

На правах рукописи



РУМЯНЦЕВ
Константин Алексеевич

**БЛИЖНЕИНФРАКРАСНЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ И
БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ БИОМАРКЕРЫ НА ОСНОВЕ
БАКТЕРИАЛЬНЫХ ФИТОХРОМОВ**

03.01.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте цитологии Российской академии наук (ИНЦ РАН)

Научные руководители: **ТУРОВЕРОВ Константин Константинович**
доктор физико-математических наук, профессор,
ИНЦ РАН, Санкт-Петербург, Россия

ВЕРХУША Владислав Витальевич
доктор биологических наук,
Медицинский колледж им. Альберта Эйнштейна,
Нью-Йорк, США

Официальные оппоненты: **ПАУТОВ Владимир Дмитриевич**
доктор физико-математических наук,
заведующий Лабораторией люминесценции, релаксационных
и электрических свойств полимерных систем Федерального
государственного бюджетного учреждения науки Института
высокомолекулярных соединений Российской академии наук,
Санкт-Петербург

СЛУЧАНКО Николай Николаевич
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник Лаборатории структурной биохимии белка Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва

Защита диссертации состоится «9» июня 2017 года в 14 часов на заседании Диссертационного совета Д 002.230.01 ИНЦ РАН по адресу 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4.

Адрес электронной почты института: cellbio@mail.cytspb.rssi.ru

Факс института: (812) 297-35-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИНЦ РАН (194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4) или на сайте института www.cytspb.rssi.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2017 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е.В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

В последнее время многократно расширилась область применения молекулярно-биологических подходов, использующих флуоресценцию и биолюминесценцию для наблюдения за внутриклеточными процессами как на уровне клеток, так и на уровне целого организма [1-4]. Многие исследовательские группы заняты поиском новых биомаркеров, отвечающих потребности в прижизненном и неинвазивном исследовании биологических процессов, происходящих глубоко в тканях и органах. Тем не менее, 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]. Светопроницаемость биологических тканей в этом спектральном диапазоне обусловлена низким светорассеянием и низким суммарным поглощением воды, меланина и гемоглобина. Наиболее перспективным источником для создания ближнеинфракрасных флуоресцентных белков (FP) стали бактериальные фитохромы (VphP), использующие биливердин IX α (BV) в качестве хромофора [5, 7]. Усилиями различных научных коллективов на основе VphP был получен ряд ярких ближнеинфракрасных FP с различными спектральными характеристиками [2, 8-10].

Однако до последнего времени оставались нерешенными задачи создания ближнеинфракрасного мономерного FP небольшого размера и генетически кодируемых источников яркой ближнеинфракрасной биолюминесценции. Уменьшение размеров и улучшение биохимических характеристик ближнеинфракрасных FP позволило бы расширить их применение благодаря большей востребованности в качестве репортеров активации генов или меток целевых белков. В то же время, несмотря на большое разнообразие пар люцифераза – субстрат, их спектры биолюминесценции преимущественно не выходят за границы видимого диапазона спектра, значительно ограничивая возможности их применения. Создание ближнеинфракрасных химерных люцифераз, использующих резонансный перенос энергии, путем слияния люциферазы и ближнеинфракрасного FP позволило бы значительно расширить цветовое разнообразие

Принятые сокращения:

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; VphP – бактериальный фитохром от англ. *bacterial phytochrome photoreceptor*; BV – биливердин от англ. *biliverdin IX α* ; FLuc – люцифераза светлячка *Photinus pyralis*; FP – флуоресцентный белок от англ. *fluorescent protein*; iRFP670, iRFP720 – ближнеинфракрасные FP, флуоресцирующие с максимумом спектра при 670 и 720 нм соответственно; PCB – фикоцианиобилин от англ. *phycocyanobilin*; RLuc8 – модифицированная люцифераза *Renilla reniformis* от англ. *Renilla luciferase*.

и увеличить чувствительность биомаркеров для визуализации тканей и органов животных. Решению этих задач и посвящена данная работа.

Цели и задачи

Целью 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 молекулярно-биологических процессов в клетках, тканях и органах животных. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. 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.
2. Определить механизм и условия связывания хромофоров в новом однодоменном флуоресцентном биомаркере.
3. 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.
4. 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 PCV 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 доменов 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 диагностики и лечения раковых заболеваний.

Положения, выносимые на защиту

1. 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 науч-

ном 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).

Финансовая поддержка

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума Российской Академии наук «Молекулярная и клеточная биология» (грант К.К. Туровой) 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.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 123 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, результаты и обсуждение, заключение и выводы. Материал иллюстрирован 42 рисунками и 6 таблицами. Библиографический указатель содержит 183 источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

В обзоре литературы приведены данные о ближнеинфракрасных FP на основе VphP и особенности их получения, а также рассмотрены примеры генетически кодируемых источников ближнеинфракрасной билюминесценции. Особое внимание уделено основным областям применения ближнеинфракрасных биомаркеров и передовым методам визуализации молекулярно-биологических процессов, происходящих глубоко в тканях животных.

Материалы и методы

Мутагенез и отбор клонов из бактериальных библиотек мутантов белка. Сайт-специфический и случайный мутагенез проводили с использованием QuikChange Mutagenesis Kit и GeneMorph II Random Mutagenesis Kit (Stratagene, США) соответственно. Полученная мутантная ДНК была использована для трансформации клеток *E. coli* путем электропорации. В работе использовали штамм *E. coli* LMG194, содержащий плазмиды *pWA23h* или *pL-PCB*, обеспечивающие синтез BV и PCB соответственно.

Библиотека мутантной ДНК в среднем включала не менее 10^6 клонов. Бактериальные клетки наращивали в течение ночи при 37 °C в среде RM (Fisher Scientific, США), содержащей ампициллин и канамицин. После индукции экспрессии белков путем введения в среду арабинозы до 0.004 % (для индукции экспрессии с *pBAD/HisB*) и рамнозы до 0.04 % (для индукции экспрессии с *pWA23h*), клетки культивировали в течение 6–8 ч. При дальнейшей культивации в течение 10–12 ч температуру снижали сначала до 30 °C, а затем до 18 °C и культивировали еще 24 ч. Библиотеки клонов анализировали с использованием клеточного сортера MoFlo XDP (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.

На основе анализа яркости флуоресценции отбирали 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.

Получение химерных белков. Белки слияния конструировали при помощи полимеразной цепной реакции. Линкер между белками состоял из двух (–GT–), семи (–GGGGSGT–) или 14 (–GGGGSGTGGGGSSG–) аминокислотных остатков (для химерных люцифераз) или пяти повторов последовательности аминокислот –GGGS– (для GAF-FP—sfGFP). Аминокислотная последовательность линкера была выбрана таким образом, чтобы обеспечить его наибольшую гидрофильность и подвижность.

Выделение и очистка белка. GAF-FP и его мутанты, содержащие полигистидиновый С-пептид, экспрессировали в клетках LMG194 согласно протоколу, представленному в работе Филонова и соавторов [8]. Рекомбинантный белок очищали при помощи никель-агарозы His-GraviTrap (GE Healthcare, Швеция) и использовали без дальнейших этапов очистки.

Анализ белков *in vitro*. Спектры флуоресценции измеряли с использованием спектрофлуориметра FluoroMax-3 (Horiba, Япония), а спектры поглощения – с использованием спектрофотометра U-2000 (Hitachi, Япония).

Связывание BV и PCB с GAF-FP анализировали путем регистрации цинк-индуцируемой флуоресценции комплекса денатурированного белка с хромофором в полиакриламидном геле

после электрофореза по Лэммли [11]. Анализ конкурентного связывания хромофоров с GAF-FP проводили по предложенной ранее методике [12]. Холобелок получали *in vitro* посредством инкубации апобелка с 10-кратным избытком BV, PCB или их смеси в различных пропорциях. Эффективность связывания BV относительно PCB оценивали на основе измеренных спектров поглощения растворов холобелка после инкубации. Вклад GAF-FP—BV или GAF-FP—PCB в спектр поглощения образца определяли благодаря различиям в спектрах поглощения разных холоформ FP. На основе этих данных определяли вклад каждой из холоформ GAF-FP, связанной с BV или с PCB. Соотношения между формами холобелка для каждого раствора были нормализованы путем вычитания величины, соответствующей образцу, содержащему 100 % PCB. Таким образом, образец со 100 % PCB принимался за «0», а образец со 100 % BV за «100».

Гель-фильтрацию проводили с использованием хроматографической колонки HiLoad 16/600 Superdex 200 (GE Healthcare, США), откалиброванной при помощи стандартов молекулярных масс (BioRad, США).

pH зависимость флуоресценции определяли путем измерения интенсивности флуоресценции растворов FP, приготовленных на основе буферных растворов с различными значениями pH.

Измерение биолюминесценции проводили на суспензиях бактериальных клеток (GAF-FP—RLuc8) или лизатах клеток линии HeLa (iRFP720—RLuc8 и iRFP670—RLuc8). Для этого 20 мкл клеточной суспензии или лизата смешивали с 20 мкл субстрата ProlumePurple (NanoLight Technologies, США), после чего измеряли сигнал при помощи системы IVIS Spectrum (PerkinElmer, США). Измерение резонансного переноса энергии проводили при помощи набора фильтров для измерения флуоресценции системы IVIS Spectrum. Для расчета значений эффективности резонансного переноса энергии использовали отношение интенсивности сигнала ближнеинфракрасной биолюминесценции к интенсивности общей биолюминесценции или к интенсивности сигнала люциферазы RLuc8.

Биохимические и физико-химические свойства бактериальных клеток-продуцентов

GAF-FP. Фотообесцвечивание бактерий проводили с использованием инвертированного эпифлуоресцентного микроскопа IX81 (Olympus, Япония), оснащенного 200 Вт металлогалогенной лампой Lumen220Pro (Prior, США), 100-кратным иммерсионным объективом UPlanSApo и набором фильтров для измерения флуоресценции (Olympus, Япония). Значения интенсивности флуоресценции нормализовали с учетом коэффициента пропускания фильтра возбуждения флуоресценции, коэффициентов экстинкции FP и перекрытия их спектров поглощения со спектром 200 Вт металлогалогенной лампы.

Для исследования скорости созревания FP проводили индукцию синтеза белка в клетках

бактерий при 37 °С в течение часа. Затем через равные интервалы времени оценивали интенсивность флуоресценции равных аликвот клеточной суспензии.

Изучение анаэробного созревания FP проводили в бактериальных клетках LMG194, содержащих плазмиды *pWA23h* или *pPL-PCB*. После индукции синтеза белка чашки Петри помещали в камеру с анаэробными условиями (Mitsubishi gas chemical, Япония) на 24 ч при 37 °С. После инкубации измеряли интенсивность флуоресценции бактерий с использованием эпифлуоресцентного микроскопа MZ16F (Leica, Германия). Незамедлительно после выполнения анализа чашки Петри 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. После инкубации при 4 °С колонии на чашках Петри снова анализировали. Окончательный уровень интенсивности флуоресценции бактерий принимался за 100 %. В качестве контролей использовали GFP-подобные FP зеленый EGFP и красный mCherry (54762 и 54630 соответственно, 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.

Клеточные культуры. Клетки линии HeLa CCL2 (ATCC, США) растили на среде Игла, модифицированной по способу Дульбекко, содержащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки, 0.5 % пенициллина, 0.5 % стрептомицина и 2 мМ глутамина (Life Technologies/Invitrogen, США). Клетки линии MTLn3 (предоставлены проф. Дж. И. Сегалом, Колледж А. Эйнштейна, США) растили на альфа-модификации среды Игла с теми же добавками. Трансфекцию плазмид осуществляли при помощи реагента Effectene (Qiagen, США) в соответствии с рекомендациями производителя. При необходимости к клеткам вводили растворы BV или PCB (Frontier Scientific, США) до конечной концентрации 10 мкМ за 24 ч до проведения имиджинга.

Проточная цитофлуориметрия. Интенсивность ближнеинфракрасной флуоресценции клеток линий HeLa и MTLn3, трансфицированных плазмидой, содержащей кодирующую последовательность изучаемого белка и полученной на основе вектора *pEGFP-N1* (Clontech, США), анализировали с использованием проточного цитофлуориметра LSRII (Becton Dickinson, США).

Флуоресцентный и биолюминесцентный имиджинг клеток. Эпифлуоресцентную микроскопию живых клеток линии HeLa, трансфицированных плазмидами, содержащими кодирующие последовательности изучаемых белков, проводили через 48 ч после трансфекции при помощи эпифлуоресцентного микроскопа IX81. Измерение биолюминесценции и флуоресцен-

ции клеток в 12-луночном планшете проводили при помощи системы IVIS Spectrum, используя набор фильтров с шириной полосы пропускания 20 нм. Непосредственно перед измерением биолюминесценции к клеткам вводили 200 мкл 50 мкМ раствора субстрата ProlumePurple или D-люфицерина для FLuc. Полученные значения интенсивности флуоресценции и биолюминесценции нормировали на флуоресценцию EGFP, чтобы нивелировать различия в эффективности трансфекции.

Измерение в мышинном фантоме. 5 мкл 8 мкМ очищенного раствора GAF-FP—RLuc8, GAF-FP или RLuc8 смешивали с 5 мкл 100 мкМ свежеприготовленного раствора субстрата ProlumePurple. Незамедлительно после смешивания образцы помещали в одну из двух полостей мышинного фантома XFM-2 (PerkinElmer/Caliper, США), имитирующего оптические свойства тканей. Полости располагались на глубине 7.0 мм и 18.1 мм под поверхностью мышинного фантома. Имиджинг проводили в биолюминесцентном и флуоресцентном режимах системы IVIS Spectrum. Мышиный фантом с образцом, содержащим только буферный раствор, использовали для определения интенсивности автофлуоресценции.

In vivo имиджинг. Для экспериментов использовали мышей линии CFW (Charles River, США) или линии SCID/NCr (Taconic, США) возрастом 4-6 недель. 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 инъецировали мышам линии CFW подкожно или через хвостовую вену. Для изучения роста опухолей 2 млн клеток стабильных линий MTLn3 инъецировали в молочную железу мышей линии SCID/NCr. Наблюдение проводили в течение 28 сут, используя биолюминесцентный или флуоресцентный режимы системы IVIS Spectrum. Непосредственно перед измерением биолюминесценции через хвостовую вену мышам вводили 50 мкл раствора субстрата ProlumePurple в фосфатно-солевом буферном растворе в количестве 0.7 мг на 1 кг веса животного.

Ex vivo имиджинг. Измерение флуоресценции органов мышей, извлеченных посмертно, проводили при помощи системы IVIS Spectrum. Для анализа метастазировавших клеток методом проточной цитофлуориметрии легкие мышей механически измельчали, полученную массу фильтровали через 40-микрометровый сетчатый нейлоновый фильтр и суспендировали в фосфатно-солевом буферном растворе. Анализ проводили в условиях, соответствующих анализу клеток линии MTLn3.

Статистическая обработка данных. Каждое измерение проводили не менее трех раз. Результаты считали достоверными при $P < 0.05$. Данные представлены в виде диаграмм с указанием максимального значения стандартного отклонения или в виде кривых с указанием минимального и максимального значений стандартного отклонения.

Основные результаты и их обсуждение

Получение ближнеинфракрасного однодоменного мономерного флуоресцентного белка

В качестве основы для разработки нового FP был выбран BV-связывающий бактериальный фитохром *Rhodospseudomonas palustris* RpBphP1 [13], не использовавшийся ранее для создания FP. В работе были использованы два домена RpBphP1: PAS домен, содержащий Cys19, необходимый для ковалентного связывания хромофора, и GAF домен, участвующий в стерическом связывании хромофора. Конструкт, состоящий из PAS и GAF доменов, подвергли направленному мутагенезу, после чего отобрали мутанты, обладающие наиболее яркой ближнеинфракрасной флуоресценцией (рис. 1, А). Среди них был обнаружен слабо флуоресцирующий мутантный белок, названный PAS—GAF-FP, содержащий среди прочих две важные аминокислотные замены: Cys19Ser и Ile252Cys. Поскольку PAS—GAF-FP обладал флуоресценцией и, следовательно, способностью связывать хромофор, было сделано предположение о том, что Cys252 в GAF домене мутантного белка взял на себя функцию ковалентного связывания хромофора.

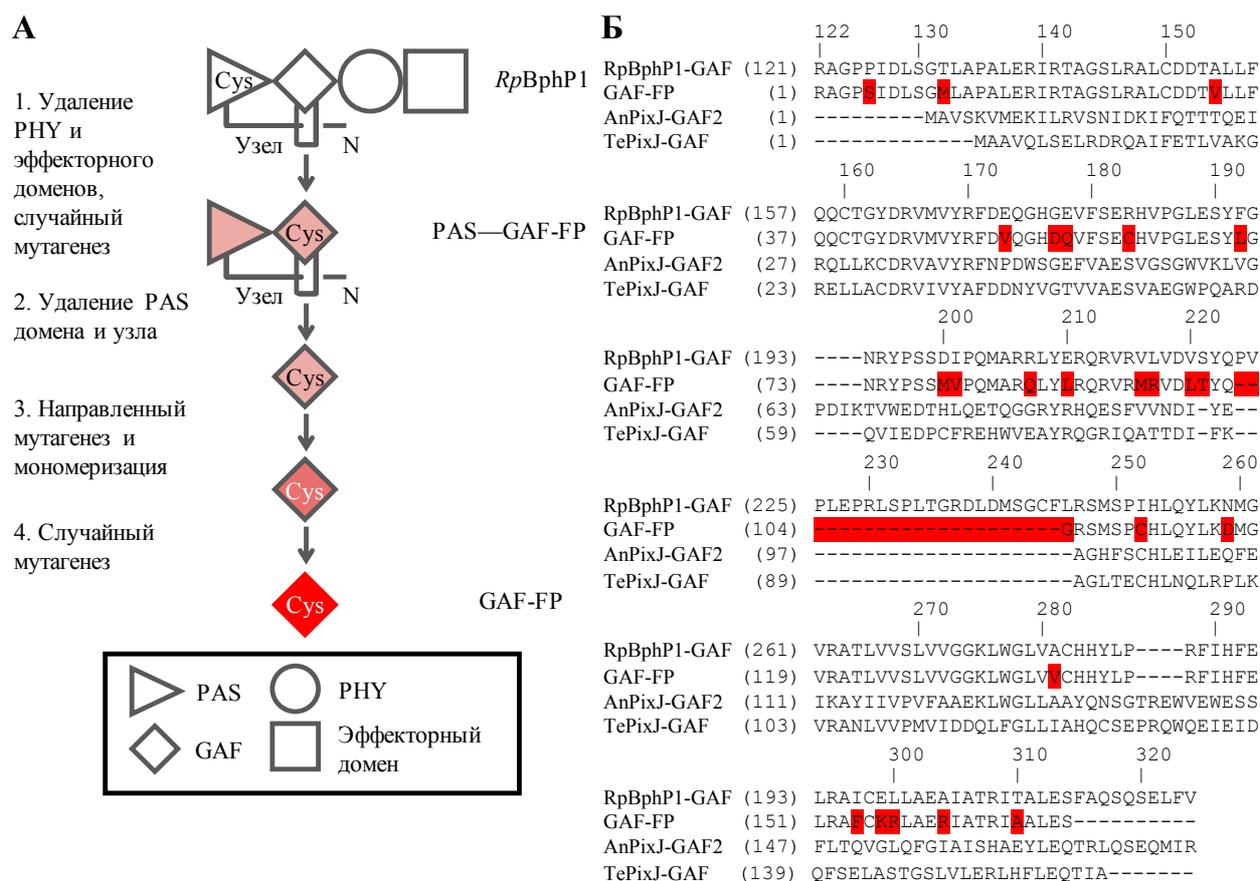


Рис. 1 Направленная молекулярная эволюция GAF-FP. А – схема с основными этапами направленной молекулярной эволюции RpBphP1, позволившей создать GAF-FP. Интенсивность окраски компонента схемы соответствует яркости флуоресценции соответствующего белка. Б – выравнивание аминокислотных последовательностей GAF домена RpBphP1, GAF-FP, а также GAF доменов фитохромов цианобактерий AnPixJ and TePixJ. Аминокислотные остатки GAF-FP, которые были изменены в процессе мутагенеза, обозначены черным шрифтом на красном фоне. Нумерация аминокислотных остатков приведена для RpBphP1.

Следовательно, согласно гипотезе, PAS домен потерял функциональную значимость и был удален, в результате чего, однако, FP потерял стабильность в растворе. При поиске решения данной проблемы было обращено внимание на сходство GAF домена PAS—GAF-FP с GAF доменами фитохромов цианобактерий (*AnPixJ* [14] и *TePixJ* [15]), способных связывать тетрапиррол фикоцианобилин (PCB) в качестве хромофора без участия других доменов. Наибольшее различие заключалось в отсутствии у последних узла, характерного для VphP (рис. 1, Б). Таким образом, после удаления узла, введения мономеризирующих мутаций и нескольких раундов случайного мутагенеза GAF домена PAS—GAF-FP удалось получить яркий однодоменный биомаркер, названный GAF-FP (рис. 1, А). В результате мутагенеза было изменено 15 % аминокислотной последовательности исходного GAF домена *RpVphP1*, не учитывая удаление 22-х аминокислотных остатков, участвовавших в образовании узла.

На основе сходства GAF-FP и PCB-связывающих GAF доменов фитохромов цианобактерий сделано было предположение, что GAF-FP способен связывать как BV, так и PCB, π -сопряжённая система связей которого имеет на две двойные связи меньше (рис. 2, А). Известно, что отличие в химической структуре тетрапирролов приводит к более коротковолновым спектрам поглощения и флуоресценции у PCB формы FP [12]. Экспрессия GAF-FP в бактериях в

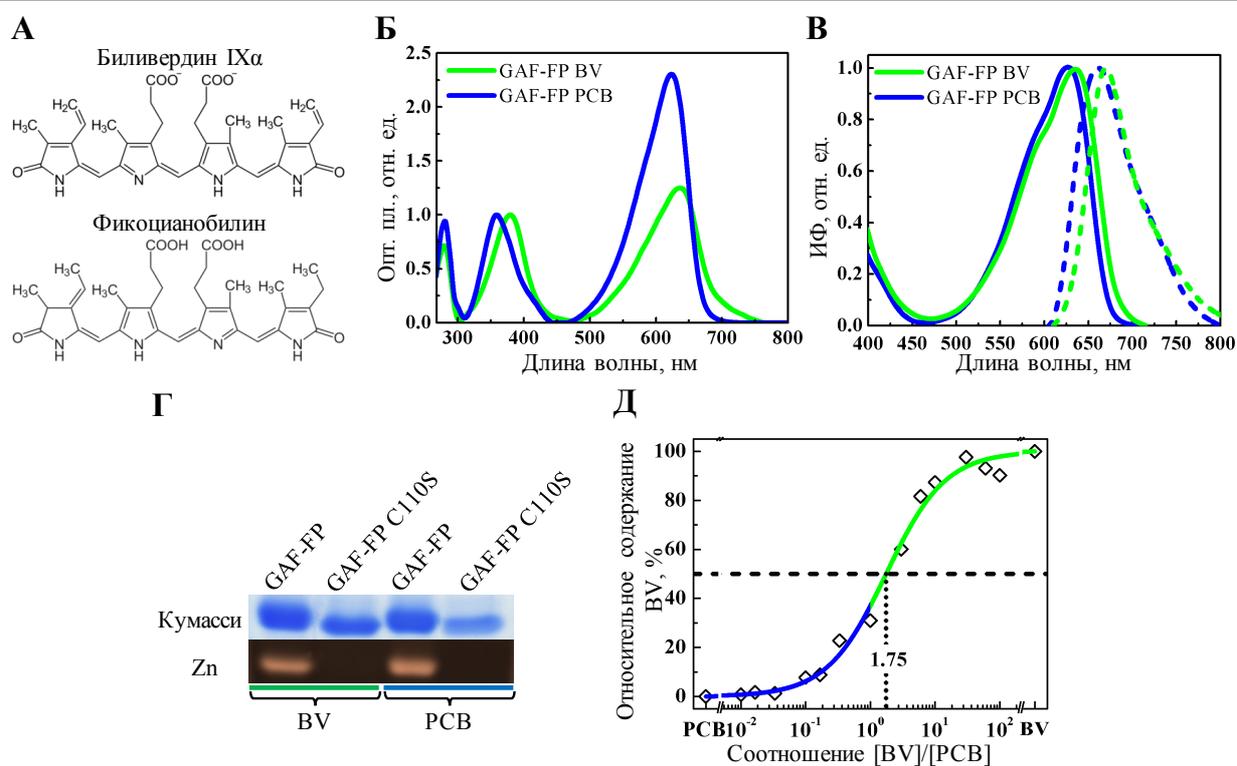


Рис. 2 Спектральные свойства и связывание хромофоров с GAF-FP. А – структурные формулы хромофоров GAF-FP. Б – нормализованные спектры поглощения GAF-FP—BV (зелёная кривая) и GAF-FP—PCB (синяя кривая). В – нормализованные спектры возбуждения флуоресценции (сплошные кривые) и флуоресценции (штриховые кривые) GAF-FP—BV и GAF-FP—PCB. Г – анализ ковалентного связывания BV и PCB с GAF-FP или его Cys110Ser мутантом. Показаны изображения геля, окрашенного Кумасси бриллиантовым синим или демонстрирующего цинк-индуцированную флуоресценцию тетрапирролов. Д – конкурентное связывание BV и PCB с апоформой GAF-FP. Штриховая линия – 50 % насыщение GAF-FP BV.

присутствии РСВ подтвердила выдвинутое предположение и показала, что биомаркер созревает и способен к флуоресценции с этим хромофором.

Для определения спектральных характеристик нового биомаркера были измерены спектры поглощения, возбуждения флуоресценции и флуоресценции GAF-FP—BV и GAF-FP—PCB в интервале длин волн от 260 до 800 нм (рис. 2, Б–В). По фотофизическим характеристикам GAF-FP полностью соответствует другим ближнеинфракрасным FP семейства iRFP, полученным на основе BphP [2], что свидетельствует о правильном встраивании хромофоров и созревании GAF-FP (табл. 1).

Таблица 1 – Фотофизические свойства GAF-FP, связанного с BV или РСВ

Флуоресцентный белок	Коротковолновый максимум поглощения, нм	Длинноволновый максимум поглощения, нм	Максимум флуоресценции, нм	Коэффициент экстинкции, $M^{-1} \cdot cm^{-1}$	Квантовый выход флуоресценции	Молекулярная яркость, %	Время полусозревания при 37 °С, ч	pKa ₁	pKa ₂
GAF-FP—BV	379	635	670	49800	0.073	100	4.0	4.0	7.8
GAF-FP—PCB	359	625	657	80500	0.121	268	3.5	4.6	8.3

Для подтверждения ковалентного связывания хромофоров посредством аминокислотного остатка цистеина в позиции 110 (Cys252 в GAF домене PAS-GAF-FP) он был заменен на сериновый остаток. Электрофоретический анализ очищенных GAF-FP и GAF-FP Cys110Ser с последующим окрашиванием геля на содержание тетрапирролов показал, что именно Cys110 ответственен за ковалентное связывание как BV, так и РСВ (рис. 2, Г).

Различия в связывании хромофоров с GAF-FP оценивали методом конкурентного связывания, заключающегося в инкубации очищенной апоформы GAF-FP со смесью хромофоров в различном соотношении последних (от 1 до 100). Соотношение между BV и РСВ, связавшимися с апобелком после инкубации, определяли спектрофотометрически благодаря различию спектров поглощения двух форм GAF-FP (рис. 2, Б). Было установлено, что GAF-FP связывает РСВ в 1.75 раз эффективнее, чем BV (рис. 2, Д).

Следующим этапом работы стало определение биохимических свойств нового однодоменного ближнеинфракрасного биомаркера. В качестве контроля был использован спектрально похожий двухдоменный ближнеинфракрасный iRFP670 на основе BphP. При определении pH зависимости интенсивности флуоресценции было обнаружено, что GAF-FP обладает двумя константами диссоциации-ассоциации (pKa) при pH 4.5 и при pH 8.0 (табл. 1), в то время как iRFP670 имеет pKa только при pH 4.5 [2]. Дополнительная pKa GAF-FP свидетельствует, что удаление PAS домена привело к снижению стабильности биомаркера в растворе. Тем не ме-

нее, в физиологических условиях (pH 7.2) GAF-FP обладает 70 % от максимальной интенсивности флуоресценции, а изменения pH в пределах от 2 до 10 не приводят к сдвигу его спектров флуоресценции (рис. 3, Б).

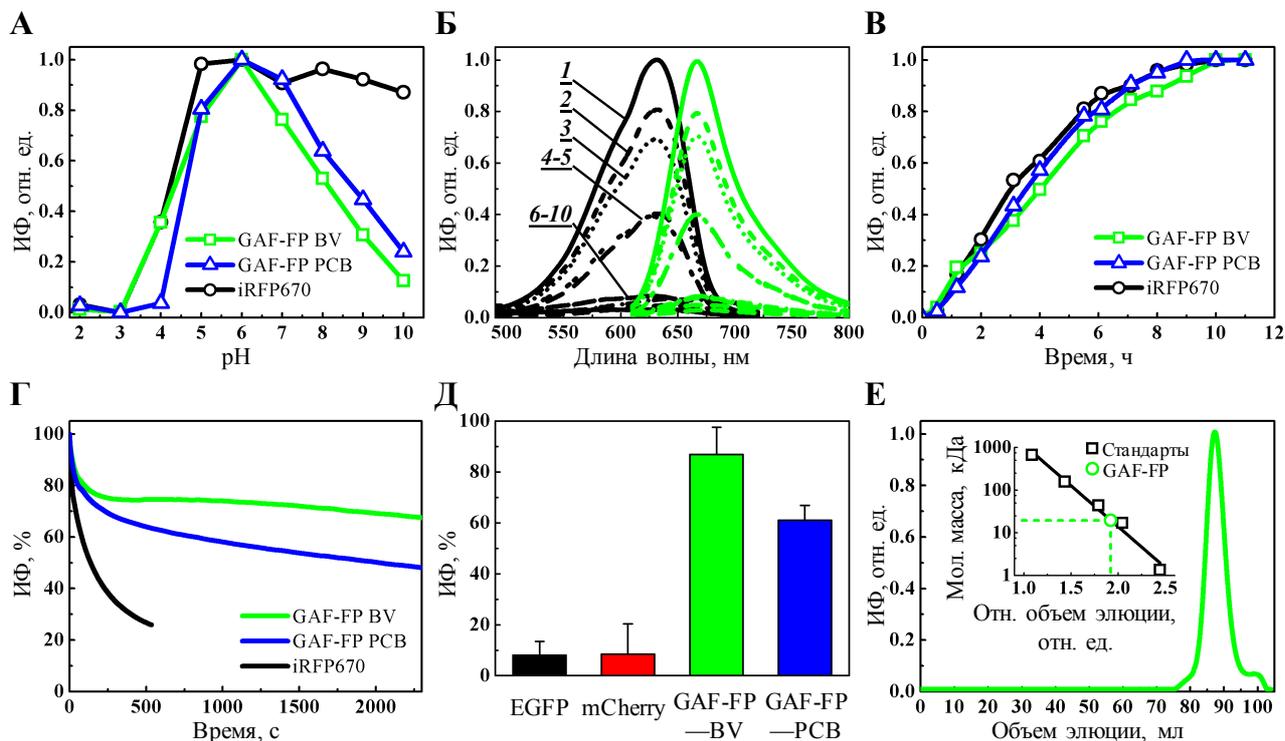


Рис. 3 Биохимические и физико-химические свойства GAF-FP. А – кривые зависимости интенсивности флуоресценции (ИФ) от pH. Б – зависимость спектров возбуждения флуоресценции (черные кривые) и флуоресценции (зеленые кривые) GAF-FP—BV от pH (кривая 1 – pH 6; кривая 2 – pH 5; кривая 3 – pH 7; кривые 4-5 – pH 4, 8; кривые 6-10 – pH 2, 3, 9, 10). В – кинетика роста ИФ биомаркеров в бактериальной культуре при 37 °С. Г – кинетика фотообесцвечивания биомаркеров под действием ближнеинфракрасного излучения. Д – эффективность созревания GAF-FP—BV и GAF-FP—PCB в анаэробных условиях в сравнении с GFP-подобными FP EGFP и mCherry; Приведен процент от максимальной ИФ, которой достигают FP в анаэробных условиях. Е – гель-фильтрация GAF-FP—BV. На врезке приведен калибровочный график.

Исследование скорости созревания GAF-FP в бактериальной культуре не выявило значительных отличий от iRFP670 по этому параметру (рис. 3, В). В то же время было показано, что GAF-FP обладает значительно большей фотостабильностью по сравнению с iRFP670 (рис. 3, Г). Экспрессия GAF-FP в анаэробных условиях выявила его способность к образованию холоднобелка в отсутствие кислорода в отличие от широко используемых GFP-подобных FP видимого спектрального диапазона EGFP и mCherry (рис. 3, Д). В перспективе эта особенность созревания GAF-FP может облегчить его применение и применение других FP на основе VphP там, где имеется недостаток кислорода, например, в развивающихся опухолях. Изучение олигомерного состояния очищенного белка методом гель-фильтрации продемонстрировало, что GAF-FP является мономером с массой порядка 20 кДа (рис. 3, Е).

Суммируя результаты анализа биохимических свойств GAF-FP, можно заключить, что новый однодоменный ближнеинфракрасный флуоресцентный биомаркер обладает рядом уникальных свойств, уступая двухдоменным FP на основе VphP только в pH стабильности.

Экспрессия новых биомаркеров в эукариотических клетках является важным этапом, необходимым для оценки их (белков) практического применения. Для экспрессии GAF-FP в

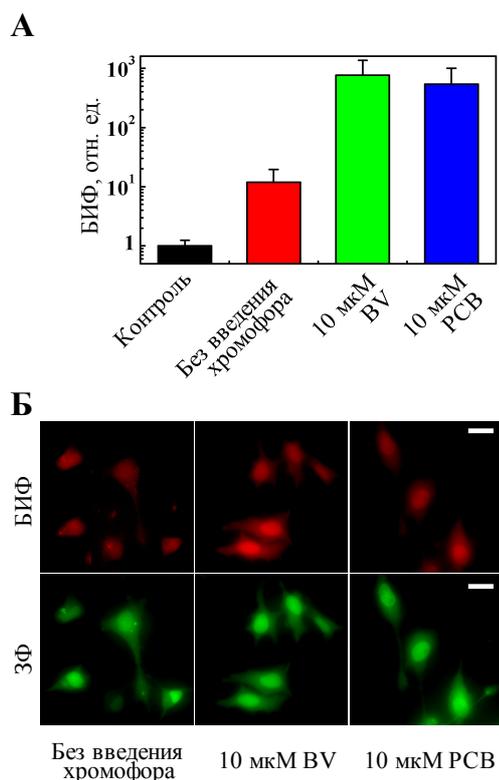


Рис. 4 Экспрессия GAF-FP в клетках животных. А – сравнение ближнеинфракрасной флуоресценции (БИФ) клеток линии HeLa, экспрессирующих GAF-FP–sfGFP, методом проточной цитофлуориметрии. Б – фотографии БИФ и зеленой флуоресценции (ЗФ) живых клеток линии HeLa, экспрессирующих GAF-FP–sfGFP. Время экспозиции 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.

клетках линии HeLa был создан белок слияния GAF-FP и sfGFP (superfolder GFP – высокостабильный мутант зеленого флуоресцентного белка) с гибким линкером из 20 аминокислот между белками. sfGFP позволил облегчить анализ и сравнение ближнеинфракрасной флуоресценции трансфицированных клеток методами проточной цитофлуориметрии и эпифлуоресцентной микроскопии (рис. 4). Поскольку количество BV внутри клеток могло быть недостаточным для насыщения всего апобелка, а PCB в естественных условиях в клетках не присутствует, часть клеток культивировали в среде с 10 мкМ BV или PCB в среде в течение 24 ч до анализа. Методом проточной цитофлуориметрии было установлено, что ближнеинфракрасная флуоресценция клеток, экспрессирующих GAF-FP, без введения в среду экзогенных хромофоров превышает уровень автофлуоресценции в 12 раз, а при введении хромофоров интенсивность флуоресценции клеток возрастает еще в 65 и 45 раз для BV и PCB соответственно (рис. 4, А). Эпифлуоресцентная микроскопия трансфицированных клеток HeLa, экспрессирующих GAF-FP–sfGFP, показала равномерное распределение интенсивности сигнала флуоресценции в цитоплазме клеток и, следовательно, отсутствие в них агрегатов GAF-FP (рис. 4, Б), что свидетельствует о стабильности белка.

Получение флуоресцентных и биолюминесцентных биомаркеров на основе бактериальных фитохромов

Биолюминесценция широко используется в биомедицине и является эффективным инструментом для обнаружения и наблюдения малых количеств исследуемых объектов, например, опухолевых клеток. Основным преимуществом биолюминесценции перед флуоресценцией является практически полное отсутствие фонового сигнала, вызываемого автофлуоресценцией. Для исследования возможности создания ближнеинфракрасного биолюминесцентного маркера на основе GAF-FP нами была использована его способность поглощать свет в

фиолетовой области спектра. В качестве донора энергии для возбуждения ближнеинфракрасной флуоресценции GAF-FP была использована яркая мономерная модифицированная люцифераза *Renilla reniformis* (RLuc8), излучающая свет с максимумом при 400 нм при окислении субстрата ProlumePurple II (рис. 5, А). При слиянии FP и люциферазы были созданы несколько химерных конструкторов с различной длиной линкера между белками и их очередностью в конструкторе. Для выбора оптимальной химерного белка была оценена относительная эффективность резонансного переноса энергии между донором и акцептором (рис. 5, Б). Анализ показал, что наиболее эффективным оказался конструктор с люциферазой на С-конце, отделенной от FP линкером из двух аминокислот, названный GAF-FP—RLuc8.

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. Для проведения эксперимента равные количества

очищенных белков (GAF-FP—RLuc8, смесь GAF-FP с RLuc8 или только RLuc8) смешивали с субстратом, немедленно помещали в фантом на различную глубину и производили имиджинг в разных спектральных каналах. На основе полученных изображений были определены интенсивность ближнеинфракрасной биоломинесценции и соотношение сигнала флуоресценции к сигналу автофлуоресценции для исследуемых образцов. В канале 680 нм интенсивность биоломинесценции GAF-FP—RLuc8 в 10 раз превосходит яркость смеси GAF-FP с RLuc8 и более чем в 100 раз яркость RLuc8

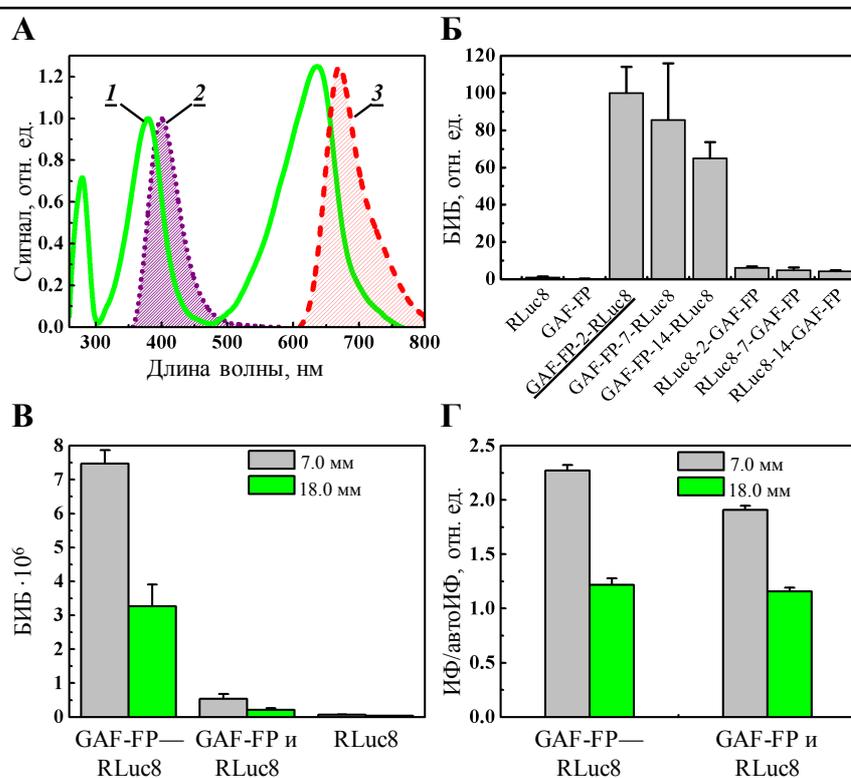


Рис. 5 Оценка оптических свойств GAF-FP—RLuc8. А – спектральная картина резонансного переноса энергии биоломинесценции от RLuc8 к GAF-FP. Кривая 1 – спектр поглощения GAF-FP—BV. Кривая 2 – спектр биоломинесценции RLuc8. Кривая 3 – спектр флуоресценции GAF-FP—BV. Б – поиск оптимальной структуры химерного белка. Для сравнения использовали интенсивность ближнеинфракрасной биоломинесценции (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 %. В – сравнение интенсивности БИБ (фотон·с⁻¹·см⁻²·ср⁻¹) белков внутри мышинного фантома на различной глубине. Г – сравнение отношений интенсивности флуоресценции (ИФ) к интенсивности автофлуоресценции (автоИФ) для биомаркеров внутри мышинного фантома на различной глубине.

(рис. 5, В). Ближнеинфракрасная флуоресценция GAF-FP также обладает высоким соотношением сигнала флуоресценции к сигналу автофлуоресценции (рис. 5, Г). Для химерного белка это соотношение составило 2.3 и 1.2 для глубин в 7.0 и 18.1 мм соответственно.

Апробированный на примере GAF-FP—RLuc8 уникальный подход к созданию ближнеинфракрасных химерных люцифераз позволил расширить их палитру путем разработки новых химерных белков на основе iRFP670 и iRFP720 [2]. Эти двухдоменные ближнеинфракрасные FP, полученные ранее в лаборатории В.В. Верхуши, проявили себя как яркие, стабильные и хорошо спектрально различимые биомаркеры для биомедицинских исследований. Следуя методике, отработанной на GAF-FP—RLuc8, был создан набор химерных белков на основе iRFP670, iRFP720 и RLuc8 и проведена оценка интенсивности их флуоресценции и биолюминесценции относительно исходных белков (рис. 6, А). Результаты сравнения выявили, что конструкции с линкером из семи аминокислот обладают более высокой интенсивностью сигнала, чем конструкции с линкером из двух аминокислот. Однако анализ эффективности резонансного переноса энергии между донором и акцептором выявил, что конструкции с линкером из двух аминокислот и люциферазой на С-конце химерного белка более эффективны (рис. 6, Б), что приводит к увеличению доли ближнеинфракрасной биолюминесценции и определило выбор этих конструкций в качестве новых химерных люцифераз, названных iRFP670—RLuc8 и iRFP720—RLuc8. Изменение их спектров ближнеинфракрасной биолюминесценции показало, что слияние люциферазы и FP не привело к изменению спектров последних и сигналы химерных люцифераз хорошо спектрально различимы (рис. 6, В).

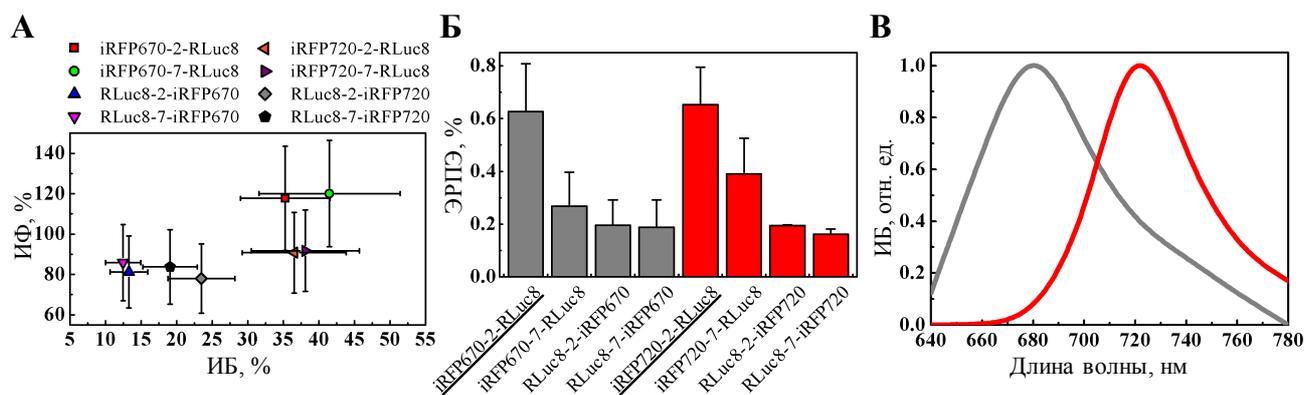


Рис. 6 Создание ближнеинфракрасных химерных люцифераз на основе iRFP670 и iRFP720. А – интенсивность флуоресценции (ИФ) химерных конструкций, отложенная относительно интенсивности их биолюминесценции (ИБ). Яркость исходных белков (iRFP670, iRFP720 и RLuc8) принята за 100%. Б – оценка эффективности резонансного переноса энергии (ЭПЭ) биолюминесценции в химерных конструкциях. В – спектры ближнеинфракрасной биолюминесценции iRFP670—RLuc8 (серая кривая) и iRFP720—RLuc8 (красная кривая).

Для изучения возможностей использования iRFP670—RLuc8 и iRFP720—RLuc8 в многоцветном имиджинге клеток млекопитающих, химерные люциферазы экспрессировали в клетках линии HeLa (рис. 7). В качестве дополнительных цветов биолюминесценции и флуорес-

ценции были использованы люцифераза светлячка (FLuc) и улучшенный зеленый флуоресцентный белок (EGFP) соответственно. Применяв процедуру спектрального разложения сигнала для изображений, полученных за счет последовательного имиджинга планшета в нескольких каналах, удалось различить три цвета билюминесценции (iRFP670—RLuc8, iRFP720—RLuc8 и FLuc) и три цвета флуоресценции (iRFP670—RLuc8, iRFP720—RLuc8 и EGFP) (рис. 7, А). Высокая яркость ближнеинфракрасной билюминесценции и флуоресценции химерных люцифераз позволила достичь высокого контраста двухцветного мечения клеток и высокого соотношения сигналов билюминесценции и флуоресценции к фоновому сигналу (рис. 7, Б–Г).

Низкие значения фонового сигнала билюминесценции являются определяющим фактором высокой чувствительности билюминесцентного имиджинга, широко применяемого в качестве неинвазивного способа изучения молекулярно-биологических процессов и наблюдения за ростом и метастазированием раковых опухолей в животных. Для определения пределов чув-

ствительности этого метода было решено установить минимальное количество клеток, меченных iRFP670—RLuc8 или iRFP720—RLuc8, которое можно обнаружить в мышцах при помощи флуоресцентного и билюминесцентного имиджинга.

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

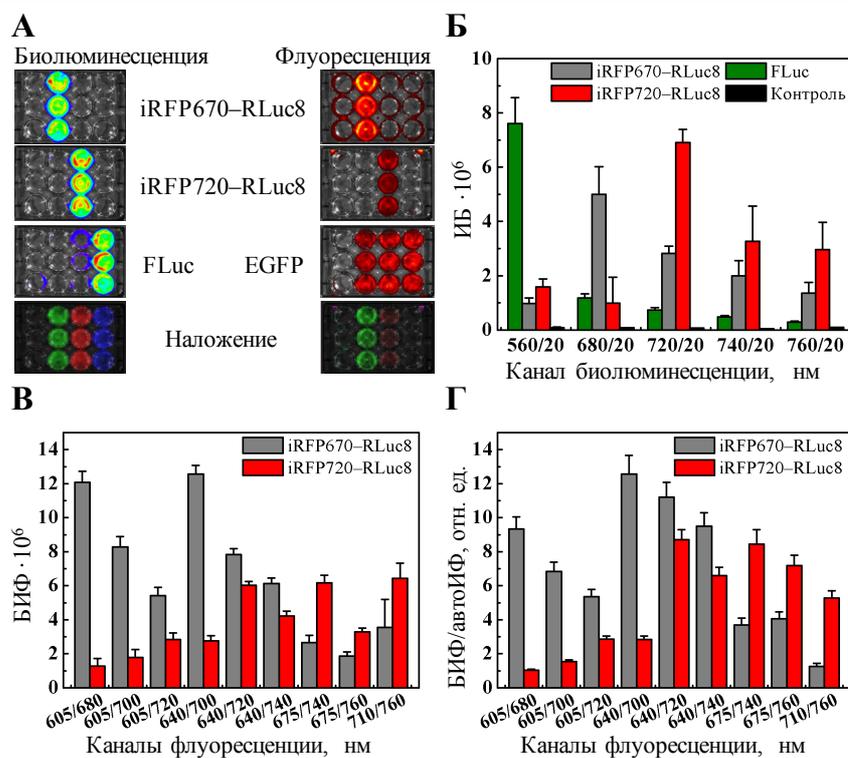


Рис. 7 Многоцветный флуоресцентный и билюминесцентный имиджинг клеток животных. А – билюминесцентные и флуоресцентные изображения 12-луночного планшета с клетками линии HeLa, трансфицированными плазмидами, кодирующими iRFP670—RLuc8, iRFP720—RLuc8, FLuc и EGFP, после применения процедуры спектрального разложения. Б – сравнение интенсивности билюминесценции (ИБ, $\text{фотон} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{ср}^{-1}$) люцифераз в различных каналах; В – сравнение интенсивности ближнеинфракрасной флуоресценции (БИФ, $(\text{фотон} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{ср}^{-1}) / (\text{мкВт} \cdot \text{см}^{-2})$) iRFP670—RLuc8 и iRFP720—RLuc8 для различных сочетаний каналов возбуждения/регистрации флуоресценции; Г – сравнение отношений БИФ к интенсивности автофлуоресценции (автоИФ) для iRFP670—RLuc8 и iRFP720—RLuc8 в различных каналах.

определения пределов чувствительности был проведен флуоресцентный и биолюминесцентный имиджинг от 10^2 до 10^6 клеток, инъецированных мышам подкожно в область спины. По полученным данным были построены калибровочные графики, показывающие зависимость интенсивности сигнала от количества введенных клеток (рис. 8, А–Б). Из графиков было установлено, что ближнеинфракрасная биолюминесценция химерных конструкторов обладает на порядок большей чувствительностью (от 10^3 до 10^4 клеток), чем ближнеинфракрасная флуоресценция соответствующих iRFP (от 10^4 до 10^5 клеток) при обнаружении подкожно инъецированных клеток.

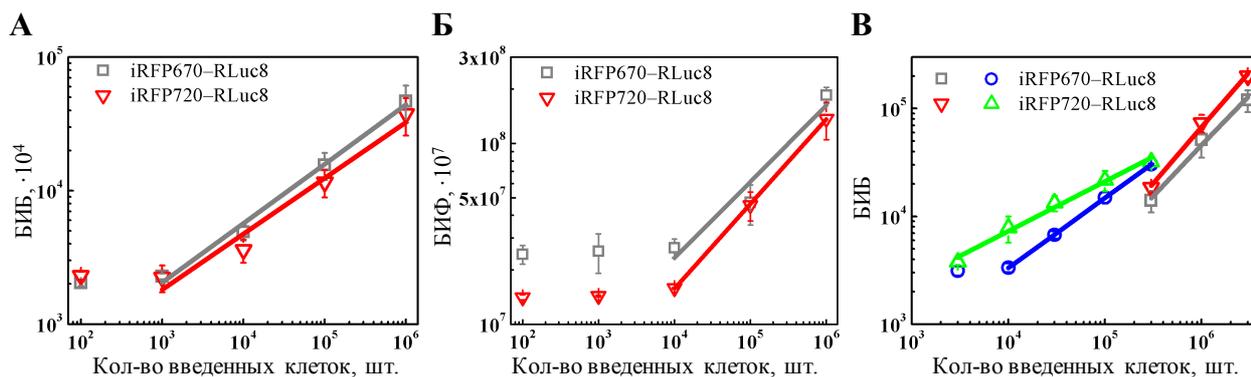


Рис. 8 Определение пределов чувствительности биолюминесцентного и флуоресцентного *in vivo* имиджинга с использованием химерных люцифераз. А – зависимость интенсивности ближнеинфракрасной биолюминесценции (БИБ, $\text{фотон} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{ср}^{-1}$) от количества клеток, введенных мышам подкожно. Б – зависимость интенсивности ближнеинфракрасной флуоресценции (БИФ, $(\text{фотон} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{ср}^{-1}) / (\text{мкВт} \cdot \text{см}^{-2})$) от количества клеток, инъецированных мышам подкожно. В – зависимость интенсивности БИБ от количества клеток, расположенных в легких мышей, как при имиджинге двух конструкторов одновременно, так и каждого по отдельности. *Серые линии* – зависимость интенсивности сигнала iRFP670—RLuc8 при двухцветном имиджинге. *Красные линии* – зависимость интенсивности сигнала iRFP720—RLuc8 при двухцветном имиджинге. *Синяя линия* – зависимость интенсивности сигнала iRFP670—RLuc8 при одноцветном имиджинге. *Зеленая линия* – зависимость интенсивности сигнала iRFP720—RLuc8 при одноцветном имиджинге.

На основе выявленных различий в биолюминесцентном и флуоресцентном имиджинге была выдвинута гипотеза, что биолюминесценция будет обладать еще большим преимуществом перед флуоресценцией при визуализации клеток, расположенных глубоко в тканях. Для подтверждения этой гипотезы был проведен имиджинг от $3 \cdot 10^3$ до $3 \cdot 10^6$ клеток MTLn3, стабильно экспрессирующих iRFP670—RLuc8 или iRFP720—RLuc8, инъецированных мышам через хвостовую вену. При таком способе введения большая часть клеток задерживается в легких мышей. Чувствительность ближнеинфракрасной флуоресценции iRFP оказалась недостаточной для анализа исследуемого диапазона количества клеток, в то время как ближнеинфракрасная биолюминесценция позволила провести имиджинг клеток и построить калибровочный график (рис. 8, В). Таким образом было установлено, что при двухцветном имиджинге химерных люцифераз, с временем экспозиции в каждом канале менее 1 мин, ближнеинфракрасная биолюминесценция позволяет визуализировать порядка $3 \cdot 10^5$ клеток. При имиджинге каждой химерной люциферазы по отдельности и без использования фильтров с узкой полосой

пропускания ближнеинфракрасная билюминесценция позволяет увидеть порядка $3 \cdot 10^4$ или 10^4 клеток, экспрессирующих iRFP670—RLuc8 или iRFP720—RLuc8 соответственно.

Следующей задачей стало изучение кинетики роста опухолей и их метастазирования при помощи ближнеинфракрасных химерных люцифераз. Для этого $2 \cdot 10^6$ клеток MTLn3, стабильно экспрессирующих iRFP670—RLuc8 или iRFP720—RLuc8, были инъецированы в молочные железы мышей. Наблюдение за ростом опухолей, возникших на месте инъекций, проводили на протяжении 28 суток путем регулярного имиджинга их билюминесценции и флуоресценции (рис. 9).

Данные билюминесцентного и флуоресцентного имиджинга показали, что кинетика роста опухолей соответствует профилю, характерному для данного типа клеток и места инъекции [2], свидетельствуя об успешном применении ближнеинфракрасных химерных люцифераз для исследования раковых образований как на ранних, так и на поздних стадиях их развития.

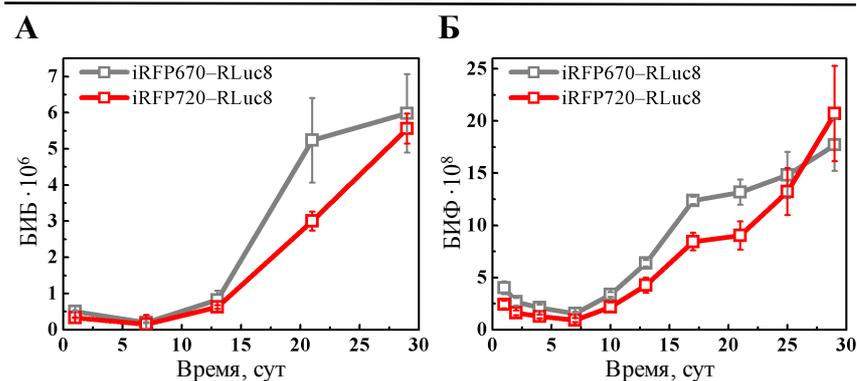


Рис. 9 Кинетика роста опухолей, экспрессирующих iRFP670—RLuc8 или iRFP720—RLuc8. Зависимости интенсивности ближнеинфракрасной билюминесценции (БИБ, $\text{фотон} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{ср}^{-1}$) (А) или интенсивности ближнеинфракрасной флуоресценции (БИФ, $\text{фотон} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{ср}^{-1} / (\text{мкВт} \cdot \text{см}^{-2})$) (Б) опухолей молочных желез мышей от времени.

После того как была достигнута высокая чувствительность билюминесцентного имиджинга клеток, расположенных глубоко в тканях животных, а также продемонстрирована возможность продолжительного наблюдения за ростом раковых опухолей, было решено приступить к решению следующей задачи, заключающейся в визуализации раковых клеток, метастазировавших в легкие мышей за время роста опухолей. По данным билюминесцентного имиджинга грудной клетки живых мышей (рис. 10, А), используя калибровочный график зависимости интенсивности билюминесценции от количества клеток в легких мышей, построенный ранее (рис. 8, В), было оценено количество метастазировавших клеток. Для мышей с одним видом опухоли интенсивность билюминесценции легких соответствовала $3.7 \cdot 10^6 \pm 9.5 \cdot 10^5$ клеток, экспрессировавших iRFP670—RLuc8, и $5.4 \cdot 10^5 \pm 3.3 \cdot 10^5$ клеток, экспрессировавших iRFP720—RLuc8. Для мышей с двумя видами опухолей одновременно интенсивности билюминесценции в разных каналах соответствовали $2.2 \cdot 10^6 \pm 3.9 \cdot 10^5$ и $2.7 \cdot 10^6 \pm 1.3 \cdot 10^5$ клеток, экспрессировавших iRFP670—RLuc8 и iRFP720—RLuc8 соответственно. На следующем этапе у мышей посмертно были изъяты внутренние органы, включая легкие, и проведен их флуорес-

центный *ex vivo* имиджинг (рис. 10, Б). Клеточный состав легких мышей анализировали методом проточной цитофлуориметрии после механического измельчения тканей (рис. 10, В).

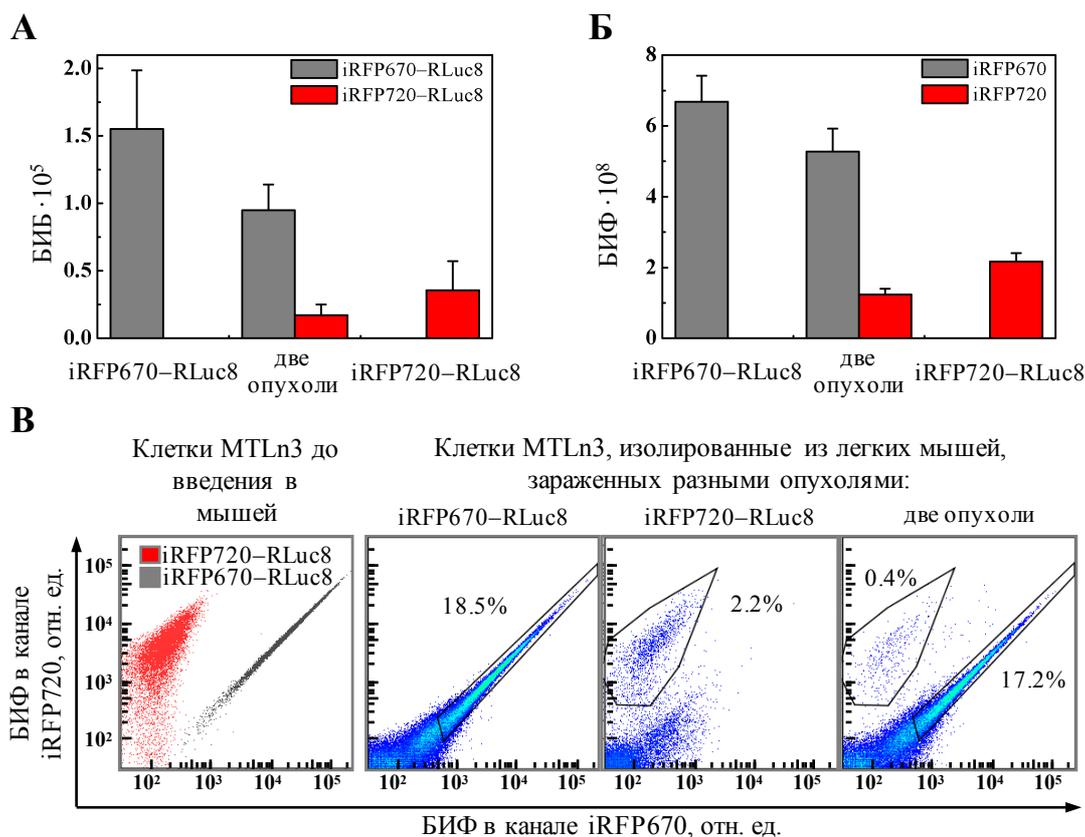


Рис. 10 Анализ метастазов раковых клеток, экспрессирующих iRFP670—RLuc8 или iRFP720—RLuc8, в легких мышей. А – сравнение интенсивностей ближнеинфракрасной биолуминесценции (БИБ, фотон·с⁻¹·см⁻²·ср⁻¹) легких мышей с разными видами опухолевых клеток *in vivo*. Б – сравнение интенсивности ближнеинфракрасной флуоресценции (БИФ, (фотон·с⁻¹·см⁻²·ср⁻¹)/(мкВт·см⁻²)) легких мышей с разными видами опухолевых клеток *ex vivo*. В – сравнительный анализ методом проточной цитофлуориметрии клеток линии MTLn3, использовавшихся для инъекций в молочные железы мышей, и клеток, экстрагированных из легких мышей с разными видами опухолевых клеток. Для каждого канала указан процент попавших в него клеток от общего количества клеток, проанализированных в данном образце.

Данные о распределении клеток в легких мышей, полученные разными методами, хорошо согласуются между собой, что демонстрирует надежность использования ближнеинфракрасных химерных люцифераз при выявлении и анализе метастазировавших клеток как *in vivo*, так и *ex vivo* (рис. 10). Более того, сравнение яркости метастазировавших клеток с яркостью клеток, которые использовались для инъекции, показывает, что химерные люциферазы нетоксичны, поскольку сохраняют средний уровень интенсивности флуоресценции в популяции клеток неизменным (рис. 10, В).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований были разработаны новые молекулярно-биологические подходы для создания однодоменных ближнеинфракрасных флуоресцентных биомаркеров и ближнеинфракрасных химерных люцифераз на основе VprP. Введение цистеино-

вого остатка в GAF домен *RpVphP1*, позволившее объединить стерическое и ковалентное связывание хромофора в этом домене, открыло путь к созданию ближнеинфракрасных биомаркеров небольшого размера. Последующий направленный мутагенез GAF домена с аминокислотной заменой Pe110Cys привел к созданию самого маленького на данный момент ближнеинфракрасного флуоресцентного биомаркера на основе VphP – 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 создать более совершенные ближнеинфракрасные химерные люциферазы на основе iRFP670 и iRFP720.

Полученные 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 *Rhodospseudomonas palustris* (*RpVphP1*).
2. Ближнеинфракрасный однодоменный флуоресцентный биомаркер GAF-FP способен ковалентно связывать биливердин и фикоцианобилин в качестве хромофоров как в аэробных, так и в анаэробных условиях.

3. 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 мониторинга роста и метастазирования опухолей из клеток линии MTLn3 *in vivo* и их последующий анализ *ex vivo*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Rumyantsev, K.A. Minimal domain of bacterial phytochrome required for chromophore binding and fluorescence / **К.А.Румянцев**, D.M.Shcherbakova, N.I.Zakharova, A.V.Emelyanov, K.K.Turoverov, V.V.Verkhusha // Scientific Reports. - 2015. - N 5:18348. - P.1-10.
2. 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.
3. 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. - С.4-14.
4. Rumyantsev, K.A. Near-infrared bioluminescent proteins for two-color multimodal studies / **К.А.Румянцев**, К.К.Туроверов, V.V.Verkhusha // Scientific Reports. - 2016. - N 6:36588. - P.1-10.

Тезисы:

1. Rumyantsev, K.A. Engineering of a single domain of bacterial phytochrome into a small near-infrared fluorescent protein / **К.А.Румянцев**, D.M.Shcherbakova, K.K.Turoverov,

- V.V.Verkhusha // Biophysical Society 59th Annual Meeting, Baltimore, Maryland. - 2015. - Addendum and Late Abstracts Listing. - P.19.
2. 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, В.В.Верхуша, К.К.Туроверов // Всероссийская 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 бактериального 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.
 5. 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.
 6. 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.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Badr, C.E. Bioluminescence imaging: basics and practical limitations / C.E.Badr // *Methods Mol Biol.* - 2014. - N 1098. - P.1-18.

5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K.Laemmli // *Nature.* - 1970. - V 227. N 5259. - P.680-685.
12. 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. - V 282. N 16. - P.12298-12309.
13. Bellini, D. Structure of a bacteriophytochrome and light-stimulated protomer swapping with a gene repressor / D.Bellini, M.Z.Papiz // *Structure.* - 2012. - V 20. N 8. - P.1436-1446.
14. 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. - V 380. N 5. - P.844-855.
15. Ishizuka, T. Cyanobacteriochrome TePixJ of *Thermosynechococcus elongatus* harbors phycoviolobin as a chromophore / T.Ishizuka, R.Narikawa, T.Kohchi, M.Katayama, M.Ikeuchi // *Plant Cell Physiol.* - 2007. - V 48. N 9. - P.1385-1390.

