрата RLuc8 к хромофору GAF-FP с переводом последнего в возбужденное состояние, отвечающее коротковолновой полосе поглощения, и возникновением в конечном итоге ближнеинфракрасной биолюминесценции. Подход, апробированный при создании GAF-FP—RLuc8, позволил нам получить более совершенные ближнеинфракрасные химерные люциферазы на основе iRFP670 и iRFP720.

Наши данные свидетельствуют о том, что iRFP670-RLuc8 и iRFP720-RLuc8 могут быть использованы для двухцветного многопараметрического (одновременного флуоресцентного и биолюминесцентного) имиджинга как на уровне клеток, так и целого организма. Высокая яркость ближнеинфракрасной биолюминесценции химерных люцифераз ставит их на один уровень с передовыми методами оптического анализа и позволяет проводить количественный анализ метастазов, расположенных глубоко в ткани живых мышей. Мы ожидаем, что в будущем возможности уникального сочетания флуоресценции и биолюминесценции В in vivo и ex vivo экспериментах позволят использовать ближнеинфракрасные химерные люциферазы для решения широкого круга прикладных и фундаментальных биомедицинских проблем, включающих, к примеру, анализ метастазирования раковых клеток, определение их фенотипов и изучение эволюции раковых опухолей.

выводы

- 1. Мономерные ближнеинфракрасные флуоресцентные биомаркеры могут быть получены на основе GAF домена бактериального фитохрома грамотрицательной пурпурной несерной бактерии *Rhodopseudomonas palustris* (*Rp*BphP1).
- 2. Ближнеинфракрасный однодоменный флуоресцентный биомаркер GAF-FP способен ковалентно связывать биливердин и фикоцианобилин в качестве хромофоров как в аэробных, так и в анаэробных условиях.
- В ближнеинфракрасном однодоменном флуоресцентном биомаркере GAF-F как биливердин, так и фикоцианобилин ковалентно связываются с аминокислотным остатком цистеина в положении 110 его аминокислотной последовательности.
- 4. В химерных белках на основе модифицированной люциферазы Renilla reniformis (RLuc8) и ближнеинфракрасных биомаркеров (GAF-FP, iRFP670 и iRFP720) возможен резонансный перенос энергии от возбужденного состояния целентеразин-подобного субстрата RLuc8 (ProlumePurple) к биливердину с переводом последнего в возбужденное состояние, отвечающее коротковолновой полосе поглощения, и возникновением в конечном итоге ближнеинфракрасной биолюминесценции.
- 5. Химерные белки на основе модифицированной люциферазы Renilla reniformis (RLuc8) и ближнеинфракрасных биомаркеров (iRFP670 и iRFP720) обладают яркой биолюминесценцией и могут быть использованы для двухцветного флуоресцентного и биолюминесцентного имиджинга клеток и тканей животных, а также визуализации роста и метастазирования опухолей из клеток линии MTLn3 in vivo и их последующий анализ ex vivo.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- автоИФ интенсивности автофлуоресценции
- БИБ интенсивность ближнеинфракрасной билюминесценции
- БИФ интенсивность ближнеинфракрасной флуоресценции
- ДНК дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИБ интенсивность билюминесценции
- ИФ интенсивность флуоресценции
- ЭРПЭ эффективность резонансного переноса энергии
- BiFC бимолекулярная флуоресцентная комплементация от англ. bimolecular <u>f</u>luorescence complementation
- BphP бактериальный фитохром от англ. bacterial phytochrome photoreceptor
- BV биливердин IXα от англ. biliverdin IXα
- DMEM клеточная среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко, от англ. Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium
- EGFP улучшенный зеленый флуоресцентный белок
- FLuc люцифераза светлячка Photinus pyralis от англ. firefly luciferase
- FMT флуоресцентная молекулярная томография от англ. <u>fluorescence molecular</u> <u>tomography</u>
- FP флуоресцентный белок от англ. fluorescent protein
- FRET ферстеровский резонансный перенос энергии от англ. <u>Förster resonance energy</u> transfer
- GAF хромофор-связывающий домен бактериальных фитохромов от англ. акронима cGMP phosphodiesterase/adenylate cyclase/FhlA
- Gem геминин от англ. <u>Geminin</u>
- GFP зеленый флуоресцентный белок от англ. green fluorescent protein
- HCV вирус гепатита С от англ. <u>h</u>epatitis <u>C v</u>irus
- $I\kappa B\alpha$ ядерного фактора регуляции NF-кB от англ. <u>kappa</u> light polypeptide gene enhancer in <u>B</u>-cells <u>i</u>nhibitor, <u>alpha</u>
- iRFP670, iRFP720 ближнеинфракрасные флуоресцентные белка, флуоресцирующие с максимумом спектра при 670 и 720 нм, соответственно
- LB бактериальная среда от англ. lysogeny broth
- mCherry красный флуоресцентный белкок
- MTLn3 производные клеток аденокарциномы молочных желез крысы

- NF-кB универсальный фактор транскрипции от англ. <u>n</u>uclear <u>factor kappa</u>-light-chainenhancer of activated <u>B</u> cells
- P-PI белок-белковые взаимодействия от англ. protein-protein interactions
- РА фотоакустика от англ. <u>photoa</u>coustic
- PAFP фотоактивируемый флуоресцентный белок от англ. photoactivatable
- PAS домен бактериального фитохрома от англ. акронима <u>Per-ARNT-Sim</u>
- PCB фикоцианобилин от англ. phycocyanobilin
- Pfr спектральная форма бактериального фитохрома, отвечающая поглощению в диапазоне длин волн от 740 до 760 нм.
- РНУ домен бактериального фитохрома от англ. phytochrome-specific
- PPI, PPII, PPII, PPVI субстраты для фиолетовой биолюминесценции RLuc от англ. ProlumePurple
- Pr спектральная форма бактериального фитохрома, отвечающая поглощению в диапазоне длин волн от 690 до 710 нм.
- RLuc8 модифицированная люцифераза Renilla reniformis от агнл. <u>Renilla luciferase</u>
- sfGFP высокостабильный вариант зеленого флуоресцентного белка от англ. superfolder GFP
- TEV вирус табачной мозаики от англ. tobacco etch virus
- $TNF\alpha$ фактора некроза опухолей α от англ. <u>tumor necrosis factor alpha</u>

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chudakov, D.M. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues / D.M.Chudakov, M.V.Matz, S.Lukyanov, K.A.Lukyanov // Physiol Rev. - 2010. - V 90. N 3. -P.1103-1163.
- Shcherbakova, D.M. Near-infrared fluorescent proteins for multicolor in vivo imaging / D.M.Shcherbakova, V.V.Verkhusha // Nat Methods. - 2013. - V 10. N 8. - P.751-754.
- Prescher, J.A. Guided by the light: visualizing biomolecular processes in living animals with bioluminescence / J.A.Prescher, C.H.Contag // Curr Opin Chem Biol. - 2010. - V 14. N 1. - P.80-89.
- Badr, C.E. Bioluminescence imaging: basics and practical limitations / C.E.Badr // Methods Mol Biol. - 2014. - N 1098. - P.1-18.
- Piatkevich, K.D. Engineering of bacterial phytochromes for near-infrared imaging, sensing, and light-control in mammals / K.D.Piatkevich, F.V.Subach, V.V.Verkhusha // Chem Soc Rev. -2013. - V 42. N 8. - P.3441-3452.
- Shcherbakova, D.M. Near-infrared fluorescent proteins engineered from bacterial phytochromes / D.M.Shcherbakova, M.Baloban, V.V.Verkhusha // Curr Opin Chem Biol. - 2015. - V 27. - P.52-63.
- Shcherbakova, D.M. Natural Photoreceptors as a Source of Fluorescent Proteins, Biosensors, and Optogenetic Tools / D.M.Shcherbakova, A.A.Shemetov, A.A.Kaberniuk, V.V.Verkhusha // Annu Rev Biochem. - 2015. - V 84. - P.519-550.
- Filonov, G.S. Bright and stable near-infrared fluorescent protein for in vivo imaging / G.S.Filonov, K.D.Piatkevich, L.M.Ting, J.Zhang, K.Kim, V.V.Verkhusha // Nat Biotechnol. -2011. - V 29. N 8. - P.757-761.
- Filonov, G.S. A near-infrared BiFC reporter for in vivo imaging of protein-protein interactions / G.S.Filonov, V.V.Verkhusha // Chem Biol. - 2013. - V 20. N 8. - P.1078-1086.
- Piatkevich, K.D. Far-red light photoactivatable near-infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome / K.D.Piatkevich, F.V.Subach, V.V.Verkhusha // Nat Commun. -2013. - N 4. - P.2153.
- Xu, T. The Expanding Toolbox of In Vivo Bioluminescent Imaging / T.Xu, D.Close, W.Handagama, E.Marr, G.Sayler, S.Ripp // Front Oncol. - 2016. - 6. - P.150.
- Saito, K. Luminescent proteins for high-speed single-cell and whole-body imaging / K.Saito, Y.F.Chang, K.Horikawa, N.Hatsugai, Y.Higuchi, M.Hashida, Y.Yoshida, T.Matsuda, Y.Arai, T.Nagai // Nat Commun. - 2012. - 3. - P.1262.

- Takai, A. Expanded palette of Nano-lanterns for real-time multicolor luminescence imaging / A.Takai, M.Nakano, K.Saito, R.Haruno, T.M.Watanabe, T.Ohyanagi, T.Jin, Y.Okada, T.Nagai // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2015. - 112. 14. - P.4352-4356.
- Born, M. Principles of optics : electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light / M.Born, E.Wolf // 7th expanded ed. 1999, Cambridge ; New York: Cambridge University Press. xxxiii, 952 p.
- Борен, К. Поглощение и рассеяние света малыми частицами / К.Борен, Д.Хафмен // 1986.
 -. Р.
- Dunn, A. Three-dimensional computation of light scattering from cells / A.Dunn, R.RichardsKortum // Ieee Journal of Selected Topics in Quantum Electronics. - 1996. - 2. 4. -P.898-905.
- Mourant, J.R. Mechanisms of light scattering from biological cells relevant to noninvasive optical-tissue diagnostics / J.R.Mourant, J.P.Freyer, A.H.Hielscher, A.A.Eick, D.Shen, T.M.Johnson // Applied Optics. - 1998. - 37. 16. - P.3586-3593.
- Jacques, S.L. Optical properties of biological tissues: a review / S.L.Jacques // Phys Med Biol. 2013. 58. 11. P.R37-61.
- Torricelli, A. Neurophotonics: non-invasive optical techniques for monitoring brain functions / A.Torricelli, D.Contini, A.Dalla Mora, A.Pifferi, R.Re, L.Zucchelli, M.Caffini, A.Farina, L.Spinelli // Funct Neurol. - 2014. - 29. 4. - P.223-230.
- 20. Rockwell, N.C. A brief history of phytochromes / N.C.Rockwell, J.C.Lagarias // Chemphyschem. 2010. 11. 6. P.1172-1180.
- Auldridge, M.E. Bacterial phytochromes: more than meets the light / M.E.Auldridge, K.T.Forest
 // Crit Rev Biochem Mol Biol. 2011. 46. 1. P.67-88.
- Anders, K. The family of phytochrome-like photoreceptors: diverse, complex and multi-colored, but very useful / K.Anders, L.O.Essen // Curr Opin Struct Biol. - 2015. - 35. - P.7-16.
- Ulijasz, A.T. Phytochrome structure and photochemistry: recent advances toward a complete molecular picture / A.T.Ulijasz, R.D.Vierstra // Curr Opin Plant Biol. - 2011. - 14. 5. - P.498-506.
- Bhoo, S.H. Bacteriophytochromes are photochromic histidine kinases using a biliverdin chromophore / S.H.Bhoo, S.J.Davis, J.Walker, B.Karniol, R.D.Vierstra // Nature. - 2001. - 414.
 6865. - P.776-779.
- 25. Karniol, B. The pair of bacteriophytochromes from Agrobacterium tumefaciens are histidine kinases with opposing photobiological properties / B.Karniol, R.D.Vierstra // Proc Natl Acad Sci U S A. 2003. 100. 5. P.2807-2812.

- Karniol, B. Phylogenetic analysis of the phytochrome superfamily reveals distinct microbial subfamilies of photoreceptors / B.Karniol, J.R.Wagner, J.M.Walker, R.D.Vierstra // Biochem J. 2005. 392. Pt 1. P.103-116.
- Kapitulnik, J. The role of bile pigments in health and disease: effects on cell signaling, cytotoxicity, and cytoprotection / J.Kapitulnik, M.D.Maines // Front Pharmacol. 2012. 3. P.136.
- Narikawa, R. A biliverdin-binding cyanobacteriochrome from the chlorophyll d-bearing cyanobacterium Acaryochloris marina / R.Narikawa, T.Nakajima, Y.Aono, K.Fushimi, G.Enomoto, W.Ni Ni, S.Itoh, M.Sato, M.Ikeuchi // Sci Rep. 2015. 5. P.7950.
- Yang, X. Crystal structure of the chromophore binding domain of an unusual bacteriophytochrome, RpBphP3, reveals residues that modulate photoconversion / X.Yang, E.A.Stojkovic, J.Kuk, K.Moffat // Proc Natl Acad Sci U S A. 2007. 104. 30. P.12571-12576.
- Wagner, J.R. High resolution structure of Deinococcus bacteriophytochrome yields new insights into phytochrome architecture and evolution / J.R.Wagner, J.Zhang, J.S.Brunzelle, R.D.Vierstra, K.T.Forest // J Biol Chem. - 2007. - 282. 16. - P.12298-12309.
- 31. Sharrock, R.A. The phytochrome red/far-red photoreceptor superfamily / R.A.Sharrock // Genome Biol. 2008. 9. 8. P.230.
- Yang, X. Crystal structure of Pseudomonas aeruginosa bacteriophytochrome: photoconversion and signal transduction / X.Yang, J.Kuk, K.Moffat // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2008. - 105.
 38. - P.14715-14720.
- 33. Nagatani, A. Phytochrome: structural basis for its functions / A.Nagatani // Curr Opin Plant Biol.
 2010. 13. 5. P.565-570.
- Tarutina, M. An unorthodox bacteriophytochrome from Rhodobacter sphaeroides involved in turnover of the second messenger c-di-GMP / M.Tarutina, D.A.Ryjenkov, M.Gomelsky // J Biol Chem. - 2006. - 281. 46. - P.34751-34758.
- Bellini, D. Structure of a bacteriophytochrome and light-stimulated protomer swapping with a gene repressor / D.Bellini, M.Z.Papiz // Structure. - 2012. - 20. 8. - P.1436-1446.
- Bonomi, H.R. Xanthomonas campestris attenuates virulence by sensing light through a bacteriophytochrome photoreceptor / H.R.Bonomi, L.Toum, G.Sycz, R.Sieira, A.M.Toscani, G.E.Gudesblat, F.C.Leskow, F.A.Goldbaum, A.A.Vojnov, F.Malamud // EMBO Rep. - 2016. -17. 11. - P.1565-1577.
- Li, L. Continuous fluorescence assay of phytochrome assembly in vitro / L.Li, J.T.Murphy,
 J.C.Lagarias // Biochemistry. 1995. 34. 24. P.7923-7930.
- 38. Wagner, J.R. Mutational analysis of Deinococcus radiodurans bacteriophytochrome reveals key amino acids necessary for the photochromicity and proton exchange cycle of phytochromes /

J.R.Wagner, J.Zhang, D.vonStetten, M.Gunther, D.H.Murgida, M.A.Mroginski, J.M.Walker, K.T.Forest, P.Hildebrandt, R.D.Vierstra // J Biol Chem. - 2008. - 283. 18. - P.12212-12226.

- Yang, X. Conformational differences between the Pfr and Pr states in Pseudomonas aeruginosa bacteriophytochrome / X.Yang, J.Kuk, K.Moffat // Proceedings of the National Academy of Sciences. - 2009. - 106. 37. - P.15639-15644.
- 40. Li, H. Quaternary organization of a phytochrome dimer as revealed by cryoelectron microscopy / H.Li, J.Zhang, R.D.Vierstra // Proc Natl Acad Sci U S A. 2010. 107. 24. P.10872-10877.
- Rottwinkel, G. Bathy phytochromes in rhizobial soil bacteria / G.Rottwinkel, I.Oberpichler,
 T.Lamparter // J Bacteriol. 2010. 192. 19. P.5124-5133.
- Shu, X. Mammalian expression of infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome / X.Shu, A.Royant, M.Z.Lin, T.A.Aguilera, V.Lev-Ram, P.A.Steinbach, R.Y.Tsien // Science. - 2009. - 324. 5928. - P.804-807.
- Toh, K.C. Fluorescence quantum yield and photochemistry of bacteriophytochrome constructs / K.C.Toh, E.A.Stojkovic, I.H.vanStokkum, K.Moffat, J.T.Kennis // Phys Chem Chem Phys. -2011. - 13. 25. - P.11985-11997.
- 44. Toh, K.C. Proton-transfer and hydrogen-bond interactions determine fluorescence quantum yield and photochemical efficiency of bacteriophytochrome / K.C.Toh, E.A.Stojkovic, I.H.vanStokkum, K.Moffat, J.T.Kennis // Proc Natl Acad Sci U S A. 2010. 107. 20. P.9170-9175.
- 45. Kaberniuk, A.A. A bacterial phytochrome-based optogenetic system controllable with near-infrared light / A.A.Kaberniuk, A.A.Shemetov, V.V.Verkhusha // Nat Methods. 2016. 13. 7.
 P.591-597.
- von Stetten, D. Highly conserved residues Asp-197 and His-250 in Agp1 phytochrome control the proton affinity of the chromophore and Pfr formation / D.vonStetten, S.Seibeck, N.Michael, P.Scheerer, M.A.Mroginski, D.H.Murgida, N.Krauss, M.P.Heyn, P.Hildebrandt, B.Borucki, T.Lamparter // J Biol Chem. - 2007. - 282. 3. - P.2116-2123.
- Auldridge, M.E. Structure-guided engineering enhances a phytochrome-based infrared fluorescent protein / M.E.Auldridge, K.A.Satyshur, D.M.Anstrom, K.T.Forest // J Biol Chem. -2012. - 287. 10. - P.7000-7009.
- Mishin, A.S. Novel uses of fluorescent proteins / A.S.Mishin, V.V.Belousov, K.M.Solntsev,
 K.A.Lukyanov // Curr Opin Chem Biol. 2015. 27. P.1-9.
- Rodriguez, E.A. The Growing and Glowing Toolbox of Fluorescent and Photoactive Proteins /
 E.A.Rodriguez, R.E.Campbell, J.Y.Lin, M.Z.Lin, A.Miyawaki, A.E.Palmer, X.Shu, J.Zhang,
 R.Y.Tsien // Trends Biochem Sci. 2016. -. P.

- Frangioni, J.V. In vivo near-infrared fluorescence imaging / J.V.Frangioni // Curr Opin Chem Biol. - 2003. - 7. 5. - P.626-634.
- Escobedo, J.O. NIR dyes for bioimaging applications / J.O.Escobedo, O.Rusin, S.Lim, R.M.Strongin // Curr Opin Chem Biol. - 2010. - 14. 1. - P.64-70.
- Umezawa, K. New trends in near-infrared fluorophores for bioimaging / K.Umezawa, D.Citterio,
 K.Suzuki // Anal Sci. 2014. 30. 3. P.327-349.
- 53. Guo, Z. Recent progress in the development of near-infrared fluorescent probes for bioimaging applications / Z.Guo, S.Park, J.Yoon, I.Shin // Chem Soc Rev. 2014. 43. 1. P.16-29.
- Shcherbo, D. Near-infrared fluorescent proteins / D.Shcherbo, I.I.Shemiakina, A.V.Ryabova, K.E.Luker, B.T.Schmidt, E.A.Souslova, T.V.Gorodnicheva, L.Strukova, K.M.Shidlovskiy, O.V.Britanova, A.G.Zaraisky, K.A.Lukyanov, V.B.Loschenov, G.D.Luker, D.M.Chudakov // Nat Methods. - 2010. - 7. 10. - P.827-829.
- Morozova, K.S. Far-red fluorescent protein excitable with red lasers for flow cytometry and superresolution STED nanoscopy / K.S.Morozova, K.D.Piatkevich, T.J.Gould, J.Zhang, J.Bewersdorf, V.V.Verkhusha // Biophys J. - 2010. - 99. 2. - P.L13-15.
- 56. Piatkevich, K.D. Extended Stokes shift in fluorescent proteins: chromophore-protein interactions in a near-infrared TagRFP675 variant / K.D.Piatkevich, V.N.Malashkevich, K.S.Morozova, N.A.Nemkovich, S.C.Almo, V.V.Verkhusha // Sci Rep. - 2013. - 3. - P.1847.
- 57. Chu, J. Non-invasive intravital imaging of cellular differentiation with a bright red-excitable fluorescent protein / J.Chu, R.D.Haynes, S.Y.Corbel, P.Li, E.Gonzalez-Gonzalez, J.S.Burg, N.J.Ataie, A.J.Lam, P.J.Cranfill, M.A.Baird, M.W.Davidson, H.L.Ng, K.C.Garcia, C.H.Contag, K.Shen, H.M.Blau, M.Z.Lin // Nat Methods. - 2014. - 11. 5. - P.572-578.
- Li, Z. Mutagenesis of mNeptune Red-Shifts Emission Spectrum to 681-685 nm / Z.Li, Z.Zhang,
 L.Bi, Z.Cui, J.Deng, D.Wang, X.E.Zhang // PLoS One. 2016. 11. 4. P.e0148749.
- 59. Lehtivuori, H. Removal of Chromophore-Proximal Polar Atoms Decreases Water Content and Increases Fluorescence in a Near Infrared Phytofluor / H.Lehtivuori, S.Bhattacharya, N.M.Angenent-Mari, K.A.Satyshur, K.T.Forest // Front Mol Biosci. - 2015. - 2. - P.65.
- Ng, H.L. Structure-guided wavelength tuning in far-red fluorescent proteins / H.L.Ng, M.Z.Lin
 // Curr Opin Struct Biol. 2016. 39. P.124-133.
- Yu, D. An improved monomeric infrared fluorescent protein for neuronal and tumour brain imaging / D.Yu, W.C.Gustafson, C.Han, C.Lafaye, M.Noirclerc-Savoye, W.P.Ge, D.A.Thayer, H.Huang, T.B.Kornberg, A.Royant, L.Y.Jan, Y.N.Jan, W.A.Weiss, X.Shu // Nat Commun. -2014. - 5. - P.3626.
- Yu, D. A naturally monomeric infrared fluorescent protein for protein labeling in vivo / D.Yu,
 M.A.Baird, J.R.Allen, E.S.Howe, M.P.Klassen, A.Reade, K.Makhijani, Y.Song, S.Liu,

Z.Murthy, S.Q.Zhang, O.D.Weiner, T.B.Kornberg, Y.N.Jan, M.W.Davidson, X.Shu // Nat Methods. - 2015. - 12. 8. - P.763-765.

- Bhattacharya, S. Origins of fluorescence in evolved bacteriophytochromes / S.Bhattacharya, M.E.Auldridge, H.Lehtivuori, J.A.Ihalainen, K.T.Forest // J Biol Chem. - 2014. - 289. 46. -P.32144-32152.
- Shcherbakova, D.M. Bright monomeric near-infrared fluorescent proteins as tags and biosensors for multiscale imaging / D.M.Shcherbakova, M.Baloban, A.V.Emelyanov, M.Brenowitz, P.Guo, V.V.Verkhusha // Nat Commun. - 2016. - 7. - P.12405.
- Yu, D. Rational design of a monomeric and photostable far-red fluorescent protein for fluorescence imaging in vivo / D.Yu, Z.Dong, W.C.Gustafson, R.Ruiz-Gonzalez, L.Signor, F.Marzocca, F.Borel, M.P.Klassen, K.Makhijani, A.Royant, Y.N.Jan, W.A.Weiss, S.Guo, X.Shu // Protein Sci. - 2016. - 25. 2. - P.308-315.
- 66. Ventura, S. Bimolecular fluorescence complementation: illuminating cellular protein interactions
 / S. Ventura // Curr Mol Med. 2011. 11. 7. P.582-598.
- 67. Kodama, Y. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): a 5-year update and future perspectives / Y.Kodama, C.D.Hu // Biotechniques. 2012. 53. 5. P.285-298.
- Miller, K.E. Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Analysis: Advances and Recent Applications for Genome-Wide Interaction Studies / K.E.Miller, Y.Kim, W.K.Huh, H.O.Park // J Mol Biol. - 2015. - 427. 11. - P.2039-2055.
- 69. Shekhawat, S.S. Split-protein systems: beyond binary protein-protein interactions /
 S.S.Shekhawat, I.Ghosh // Curr Opin Chem Biol. 2011. 15. 6. P.789-797.
- Tchekanda, E. An infrared reporter to detect spatiotemporal dynamics of protein-protein interactions / E.Tchekanda, D.Sivanesan, S.W.Michnick // Nat Methods. - 2014. - 11. 6. - P.641-644.
- Pandey, N. Combining random gene fission and rational gene fusion to discover near-infrared fluorescent protein fragments that report on protein-protein interactions / N.Pandey, C.L.Nobles, L.Zechiedrich, A.W.Maresso, J.J.Silberg // ACS Synth Biol. - 2015. - 4. 5. - P.615-624.
- 72. Chen, M. Novel near-infrared BiFC systems from a bacterial phytochrome for imaging protein interactions and drug evaluation under physiological conditions / M.Chen, W.Li, Z.Zhang, S.Liu, X.Zhang, X.E.Zhang, Z.Cui // Biomaterials. - 2015. - 48. - P.97-107.
- 73. Lamparter, T. Phytochrome from Agrobacterium tumefaciens has unusual spectral properties and reveals an N-terminal chromophore attachment site / T.Lamparter, N.Michael, F.Mittmann, B.Esteban // Proc Natl Acad Sci U S A. 2002. 99. 18. P.11628-11633.
- 74. Moffat, K. Time-resolved crystallography and protein design: signalling photoreceptors and optogenetics / K.Moffat // Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2014. 369. 1647. P.20130568.
- Lamparter, T. The biliverdin chromophore binds covalently to a conserved cysteine residue in the N-terminus of Agrobacterium phytochrome Agp1 / T.Lamparter, M.Carrascal, N.Michael, E.Martinez, G.Rottwinkel, J.Abian // Biochemistry. - 2004. - 43. 12. - P.3659-3669.
- Lamparter, T. Biliverdin binds covalently to agrobacterium phytochrome Agp1 via its ring A vinyl side chain / T.Lamparter, N.Michael, O.Caspani, T.Miyata, K.Shirai, K.Inomata // J Biol Chem. 2003. 278. 36. P.33786-33792.
- Shcherbakova, D.M. Molecular Basis of Spectral Diversity in Near-Infrared Phytochrome-Based Fluorescent Proteins / D.M.Shcherbakova, M.Baloban, S.Pletnev, V.N.Malashkevich, H.Xiao, Z.Dauter, V.V.Verkhusha // Chem Biol. - 2015. - 22. 11. - P.1540-1551.
- Stepanenko, O.V. Allosteric effects of chromophore interaction with dimeric near-infrared fluorescent proteins engineered from bacterial phytochromes / O.V.Stepanenko, M.Baloban, G.S.Bublikov, D.M.Shcherbakova, O.V.Stepanenko, K.K.Turoverov, I.M.Kuznetsova, V.V.Verkhusha // Sci Rep. - 2016. - 6. - P.18750.
- Hontani, Y. Bright blue-shifted fluorescent proteins with Cys in the GAF domain engineered from bacterial phytochromes: fluorescence mechanisms and excited-state dynamics / Y.Hontani, D.M.Shcherbakova, M.Baloban, J.Zhu, V.V.Verkhusha, J.T.Kennis // Sci Rep. 2016. 6. P.37362.
- Stepanenko, O.V. Stabilization of structure in near-infrared fluorescent proteins by binding of biliverdin chromophore / O.V.Stepanenko, O.V.Stepanenko, G.S.Bublikov, I.M.Kuznetsova, V.V.Verkhusha, K.K.Turoverov // Journal of Molecular Structure. - 2016. -. - P.
- Pandey, N. Tolerance of a Knotted Near-Infrared Fluorescent Protein to Random Circular Permutation / N.Pandey, B.E.Kuypers, B.Nassif, E.E.Thomas, R.N.Alnahhas, L.Segatori, J.J.Silberg // Biochemistry. - 2016. - 55. 27. - P.3763-3773.
- Mallam, A.L. Experimental detection of knotted conformations in denatured proteins / A.L.Mallam, J.M.Rogers, S.E.Jackson // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2010. - 107. 18. - P.8189-8194.
- Wang, P. Single-molecule detection reveals knot sliding in TrmD denaturation / P.Wang, L.Yang, P.Liu, Y.Q.Gao, X.S.Zhao // Chemistry. - 2013. - 19. 19. - P.5909-5916.
- 84. To, T.L. Rationally designed fluorogenic protease reporter visualizes spatiotemporal dynamics of apoptosis in vivo / T.L.To, B.J.Piggott, K.Makhijani, D.Yu, Y.N.Jan, X.Shu // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2015. - 112. 11. - P.3338-3343.
- Song, C. Two ground state isoforms and a chromophore D-ring photoflip triggering extensive intramolecular changes in a canonical phytochrome / C.Song, G.Psakis, C.Lang, J.Mailliet, W.Gartner, J.Hughes, J.Matysik // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2011. - 108. 10. - P.3842-3847.

- 86. Zhu, J. Ultrafast excited-state dynamics and fluorescence deactivation of near-infrared fluorescent proteins engineered from bacteriophytochromes / J.Zhu, D.M.Shcherbakova, Y.Hontani, V.V.Verkhusha, J.T.Kennis // Sci Rep. - 2015. - 5. - P.12840.
- Feliks, M. Field Structural Determinants of Improved Fluorescence in a Family of Bacteriophytochrome-Based Infrared Fluorescent Proteins: Insights from Continuum Electrostatic Calculations and Molecular Dynamics Simulations / M.Feliks, C.Lafaye, X.Shu, A.Royant, M.Field // Biochemistry. - 2016. - 55. 31. - P.4263-4274.
- 88. Buhrke, D. The role of local and remote amino acid substitutions for optimizing fluorescence in bacteriophytochromes: A case study on iRFP / D.Buhrke, F.Velazquez Escobar, L.Sauthof, S.Wilkening, N.Herder, N.N.Tavraz, M.Willoweit, A.Keidel, T.Utesch, M.A.Mroginski, F.J.Schmitt, P.Hildebrandt, T.Friedrich // Sci Rep. - 2016. - 6. 2016. - P.28444.
- Ormo, M. Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein / M.Ormo, A.B.Cubitt, K.Kallio, L.A.Gross, R.Y.Tsien, S.J.Remington // Science. - 1996. - 273. 5280. -P.1392-1395.
- 90. Pakhomov, A.A. Probing the structural determinants of yellow fluorescence of a protein from Phialidium sp / A.A.Pakhomov, V.I.Martynov // Biochem Biophys Res Commun. 2011. 407.
 1. P.230-235.
- Rumyantsev, K.A. Minimal domain of bacterial phytochrome required for chromophore binding and fluorescence / K.A.Rumyantsev, D.M.Shcherbakova, N.I.Zakharova, A.V.Emelyanov, K.K.Turoverov, V.V.Verkhusha // Sci Rep. - 2015. - 5. - P.18348.
- 92. Rodriguez, E.A. A far-red fluorescent protein evolved from a cyanobacterial phycobiliprotein / E.A.Rodriguez, G.N.Tran, L.A.Gross, J.L.Crisp, X.Shu, J.Y.Lin, R.Y.Tsien // Nat Methods. -2016. - 13. 9. - P.763-769.
- 93. Fyk-Kolodziej, B. Marking cells with infrared fluorescent proteins to preserve photoresponsiveness in the retina / B.Fyk-Kolodziej, C.B.Hellmer, T.Ichinose // Biotechniques. 2014. 57. 5. P.245-253.
- Wang, K. Direct wavefront sensing for high-resolution in vivo imaging in scattering tissue / K.Wang, W.Sun, C.T.Richie, B.K.Harvey, E.Betzig, N.Ji // Nat Commun. 2015. 6. P.7276.
- 95. Wang, Y. Assessing in vitro stem-cell function and tracking engraftment of stem cells in ischaemic hearts by using novel iRFP gene labelling / Y.Wang, M.Zhou, X.Wang, G.Qin, N.L.Weintraub, Y.Tang // J Cell Mol Med. - 2014. - 18. 9. - P.1889-1894.
- 96. Tran, M.T. In vivo image analysis using iRFP transgenic mice / M.T.Tran, J.Tanaka, M.Hamada, Y.Sugiyama, S.Sakaguchi, M.Nakamura, S.Takahashi, Y.Miwa // Exp Anim. - 2014. - 63. 3. -P.311-319.

- 97. Agollah, G.D. In vivo lymphatic imaging of a human inflammatory breast cancer model / G.D.Agollah, G.Wu, E.M.Sevick-Muraca, S.Kwon // J Cancer. 2014. 5. 9. P.774-783.
- Jiguet-Jiglaire, C. Noninvasive near-infrared fluorescent protein-based imaging of tumor progression and metastases in deep organs and intraosseous tissues / C.Jiguet-Jiglaire, M.Cayol, S.Mathieu, C.Jeanneau, C.Bouvier-Labit, L.Ouafik, A.El-Battari // J Biomed Opt. - 2014. - 19.
 1. - P.16019.
- 99. Zhu, B. Tumor margin detection using quantitative NIRF molecular imaging targeting EpCAM validated by far red gene reporter iRFP / B.Zhu, G.Wu, H.Robinson, N.Wilganowski, M.A.Hall, S.C.Ghosh, K.L.Pinkston, A.Azhdarinia, B.R.Harvey, E.M.Sevick-Muraca // Mol Imaging Biol. 2013. 15. 5. P.560-568.
- 100. Dortay, H. High-throughput protein expression using a combination of ligation-independent cloning (LIC) and infrared fluorescent protein (IFP) detection / H.Dortay, U.M.Akula, C.Westphal, M.Sittig, B.Mueller-Roeber // PLoS One. - 2011. - 6. 4. - P.e18900.
- 101. Calvo-Alvarez, E. Infrared fluorescent imaging as a potent tool for in vitro, ex vivo and in vivo models of visceral leishmaniasis / E.Calvo-Alvarez, K.Stamatakis, C.Punzon, R.Alvarez-Velilla, A.Tejeria, J.M.Escudero-Martinez, Y.Perez-Pertejo, M.Fresno, R.Balana-Fouce, R.M.Reguera // PLoS Negl Trop Dis. - 2015. - 9. 3. - P.e0003666.
- 102. Oliveira, J.C. In vivo near-infrared fluorescence imaging of Leishmania amazonensis expressing infrared fluorescence protein (iRFP) for real-time monitoring of cutaneous leishmaniasis in mice / J.C.Oliveira, A.C.daSilva, R.A.Oliveira, V.R.Pereira, L.H.Gil // J Microbiol Methods. 2016.
 130. P.189-195.
- Hock, A.K. iRFP is a sensitive marker for cell number and tumor growth in high-throughput systems / A.K.Hock, P.Lee, O.D.Maddocks, S.M.Mason, K.Blyth, K.H.Vousden // Cell Cycle. -2014. - 13. 2. - P.220-226.
- 104. Paulus-Hock, V. iRFP Is a Real Time Marker for Transformation Based Assays in High Content Screening / V.Paulus-Hock, E.C.Cheung, P.Roxburgh, K.H.Vousden, A.K.Hock // PLoS One. -2014. - 9. 6. - P.e98399.
- 105. Tanaka, N. Application of infrared-based molecular imaging to a mouse model with head and neck cancer / N.Tanaka, S.A.Lajud, A.Ramsey, A.R.Szymanowski, R.Ruffner, B.W.O'Malley, Jr., D.Li // Head Neck. - 2016. - 38 Suppl 1. - P.E1351-1357.
- 106. Kamensek, U. Visualization of Nonspecific Antitumor Effectiveness and Vascular Effects of Gene Electro-Transfer to Tumors / U.Kamensek, M.P.Rols, M.Cemazar, M.Golzio // Curr Gene Ther. - 2016. - 16. 2. - P.90-97.

- 107. Telford, W.G. Multiparametric flow cytometry using near-infrared fluorescent proteins engineered from bacterial phytochromes / W.G.Telford, D.M.Shcherbakova, D.Buschke, T.S.Hawley, V.V.Verkhusha // PLoS One. - 2015. - 10. 3. - P.e0122342.
- Condeelis, J. Intravital imaging of cell movement in tumours / J.Condeelis, J.E.Segall // Nat Rev Cancer. - 2003. - 3. 12. - P.921-930.
- Condeelis, J. In vivo imaging in cancer / J.Condeelis, R.Weissleder // Cold Spring Harb Perspect Biol. - 2010. - 2. 12. - P.a003848.
- 110. Zlobovskaya, O.A. Genetically encoded far-red fluorescent sensors for caspase-3 activity / O.A.Zlobovskaya, T.F.Sergeeva, M.V.Shirmanova, V.V.Dudenkova, G.V.Sharonov, E.V.Zagaynova, K.A.Lukyanov // Biotechniques. 2016. 60. 2. P.62-68.
- 111. Ale, A. FMT-XCT: in vivo animal studies with hybrid fluorescence molecular tomography-Xray computed tomography / A.Ale, V.Ermolayev, E.Herzog, C.Cohrs, M.H.deAngelis, V.Ntziachristos // Nat Methods. - 2012. - 9. 6. - P.615-620.
- 112. Zhu, B. Near-Infrared Fluorescence-Enhanced Optical Tomography / B.Zhu, A.Godavarty // Biomed Res Int. - 2016. - 2016. - P.5040814.
- Fridman, K. Advances in tomography: probing the molecular architecture of cells / K.Fridman,
 A.Mader, M.Zwerger, N Elia, O.Medalia // Nat Rev Mol Cell Biol. 2012. 13. 11. P.736-742.
- 114. Stuker, F. Fluorescence molecular tomography: principles and potential for pharmaceutical research / F.Stuker, J.Ripoll, M.Rudin // Pharmaceutics. 2011. 3. 2. P.229-274.
- 115. Lai, C.W. Using Dual Fluorescence Reporting Genes to Establish an In Vivo Imaging Model of Orthotopic Lung Adenocarcinoma in Mice / C.W.Lai, H.L.Chen, C.C.Yen, J.L.Wang, S.H.Yang, C.M.Chen // Mol Imaging Biol. - 2016. - 18. 6. - P.849-859.
- 116. Lu, Y. In vivo imaging of orthotopic prostate cancer with far-red gene reporter fluorescence tomography and in vivo and ex vivo validation / Y.Lu, C.D.Darne, I.C.Tan, G.Wu, N.Wilganowski, H.Robinson, A.Azhdarinia, B.Zhu, J.C.Rasmussen, E.M.Sevick-Muraca // J Biomed Opt. - 2013. - 18. 10. - P.101305.
- 117. Elson, D. Time-domain fluorescence lifetime imaging applied to biological tissue / D.Elson, J.Requejo-Isidro, I.Munro, F.Reavell, J.Siegel, K.Suhling, P.Tadrous, R.Benninger, P.Lanigan, J.McGinty, C.Talbot, B.Treanor, S.Webb, A.Sandison, A.Wallace, D.Davis, J.Lever, M.Neil, D.Phillips, G.Stamp, P.French // Photochem Photobiol Sci. - 2004. - 3. 8. - P.795-801.
- Pifferi, A. New frontiers in time-domain diffuse optics, a review / A.Pifferi, D.Contini,
 A.D.Mora, A.Farina, L.Spinelli, A.Torricelli // J Biomed Opt. 2016. 21. 9. P.091310.
- Rice, W.L. In vivo tomographic imaging of deep-seated cancer using fluorescence lifetime contrast / W.L.Rice, D.M.Shcherbakova, V.V.Verkhusha, A.T.Kumar // Cancer Res. - 2015. -75. 7. - P.1236-1243.

- Wang, L.V. Multiscale photoacoustic microscopy and computed tomography / L.V.Wang // Nat Photonics. - 2009. - 3. 9. - P.503-509.
- Wang, L.V. Photoacoustic tomography: in vivo imaging from organelles to organs / L.V.Wang, S.Hu // Science. - 2012. - 335. 6075. - P.1458-1462.
- 122. Nedosekin, D.A. Synergy of photoacoustic and fluorescence flow cytometry of circulating cells with negative and positive contrasts / D.A.Nedosekin, M.Sarimollaoglu, E.I.Galanzha, R.Sawant, V.P.Torchilin, V.V.Verkhusha, J.Ma, M.H.Frank, A.S.Biris, V.P.Zharov // J Biophotonics. - 2013. - 6. 5. - P.425-434.
- 123. Filonov, G.S. Deep-tissue photoacoustic tomography of a genetically encoded near-infrared fluorescent probe / G.S.Filonov, A.Krumholz, J.Xia, J.Yao, L.V.Wang, V.V.Verkhusha // Angew Chem Int Ed Engl. - 2012. - 51. 6. - P.1448-1451.
- 124. Deliolanis, N.C. Deep-tissue reporter-gene imaging with fluorescence and optoacoustic tomography: a performance overview / N.C.Deliolanis, A.Ale, S.Morscher, N.C.Burton, K.Schaefer, K.Radrich, D.Razansky, V.Ntziachristos // Mol Imaging Biol. - 2014. - 16. 5. -P.652-660.
- Tzoumas, S. Effects of multispectral excitation on the sensitivity of molecular optoacoustic imaging / S.Tzoumas, A.Nunes, N.C.Deliolanis, V.Ntziachristos // J Biophotonics. - 2015. - 8.
 8. - P.629-637.
- Krumholz, A. Multicontrast photoacoustic in vivo imaging using near-infrared fluorescent proteins / A.Krumholz, D.M.Shcherbakova, J.Xia, L.V.Wang, V.V.Verkhusha // Sci Rep. - 2014.
 - 4. - P.3939.
- 127. Meng, J. In vivo optical-resolution photoacoustic computed tomography with compressed sensing / J.Meng, L.V.Wang, D.Liang, L.Song // Opt Lett. 2012. 37. 22. P.4573-4575.
- 128. Yao, J. Multiscale photoacoustic tomography using reversibly switchable bacterial phytochrome as a near-infrared photochromic probe / J.Yao, A.A.Kaberniuk, L.Li, D.M.Shcherbakova, R.Zhang, L.Wang, G.Li, V.V.Verkhusha, L.V.Wang // Nat Methods. - 2016. - 13. 1. - P.67-73.
- 129. Dortay, H. Dual-wavelength photoacoustic imaging of a photoswitchable reporter protein / H.Dortay, J.Märk, A.Wagener, E.Zhang, C.Grötzinger, P.Hildebrandt, T.Friedrich, J.Laufer // Mol Im Contr Agents. - 2016. - 9708
- Sampath, L. Near infrared fluorescent optical imaging for nodal staging / L.Sampath, W.Wang,
 E.M.Sevick-Muraca // J Biomed Opt. 2008. 13. 4. P.041312.
- Liao, S.M. Near infrared optical technologies to illuminate the status of the neonatal brain / S.M.Liao, J.P.Culver // Curr Pediatr Rev. - 2014. - 10. 1. - P.73-86.
- McIsaac R.S., Directed evolution of a far-red fluorescent rhodopsin / R.S.McIsaac, M.K.Engqvist, T.Wannier, A.Z.Rosenthal, L.Herwig, N.C.Flytzanis, E.S.Imasheva, J.K.Lanyi,

S.P.Balashov, V.Gradinaru, F.H.Arnold // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2014. - 111. 36. - P.13034-13039.

- 133. Zhu, B. Longitudinal far red gene-reporter imaging of cancer metastasis in preclinical models: a tool for accelerating drug discovery / B.Zhu, H.Robinson, S.Zhang, G.Wu, E.M.Sevick-Muraca // Biomed Opt Express. - 2015. - 6. 9. - P.3346-3351.
- Rumyantsev, K.A. Near-infrared bioluminescent proteins for two-color multimodal imaging / K.A.Rumyantsev, K.K.Turoverov, V.V.Verkhusha // Scientific Reports. - 2016. - 6. - P.36588.
- Barbieri, A. The Rise of Near-Infrared Emitters: Organic Dyes, Porphyrinoids, and Transition Metal Complexes / A.Barbieri, E.Bandini, F.Monti, V.K.Praveen, N.Armaroli // Top Curr Chem (J). - 2016. - 374. 4. - P.47.
- 136. Badr, C.E. Bioluminescence imaging: progress and applications / C.E.Badr, B.A.Tannous // Trends Biotechnol. - 2011. - 29. 12. - P.624-633.
- 137. Keyaerts, M. Bioluminescence imaging: looking beyond the light / M.Keyaerts, V.Caveliers, T.Lahoutte // Trends Mol Med. - 2012. - 18. 3. - P.164-172.
- 138. Choy, G. Comparison of noninvasive fluorescent and bioluminescent small animal optical imaging / G.Choy, S.O'Connor, F.E.Diehn, N.Costouros, H.R.Alexander, P.Choyke, S.K.Libutti // Biotechniques. - 2003. - 35. 5. - P.1022-1026, 1028-1030.
- 139. Rabinovich, B.A. Visualizing fewer than 10 mouse T cells with an enhanced firefly luciferase in immunocompetent mouse models of cancer / B.A.Rabinovich, Y.Ye, T.Etto, J.Q.Chen, H.I.Levitsky, W.W.Overwijk, L.J.Cooper, J.Gelovani, P.Hwu // Proceedings of the National Academy of Sciences. - 2008. - 105. 38. - P.14342-14346.
- 140. Kim, J.B. Non-invasive detection of a small number of bioluminescent cancer cells in vivo / J.B.Kim, K.Urban, E.Cochran, S.Lee, A.Ang, B.Rice, A.Bata, K.Campbell, R.Coffee, A.Gorodinsky, Z.Lu, H.Zhou, T.K.Kishimoto, P.Lassota // PLoS One. - 2010. - 5. 2. - P.e9364.
- Shimomura, O. Bioluminescence in the sea: photoprotein systems / O.Shimomura // Symp Soc Exp Biol. - 1985. - 39. - P.351-372.
- Gould, S.J. Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology / S.J.Gould, S.Subramani //
 Anal Biochem. 1988. 175. 1. P.5-13.
- Markova, S.V. Coelenterazine-dependent luciferases / S.V.Markova, E.S.Vysotski // Biochemistry (Mosc). - 2015. - 80. 6. - P.714-732.
- 144. Kaskova, Z.M. 1001 lights: luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine / Z.M.Kaskova, A.S.Tsarkova, I.V.Yampolsky // Chem Soc Rev. - 2016. - 45. 21. - P.6048-6077.

- 145. Takeuchi, M. Ratiometric bioluminescence indicators for monitoring cyclic adenosine 3',5'monophosphate in live cells based on luciferase-fragment complementation / M.Takeuchi, Y.Nagaoka, T.Yamada, H.Takakura, T.Ozawa // Anal Chem. - 2010. - 82. 22. - P.9306-9313.
- 146. Caysa, H. A redshifted codon-optimized firefly luciferase is a sensitive reporter for bioluminescence imaging / H.Caysa, R.Jacob, N.Muther, B.Branchini, M.Messerle, A.Soling // Photochem Photobiol Sci. - 2009. - 8. 1. - P.52-56.
- 147. Branchini, B.R. Luciferase from the Italian firefly Luciola italica: molecular cloning and expression / B.R.Branchini, T.L.Southworth, J.P.DeAngelis, A.Roda, E.Michelini // Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. - 2006. - 145. 2. - P.159-167.
- 148. Viviani, V.R. Active-site properties of Phrixotrix railroad worm green and red bioluminescenceeliciting luciferases / V.R.Viviani, F.G.Arnoldi, B.Venkatesh, A.J.Neto, F.G.Ogawa, A.T.Oehlmeyer, Y.Ohmiya // J Biochem. - 2006. - 140. 4. - P.467-474.
- 149. Jathoul, A.P. A dual-color far-red to near-infrared firefly luciferin analogue designed for multiparametric bioluminescence imaging / A.P.Jathoul, H.Grounds, J.C.Anderson, M.A.Pule // Angew Chem Int Ed Engl. - 2014. - 53. 48. - P.13059-13063.
- 150. Kuchimaru, T. A luciferin analogue generating near-infrared bioluminescence achieves highly sensitive deep-tissue imaging / T.Kuchimaru, S.Iwano, M.Kiyama, S.Mitsumata, T.Kadonosono, H.Niwa, S.Maki, S.Kizaka-Kondoh // Nat Commun. - 2016. - 7. - P.11856.
- 151. Branchini, B.R. Chemically modified firefly luciferase is an efficient source of near-infrared light
 / B.R.Branchini, D.M.Ablamsky, J.C.Rosenberg // Bioconjug Chem. 2010. 21. 11. P.2023-2030.
- So, M.K. Self-illuminating quantum dot conjugates for in vivo imaging / M.K.So, C.Xu,
 A.M.Loening, S.S.Gambhir, J.Rao // Nat Biotechnol. 2006. 24. 3. P.339-343.
- 153. Schaub, F.X. Fluorophore-NanoLuc BRET Reporters Enable Sensitive In Vivo Optical Imaging and Flow Cytometry for Monitoring Tumorigenesis / F.X.Schaub, M.S.Reza, C.A.Flaveny, W.Li, A.M.Musicant, S.Hoxha, M.Guo, J.L.Cleveland, A.L.Amelio // Cancer Res. - 2015. - 75. 23. - P.5023-5033.
- 154. Dragulescu-Andrasi, A. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) imaging of proteinprotein interactions within deep tissues of living subjects / A.Dragulescu-Andrasi, C.T.Chan, A.De, T.F.Massoud, S.S.Gambhir // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2011. - 108. 29. - P.12060-12065.
- 155. Mezzanotte, L. A novel luciferase fusion protein for highly sensitive optical imaging: from single-cell analysis to in vivo whole-body bioluminescence imaging / L.Mezzanotte, V.Blankevoort, C.W.Lowik, E.L.Kaijzel // Anal Bioanal Chem. - 2014. - 406. 23. - P.5727-5734.

- McDonagh, A.F. Preparation and properties of crystalline biliverdin IX alpha. Simple methods for preparing isomerically homogeneous biliverdin and [14C[biliverdin by using 2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone / A.F.McDonagh, L.A.Palma // Biochem J. 1980. 189. 2. P.193-208.
- Oheocha, C. Spectral properties of the phycobilins. I. Phycocyanobilin / C.Oheocha // Biochemistry. - 1963. - 2. - P.375-382.
- 158. Gambetta, G.A. Genetic engineering of phytochrome biosynthesis in bacteria / G.A.Gambetta,
 J.C.Lagarias // Proc Natl Acad Sci U S A. 2001. 98. 19. P.10566-10571.
- Aaij, C. The gel electrophoresis of DNA / C.Aaij, P.Borst // Biochim Biophys Acta. 1972. 269. 2. P.192-200.
- Pedelacq, J.D. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein / J.D.Pedelacq, S.Cabantous, T.Tran, T.C.Terwilliger, G.S.Waldo // Nat Biotechnol. - 2006. - 24.
 1. - P.79-88.
- Pace, C.N. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein / C.N.Pace,
 F.Vajdos, L.Fee, G.Grimsley, T.Gray // Protein Sci. 1995. 4. 11. P.2411-2423.
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K.Laemmli // Nature. - 1970. - 227. 5259. - P.680-685.
- 163. Jose, J. Water-soluble Nile Blue derivatives: syntheses and photophysical properties / J.Jose,
 Y.Ueno, K.Burgess // Chemistry. 2009. 15. 2. P.418-423.
- 164. Kremers, G.J. Improved green and blue fluorescent proteins for expression in bacteria and mammalian cells / G.J.Kremers, J.Goedhart, D.J.van denHeuvel, H.C.Gerritsen, T.W.Gadella, Jr. // Biochemistry. - 2007. - 46. 12. - P.3775-3783.
- Baneyx, F. Recombinant protein expression in Escherichia coli / F.Baneyx // Curr Opin Biotechnol. - 1999. - 10. 5. - P.411-421.
- 166. Xia, J.J. Characterizing beef muscles with optical scattering and absorption coefficients in VIS-NIR region / J.J.Xia, E.P.Berg, J.W.Lee, G.Yao // Meat Sci. - 2007. - 75. 1. - P.78-83.
- 167. Marquez, G. Anisotropy in the absorption and scattering spectra of chicken breast tissue / G.Marquez, L.V.Wang, S.P.Lin, J.A.Schwartz, S.L.Thomsen // Appl Opt. - 1998. - 37. 4. - P.798-804.
- 168. Grabtchak, S. Optical absorption and scattering properties of bulk porcine muscle phantoms from interstitial radiance measurements in 650-900 nm range / S.Grabtchak, L.G.Montgomery, W.M.Whelan // Phys Med Biol. - 2014. - 59. 10. - P.2431-2444.
- 169. Simpson, C.R. Near-infrared optical properties of ex vivo human skin and subcutaneous tissues measured using the Monte Carlo inversion technique / C.R.Simpson, M.Kohl, M.Essenpreis, M.Cope // Phys Med Biol. - 1998. - 43. 9. - P.2465-2478.

- 170. Driver, I. In vivo measurement of the optical interaction coefficients of human tumours at 630 nm / I.Driver, C.P.Lowdell, D.V.Ash // Phys Med Biol. 1991. 36. 6. P.805-813.
- Sandell, J.L. A review of in-vivo optical properties of human tissues and its impact on PDT / J.L.Sandell, T.C.Zhu // J Biophotonics. 2011. 4. 11-12. P.773-787.
- 172. Spliethoff, J.W. Real-time In Vivo Tissue Characterization with Diffuse Reflectance Spectroscopy during Transthoracic Lung Biopsy: A Clinical Feasibility Study / J.W.Spliethoff, W.Prevoo, M.A.Meier, J.de Jong, H.M.Klomp, D.J.Evers, H.J.Sterenborg, G.W.Lucassen, B.H.Hendriks, T.J.Ruers // Clin Cancer Res. - 2016. - 22. 2. - P.357-365.
- 173. Narikawa, R. A novel photoactive GAF domain of cyanobacteriochrome AnPixJ that shows reversible green/red photoconversion / R.Narikawa, Y.Fukushima, T.Ishizuka, S.Itoh, M.Ikeuchi // J Mol Biol. - 2008. - 380. 5. - P.844-855.
- 174. Ishizuka, T. Cyanobacteriochrome TePixJ of Thermosynechococcus elongatus harbors phycoviolobilin as a chromophore / T.Ishizuka, R.Narikawa, T.Kohchi, M.Katayama, M.Ikeuchi // Plant Cell Physiol. - 2007. - 48. 9. - P.1385-1390.
- 175. Zhang, J. Fused-gene approach to photoswitchable and fluorescent biliproteins / J.Zhang, X.J.Wu, Z.B.Wang, Y.Chen, X.Wang, M.Zhou, H.Scheer, K.H.Zhao // Angew Chem Int Ed Engl. - 2010. - 49. 32. - P.5456-5458.
- Rockwell, N.C. Red/green cyanobacteriochromes: sensors of color and power / N.C.Rockwell,
 S.S.Martin, J.C.Lagarias // Biochemistry. 2012. 51. 48. P.9667-9677.
- 177. Румянцев, К.А. Получение ближнеинфракрасного однодоменного флуоресцентного белка gaf-fp на основе бактериального фитохрома / К.А.Румянцев, Д.С.Щербакова, Н.И.Захарова, В.В.Верхуша, К.К.Туроверов // Цитология. - 2016. - 58. 10. - Р.
- 178. Toma-Dasu, I. Modelling tumour oxygenation, reoxygenation and implications on treatment outcome / I.Toma-Dasu, A.Dasu // Comput Math Methods Med. 2013. 2013. P.141087.
- Carlson, H.J. Circular permutated red fluorescent proteins and calcium ion indicators based on mCherry / H.J.Carlson, R.E.Campbell // Protein Eng Des Sel. - 2013. - 26. 12. - P.763-772.
- 180. Henkels, K.M. Cell invasion of highly metastatic MTLn3 cancer cells is dependent on phospholipase D2 (PLD2) and Janus kinase 3 (JAK3) / K.M.Henkels, T.Farkaly, M.Mahankali, J.E.Segall, J.Gomez-Cambronero // J Mol Biol. - 2011. - 408. 5. - P.850-862.
- Aguirre-Ghisoo J.A. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy / J.A.Aguirre-Ghiso // Nat Rev Cancer. - 2007. - 7. 11. - P.834-846.
- 182. Aguirre-Ghiso, J.A. On the theory of tumor self-seeding: implications for metastasis progression in humans / J.A.Aguirre-Ghiso // Breast Cancer Res. - 2010. - 12. 2. - P.304.
- 183. Marx, V. Tracking metastasis and tricking cancer / V.Marx // Nature. 2013. 494. 7435. P.133-136.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А

(рекомендуемое)

Таблица А.1 – Фотофизические свойства ближнеинфракрасных флуоресцентных белков на основе бактериальных фитохоромов

| Флуорес- центный белок | Максимум возбуждения флуорес- ценции, нм | Максимум флуорес- ценции, нм | Коэффици- ент экстинкции, M ⁻¹ ·см ⁻¹ | Квантовый выход флуо- ресценции | Молеку- лярная яр- кость, отн. ед.* | Молеку- лярный вес, кДа | Взаимодей- ствие между молекулами белка | Яркость флуоресценции в клетках HeLa, нормированная на яркость iRFP713, % | Ссылка | |
|---------------------------------|---|------------------------------------|--|---------------------------------------|--|-------------------------------|--|---|----------|--|
| Постоянно флуоресцирующие белки | | | | | | | | | | |
| IFP1.4 | 684 | 708 | 92000 | 0.070 | 6.4 | 35 | димер | 8 | [42] | |
| iRFP713 | 690 | 713 | 98000 | 0.063 | 6.2 | 35 | димер | <u>100</u> | [8] | |
| Wi-Phy | 701 | 719 | 93000 | 0.047 | 4.4 | 35 | мономер | | [47] | |
| iRFP670 | 643 | 670 | 114000 | 0.111 | 12.6 | | | 119 | - [2] | |
| iRFP682 | 663 | 682 | 90000 | 0.113 | 10.2 | 35 | | 105 | | |
| iRFP702 | 673 | 702 | 93000 | 0.082 | 7.6 | | димеры | 61 | | |
| iRFP720 | 702 | 720 | 96000 | 0.060 | 5.76 | | | 110 | | |
| IFP2.0 | 690 | 711 | 86100 | 0.080 | 6.9 | 35 | димер | 7.9 | [61, 62] | |
| IFP1.4 _{rev} | 685 | 708 | 131500 | 0.087 | 11.4 | 35 | мономер | | [63] | |
| mIFP | 683 | 704 | 82000 | 0.084 | 6.9 | 36 | мономер | 14 | [62] | |
| iBlueberry | 644 | 667 | 38000 | 0.069 | 2.6 | 36 | мономер | | [65] | |

| Флуорес- центный белок | Максимум возбуждения флуорес- ценции, нм | Максимум флуорес- ценции, нм | Коэффици- ент экстинкции, M ^{-1.} см ⁻¹ | Квантовый выход флуо- ресценции | Молеку- лярная яр- кость, отн. ед.* | Молеку- лярный вес, кДа | Взаимодей- ствие между молекулами белка | Яркость флуоресценции в клетках HeLa, нормированная на яркость iRFP713, % | Ссылка | |
|---------------------------------------|---|------------------------------------|--|---------------------------------------|--|-------------------------------|--|---|--------|--|
| GAF-FP | 635 | 670 | 49800 | 0.073 | 3.6 | 19.6 | мономер | 2.0 | [91] | |
| miRFP670 | 642 | 670 | 87400 | 0.140 | 12.2 | | | 72 | [64] | |
| miRFP703 | 674 | 703 | 90900 | 0.086 | 7.8 | 35 | мономеры | 37 | | |
| miRFP709 | 683 | 709 | 78400 | 0.054 | 4.2 | | | 30 | | |
| Фотоактивируемые флуоресцентные белки | | | | | | | | | | |
| PAiRFP1 | 690** | 717** | 67100 | 0.048 | 3.2 | 57 | | 25 | [10] | |
| PAiRFP2 | 692** | 719** | 63600 | 0.047 | 3.0 | | димеры | 25 | | |

* – произведение коэффициента экстинкции FP на значение его квантового выхода, деленное на 1000.

** – после фотоактивации.

Приложение Б

(рекомендуемое)

Рисунок Б.1 Эволюция ближнеинфракрасных FP на основе BphP. Нумерация аминокислотных замен для каждого эволюционного дерева соответствует нумерации аминокислот в BphP дикого типа (*подчеркнут*). FP выделены *красным*, а BphP – *серым*. Серия белков IFP выделена *синей штриховой кривой*; серия белков iRFP выделена *зеленой штриховой кривой*; серия белков mIFP выделена *оранжевой штриховой кривой*; серия белков miRFP выделена *красной штриховой кривой*.



Приложение В

(обязательное)

| Флуорес- центный белок | Длинно- волновый максимум поглощения, нм | Максимум флуорес- ценции, нм | Коэффи- циент экстинкции, M ⁻¹ ·см ⁻¹ | Квантовый выход флуорес- ценции | Молекулярная яркость, нормиро- ванная на яркость GAF-FP—BV, % | Время полу- созревания при 37 °С, ч | pKa ₁ | pKa ₂ | Яркость флуорес- ценции в клетках <i>E. coli</i> , нормиро- ванная на яркость GAF-FP—BV, % |
|---------------------------|--|------------------------------------|--|--|--|--|------------------|------------------|--|
| GAF-FP—BV i1 | 635 | 670 | 45650 | 0.057 | 72 | 4.1 | 4.8 | 8.1 | 58 |
| GAF-FP—BV i2 | 635 | 670 | 52300 | 0.065 | 94 | 3.7 | 4.7 | 8.1 | 111 |
| GAF-FP—BV i3 | 635 | 670 | 49600 | 0.062 | 85 | 5.4 | 4.7 | 8.0 | 56 |
| GAF-FP—BV i4 | 635 | 670 | 47400 | 0.055 | 72 | 5.1 | 4.6 | 7.8 | 60 |
| GAF-FP—PCB i1 | 625 | 657 | 66,500 | 0.124 | 227 | 3.0 | 4.4 | 9.1 | 111 |
| GAF-FP—PCB i2 | 625 | 657 | 83,000 | 0.127 | 290 | 3.3 | 4.6 | 8.6 | 182 |
| GAF-FP—PCB i3 | 625 | 657 | 81,500 | 0.128 | 287 | 4.4 | 4.7 | 8.2 | 55 |
| GAF-FP—PCB i4 | 625 | 657 | 72,500 | 0.114 | 227 | 3.7 | 4.8 | 8.4 | 158 |

Таблица В.1 – Фотофизические свойства мутантов GAF-FP с пептидными вставками и связанными с BV или PCB

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую признательность научным руководителям д.ф.-м.н., проф. Туроверову Константину Константиновичу и д.б.н. Верхуше Владиславу Витальевичу за предоставленную возможность работы над захватывающими проектами.

Автор благодарит своих коллег к.б.н. Шеметова Антона Александровича, к.б.н. Кабернюка Андрея Аркадьевича, к.х.н. Щербакову Дарью Михайловну и к.б.н. Степаненко Олесю Викторовну за помощь поддержку и ценные советы.

Автор глубоко признателен своей семье, кошке и собаке за поддержку, помощь, терпение и понимание.