

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и  
Ю.А. Овчинникова Российской Академии Наук

На правах рукописи

Горбачев Дмитрий Андреевич

## **Новые генетически кодируемые фотосенсибилизаторы**

Специальность 1.5.3 – Молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, профессор,

член-корреспондент РАН

Лукьянов Константин Анатольевич

Москва

2022

# Оглавление

<b>Введение</b>	<b>4</b>
1.1 Цели и задачи	5
1.2 Научная новизна и практическая значимость работы	6
1.3 Публикации по теме диссертации	7
<b>2. Обзор литературы</b>	<b>8</b>
2.1 Флуоресцентные белки	8
2.1.1 Пространственная структура флуоресцентных белков	9
2.1.2 Формирование хромофора во флуоресцентных белках	10
2.1.3 Механизм образования хромофора красных белков семейства DsRed	12
2.2 Фотосенсибилизаторы	14
2.2.1 Механизм образования активных форм кислорода	14
2.2.2 Применение химически синтезированных фотосенсибилизаторов	17
2.3 Генетически кодируемые фотосенсибилизаторы	19
2.3.1 Типы генетически кодируемых фотосенсибилизаторов	20
2.3.2 Генетически кодируемые фотосенсибилизаторы с экзогенным хромофором	20
2.3.3 Генетически кодируемые фотосенсибилизаторы на основе GFP-подобных белков	23
2.4 KillerRed	24
2.4.2 Структура водного канала KillerRed	25
2.4.3 Хромофор KillerRed	27
2.4.4 Аминокислотное окружение хромофора KillerRed	29
2.4.5 Предполагаемый механизм фототоксичности KillerRed	34
2.4.6 Димерная структура белка KillerRed	35
2.4.7 SuperNova – мономерный вариант KillerRed	36
2.4.8 Использование KillerRed и SuperNova	37

<b>3. Материалы и методы</b>	<b>38</b>
3.1 Амплификация ДНК	38
3.2 Клонирование ДНК методом Golden Gate	39
3.3 Создание векторов для экспрессии в клетках бактерий и млекопитающих	40
3.4 Случайный мутагенез кодирующей последовательности белка KillerRed	41
3.5 Химическая трансформация клеток E.coli	42
3.6 Электрическая трансформация клеток E.coli	42
3.7 Выделение плазмидной ДНК	43
3.8 Тест на фототоксичность в клетках E.coli методом подсчета колониеобразующих единиц	43
3.9 Трансфекция клеток млекопитающих	45
3.10 Трансдукция клеток млекопитающих	46
3.11 Проточная цитофлуориметрия	46
3.12 Тест на фототоксичность в клетках млекопитающих	47
3.13 Измерение скорости созревания хромофора in vivo	49
3.14 Измерение скорости созревания хромофора in vitro	50
3.15 Измерение фотостабильности флуоресцентных белков	51
3.16 Выделение и очистка флуоресцентных белков	52
3.17 Измерение спектров поглощения и флуоресценции	52
<b>4. Результаты и обсуждение</b>	<b>53</b>
4.1 Создание варианта белка KillerRed, который не формирует DsRed-подобный хромофор	54
4.2 Разработка KillerOrange – оранжевого варианта белка KillerRed	56
4.3 Увеличение фототоксичности белков SuperNova и KillerRed	65
4.3.1 Мутация S10R в белках SuperNova и KillerRed приводит к увеличению эффективности созревания красного хромофора	66
4.3.2 Спектральные характеристики SuperNova2 и KillerRed2	68
4.3.3 Созревание белков SuperNova2 и KillerRed2 in vitro	69

4.3.4 Измерение фототоксичности белков SuperNova2 и KillerRed2 в бактериях	71
4.3.5 Измерение фототоксичности белков SuperNova2 и KillerRed2 в клетках млекопитающих	73
4.3.6 Измерение скорости созревания белков SuperNova2 и KillerRed2 in vivo	76
4.3.7 Измерение фотостабильности белков SuperNova2 и KillerRed2	77
<b>5. Выводы</b>	<b>80</b>
<b>6. Список литературы</b>	<b>81</b>

# 1. Введение

Фотосенсибилизаторы – красители, способные вырабатывать активные формы кислорода при облучении светом. Фотохимические реакции, вызываемые фотосенсибилизаторами, приводят к образованию активных форм кислорода и окислению органических молекул, что наносит клеткам значительный ущерб и, в конечном итоге, может приводить к их гибели. Это послужило причиной широкого применения фотосенсибилизаторов как в фундаментальных исследованиях, так и в биомедицине. Например, фотодинамическая терапия, основанная на селективном накоплении фотосенсибилизатора в клетках опухоли и ее последующем облучении, эффективно используется при лечении некоторых онкологических и кожных заболеваний [1].

Фотосенсибилизаторы можно разделить на два типа веществ: органические молекулы (производные порфиринов и родственных ароматических соединений) и белки, которые представлены фототоксичными флуоресцентными белками и белками с экзогенным фототоксичным хромофором.

Большинство флуоресцентных белков не обладают фототоксическим эффектом, так как их хромофор экранирован от окружающего растворителя вторичной структурой белка –  $\beta$ -бочонком. Считается, что изолированность хромофора объясняет пониженный уровень фототоксичности типичного флуоресцентного белка для клеток и тканей при флуоресцентной микроскопии, по сравнению с небольшими органическими красителями [2,3]. Однако существует флуоресцентный белок KillerRed, в котором  $\beta$ -бочонок экранирует хромофор не полностью и способствует образованию водного канала, который открывает молекулам воды и кислорода доступ к хромофору [4,5]. При освещении зеленым или оранжевым светом KillerRed вырабатывает активные формы кислорода, демонстрируя гораздо более высокий уровень фототоксичности, по сравнению с другими флуоресцентными белками [6]. Эта особенность является отличительным свойством KillerRed и позволяет использовать его для прицельной фотоинактивации клеточных белков, а также для избирательного уничтожения клеточных популяций [7,8].

По сравнению с существующими химическими аналогами, KillerRed и другие генетически кодируемые фотосенсибилизаторы образуют гораздо меньше активных форм кислорода и, следовательно, имеют более низкий уровень фототоксичности [9]. Кроме того, по сравнению с большим спектральным разнообразием фототоксичных красителей, количество существующих на данный момент фототоксичных флуоресцентных белков невелико: зеленые miniSOG [10] и его улучшенный вариант SOPP3P [11], красный флуоресцентный белок KillerRed и его мономерный вариант SuperNova [12], а также инфракрасный FAP [13]. В связи с этим получение фототоксичных белков других цветов и с улучшенной фототоксичностью является актуальной задачей.

На основе опубликованной структуры KillerRed [4,5] в нашей лаборатории было предпринято несколько попыток создания более фототоксичных вариантов KillerRed методом направленного мутагенеза, однако ни одна из них не оказалась успешной. Основным препятствием для разработки новых генетически кодируемых фотосенсибилизаторов является отсутствие оптимального метода скрининга, поскольку клетки, экспрессирующие генетически кодируемый фотосенсибилизатор и его фототоксичные варианты, после облучения светом погибают и не могут быть отобраны стандартными методами.

В рамках данной работы мы увеличили фототоксичность белков KillerRed и SuperNova и создали на их основе новые генетически кодируемые фотосенсибилизаторы, активные в синей части спектра.

## 1.1 Цели и задачи

Целью данного проекта являлось создание генетически кодируемого фотосенсибилизатора, активируемого синим светом, и создание нового варианта белка SuperNova с увеличенной фототоксичностью.

Для выполнения этих целей были поставлены следующие задачи:

1. На основе белка KillerRed методами направленного и случайного мутагенеза создать новый фототоксичный белок с измененными спектрами поглощения и флуоресценции.

2. Методом случайного мутагенеза увеличить фототоксичность белка SuperNova.
3. Разработать количественный тест на фототоксичность для культур клеток млекопитающих и бактерий.
4. Сравнить фототоксичность новых генетически кодируемых фотосенсибилизаторов и белков KillerRed и SuperNova.

## 1.2 Научная новизна и практическая значимость работы

В первой части работы описывается создание новых генетически кодируемых фотосенсибилизаторов KillerOrange и mKillerOrange [14,15], оранжевых вариантов белка KillerRed, активируемых синим светом. Было показано, что KillerOrange не уступает в фототоксичности белку KillerRed и может быть использован вместе с ним для независимого воздействия на разные популяции клеток. Использование KillerOrange в перспективе позволит расширить возможности оптического контроля за функционированием белков и развитием организмов, а также увеличить общий уровень токсичности фотосенсибилизаторов при фотодинамической терапии. Кроме того, возбуждаемые синим светом флуоресцентные белки подходят для двухфотонного возбуждения инфракрасным светом, что позволит глубже проникать в ткани исследуемого организма.

Вторая часть работы посвящена увеличению фототоксичности белков SuperNova и KillerRed и созданию их более фототоксичных вариантов SuperNova2 и KillerRed2. Мы показали, что внесение одной замены S10R приводит к увеличению скорости и полноты созревания красного хромофора, а также к увеличению фототоксичности. Мы охарактеризовали полученные белки и проверили их фототоксичность в бактериях и культуре клеток млекопитающих.

Полученные нами новые варианты фототоксичных белков позволят увеличить эффективность их использования, расширить возможности их применения и снизить дозы облучения при сохранении фототоксичного

эффекта, уменьшив неспецифическое воздействие света на клетки и ткани при облучении.

### 1.3 Публикации по теме диссертации

#### Статьи

1. Sarkisyan KS, Zlobovskaya OA, **Gorbachev DA**, Bozhanova NG, Sharonov GV, Staroverov DB, Egorov ES, Ryabova AV, Solntsev KM, Mishin AS, Lukyanov KA. KillerOrange, a genetically encoded photosensitizer activated by blue and green light. *PLoS One* (2015), 10 (12) e0145287. DOI:10.1371/journal.pone.0145287, IF=3.24.
2. Pletneva NV, Pletnev VZ, Sarkisyan KS, **Gorbachev DA**, Egorov ES, Mishin AS, Lukyanov KA, Dauter Z, Pletnev S. Crystal structure of phototoxic orange fluorescent proteins with a tryptophan-based chromophore. *PLoS One* (2015), 10 (12) e0145740. DOI:10.1371/journal.pone.0145740, IF=3.24.
3. **Горбачев Д.А.**, Саркисян К.С.. Мутант фототоксичного белка KillerRed, не формирующий DsRed-подобного хромофора. *Вестник РГМУ* (2019), 9 (6) 45–48. DOI:10.24075/brsmu.2019.084, IF=0.14.
4. **Gorbachev DA**, Staroverov DB, Lukyanov KA, Sarkisyan KS. Genetically encoded red photosensitizers with enhanced phototoxicity. *Int J Mol Sci* (2020), 21 (22) 1–12. DOI:10.3390/ijms21228800, IF=5.924.
5. Yuzhakova DV, Shirmanova MV, Klimenko VV, Lukina MM, Gavrina AI, Komarova AD, **Gorbachev DA**, Sapogova NV, Lukyanov KA, Kamensky VA. PDT with genetically encoded photosensitizer miniSOG on a tumor spheroid model: A comparative study of continuous-wave and pulsed irradiation. *Biochim Biophys Acta* (2021), 1865 (12) 129978. DOI:10.1016/j.bbagen.2021.129978, IF=3.77.

#### Доклады на конференциях

1. **Gorbachev DA**, Sarkisyan KS, Mishin AS, Lukyanov KA, "New genetically encoded photosensitizers" FEBS Congress, Краков, Польша, 2019
2. **Gorbachev DA**, Sarkisyan KS, Mishin AS, Lukyanov KA, "Development of phototoxic fluorescent proteins by high-throughput sequencing-guided directed evolution," Janelia Junior Scientist Workshop on Protein Engineering: Making and Using Tools for Neuroscience and Other Biological Problems, Ashburn, США, 2018



## 2. Обзор литературы

### 2.1 Флуоресцентные белки

Зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein, GFP) медузы *Aequorea victoria* и его гомологи из различных морских организмов представляют собой семейство белков, обладающих уникальной способностью к формированию хромофора на основе собственных аминокислотных остатков.

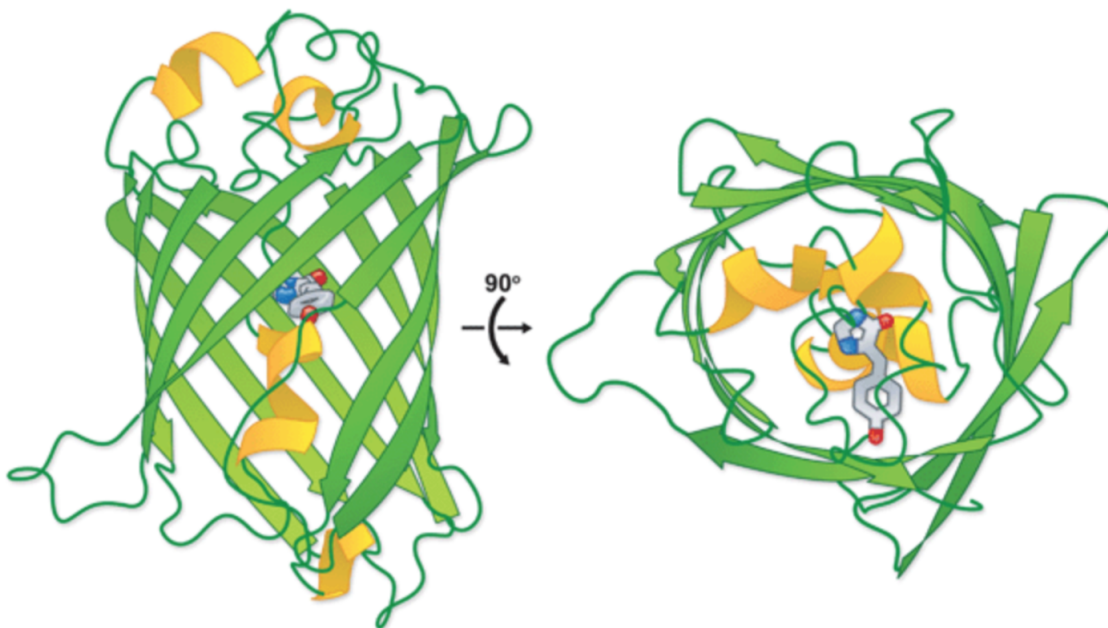
Спектр применения флуоресцентных белков довольно разнообразен и включает в себя детекцию экспрессии генов, метки для органелл и внутриклеточных белков, которые используются для мониторинга их подвижности и динамики внутри клетки. Флуоресцентные белки также привели к созданию биосенсоров для наблюдения за многочисленными внутриклеточными процессами, такие как колебания pH [16] и концентрации ионов [17], активность протеинкиназ [18], апоптоз [19] и передача сигналов от рецепторов [20]. Специфические промоторы и сигналы локализации флуоресцентных сенсоров позволяют направлять их в определенный тип тканей, клеток или субклеточных компартментов для наблюдения за определенным физиологическим процессом во времени.

Путем внесения точечных мутаций в исходную нуклеотидную последовательность GFP был разработан ряд улучшенных вариантов флуоресцентных белков, охватывающих голубую, синюю, зеленую и желтую области видимого спектра. Одним из наиболее значительных достижений после первых работ по клонированию и раннему мутагенезу зеленого флуоресцентного белка стало обнаружение красных флуоресцентных белков в небиолюминесцентных рифовых кораллах и морских анемонах. Это открытие расширило палитру флуоресцентных меток и продемонстрировало, что семейство GFP-подобных белков встречается у широкого круга организмов [21].

#### 2.1.1 Пространственная структура флуоресцентных белков

Все известные на сегодняшний день флуоресцентные белки с установленной кристаллической структурой имеют пространственную структуру  $\beta$ -бочонка. Одиннадцать  $\beta$ -слоев образуют цилиндр с диаметром

около 25 Å и длиной около 40 Å, внутри которого проходит деформированная  $\alpha$ -спираль, несущая хромофор. Небольшие  $\alpha$ -спиральные участки находятся также на торцах цилиндра (**Рисунок 1**) [22].



**Рисунок 1.** Пространственная структура флуоресцентных белков [23]

Автокаталитическое формирование хромофора является уникальным свойством GFP-подобных флуоресцентных белков. Обычно биосинтез пигментов включает длинную цепочку последовательных реакций, катализируемую многочисленными ферментами и требующую присутствия низкомолекулярных кофакторов. В случае флуоресцентных белков, напротив,  $\beta$ -бочонок сам играет роль своеобразного фермента, который модифицирует собственные аминокислотные остатки, формируя хромофор без участия внешних кофакторов и субстратов – не считая молекулярного кислорода.

По сравнению с низкомолекулярными флуоресцентными метками, преимущество GFP-подобных белков как флуоресцентных маркеров обусловлено их независимым созреванием, низкой фототоксичностью и возможностью создания генетически кодируемых конструкций. Благодаря этим свойствам флуоресцентные белки могут использоваться практически в любой системе [2].

## 2.1.2 Формирование хромофора во флуоресцентных белках

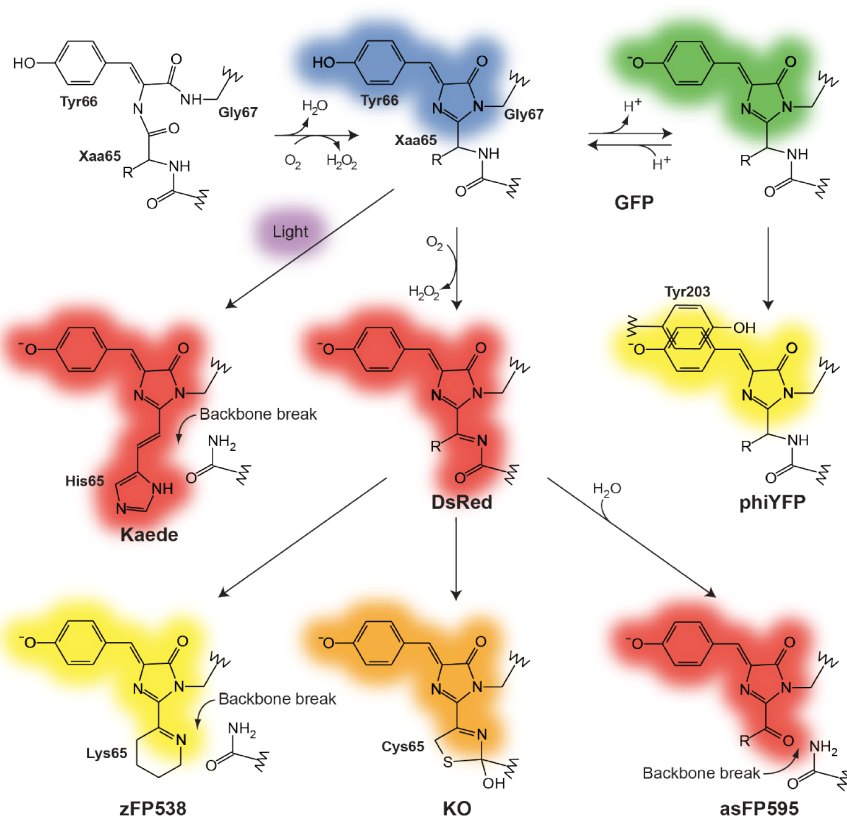
Исследования последних лет показали, что спектральное разнообразие белков семейства GFP во многом обеспечивается разнообразием химических структур их хромофоров. Именно поэтому хромофор можно считать одной из самых интересных частей белка. Несмотря на то, что ковалентная структура большинства известных хромофоров считается установленной, детали стереохимии, кислотно-основных взаимодействий, а также реакционной способности возбужденного состояния, остаются недостаточно изученными. Перечисленные особенности хромофоров важны для понимания процессов, происходящих в нативных белках, таких как фотоактивация, фотопереключение, фотообесцвечивание, фототоксичность и созревание сложных хромофоров [24].

Формирование GFP-подобного хромофора происходит в результате циклизации полипептидной цепи по остаткам 65-67 (нумерация в соответствии с *A. victoria* GFP), за которой следует окисление C $\alpha$ -C $\beta$  связи 66-го аминокислотного остатка молекулярным кислородом. Результатом такой реакции является образование двуциклической сопряженной ароматической системы – протяженной, поляризованной и достаточно плоской для того, чтобы поглощать и испускать свет в видимой области спектра (**Рисунок 2**).

Сформированный хромофор расположен в центре белка и надежно защищен  $\beta$ -слоями от взаимодействий с растворителем. Кроме того, такая структура дополнительно стабилизирована многочисленными нековалентными взаимодействиями, что в большинстве случаев обеспечивает ее крайне высокую устойчивость к химической и тепловой денатурации, а также к протеолизу [25].

Известно, что аминокислотные остатки  $\beta$ -слоев, входящие в состав микроокружения хромофора, влияют на его созревание [26] и могут изменять спектры поглощения и эмиссии, приводя к изменению цвета флуоресценции от голубого до желтого [27]. Однако для достижения флуоресценции в красной области спектра GFP-подобный хромофор должен быть подвергнут дальнейшей ковалентной модификации. Такие изменения приводят к увеличению числа атомов, вовлеченных в сопряженную ароматическую систему, что

обуславливает дополнительный спектральный сдвиг у таких основных типов “красных” хромофоров как Kaede-подобные и DsRed-подобные хромофоры [28]. По сравнению с GFP-подобным хромофором, созревание DsRed-подобного хромофора отличается дополнительным окислением N-С $\alpha$ -связи в 65-ом аминокислотном остатке, опосредованным воздействием кислорода [29]. При образовании Kaede-подобного хромофора происходит разрыв полипептидной цепи по той же N-С $\alpha$ -связи 65-ой аминокислоты, но в данном случае увеличение ароматической системы происходит за счет включения боковой группы атомов гистидина, обязательно содержащегося в 65 положении у белков с таким хромофором (**Рисунок 2**) [30].



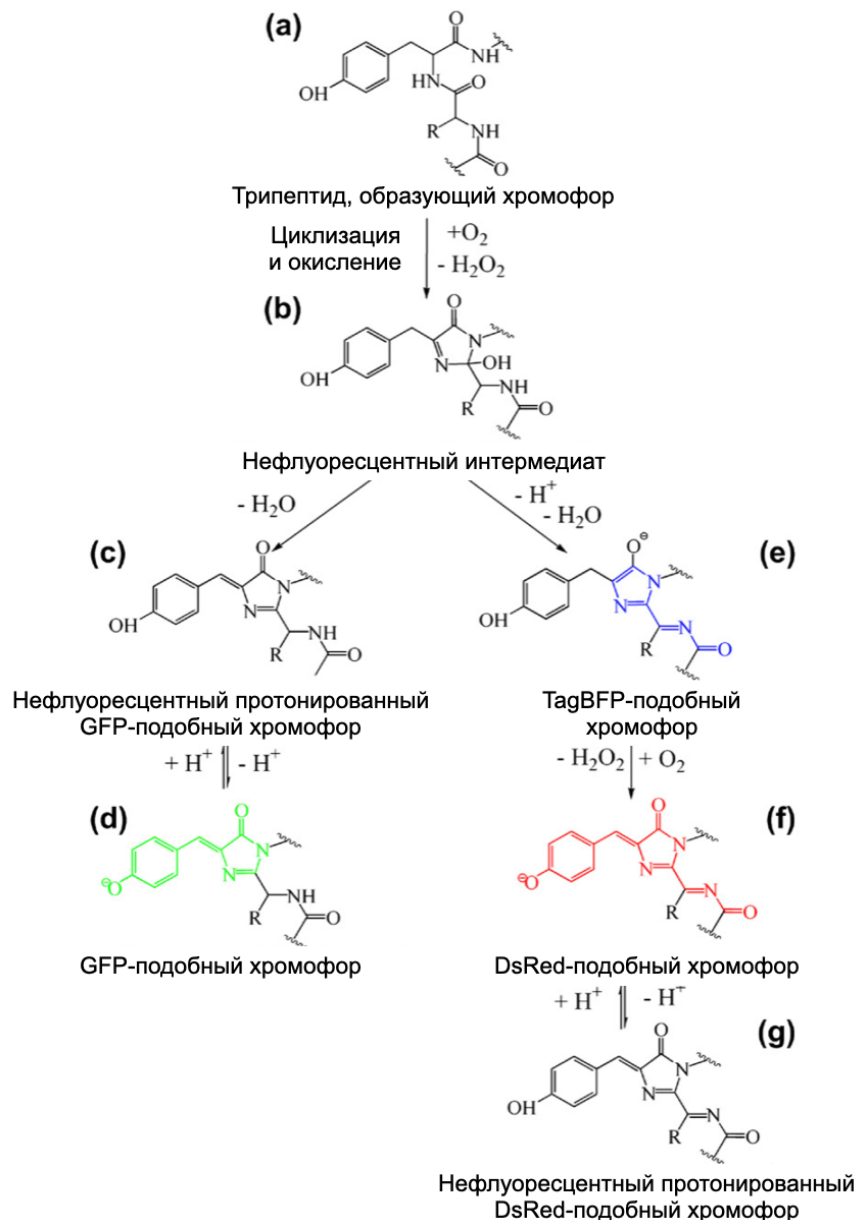
**Рисунок 2.** Образование хромофоров различных спектральных типов. Показан процесс циклизации полипептидной цепи при формировании хромофора GFP и основные реакции, ведущие к образованию различных спектральных классов хромофоров. Под химическими структурами хромофоров подписаны названия соответствующих им белков [2].

### 2.1.3 Механизм образования хромофора красных белков семейства DsRed

Открытие гомологов зеленого флуоресцентного белка из коралловых полипов класса *Anthozoa*, которые имеют не только зеленую, но и желтую, оранжевую и красную флуоресценцию, расширило палитру белков для флуоресцентного мечения *in vivo* [21,31,32]. Среди флуоресцентных зондов особый интерес представляют красные белки из-за сниженной автофлуоресценции, низкого светорассеяния и минимального поглощения при визуализации структур в глубоких тканях организма [33].

Успехи в структурных и биохимических исследованиях красных флуоресцентных белков обеспечивают лучшее понимание молекулярных механизмов автокаталитического формирования красного хромофора и его дальнейших модификаций [34], предоставляя исследователям уникальную возможность манипулировать спектральными свойствами флуоресцентных белков.

У многих известных в настоящее время красных флуоресцентных белков есть DsRed-подобный хромофор [29] (**Рисунок 2**), который имеет ту же структуру, что и GFP-подобный хромофор, но с дополнительной N-ацилиминовой группой ( $C=N-C=O$ ). Таким образом, автокаталитический механизм образования красных хромофоров сложнее, чем у GFP-подобного хромофора, поскольку в структуре красного хромофора присутствует от одной до трех дополнительных двойных связей, по сравнению с GFP-подобным зеленым хромофором [35]. Основным механизмом образования DsRed-подобного хромофора принято считать механизм его образования через голубой интермедиат (**Рисунок 3**).



**Рисунок 3.** Общий механизм автокаталитического образования синих, зеленых и красных хромофоров. Адаптировано из [36].

На первой стадии в результате циклизации трипептида (**Рисунок 3, a → b**) образуется нефлуоресцентная форма хромофора. Этот интермедиат может окисляться по связи Cα–Cβ у остатка тирозина с образованием анионного GFP-подобного хромофора (**Рисунок 3, b → c**), либо по Cα–N первого аминокислотного остатка трипептида с образованием TagBFP-подобного хромофора (**Рисунок 3, b → e**) [34], который встречается, например, у таких белков как TagBFP и PAmCherry [37,38]. Образование анионного DsRed-подобного хромофора (**Рисунок 3, e → d**) требует окисления TagBFP-подобного хромофора по связи Cα–Cβ у остатка тирозина. В красных

флуоресцентных белках, таких как TagRFP, mCherry и KillerRed [39], данный тип окисления протекает автокаталитически при участии Glu222/Lys69, в то время как для фотоактивируемых белков PAmCherry и PAtagRFP требуется облучение фиолетовым светом с участием пары Glu222/Arg203 [40].

## 2.2 Фотосенсибилизаторы

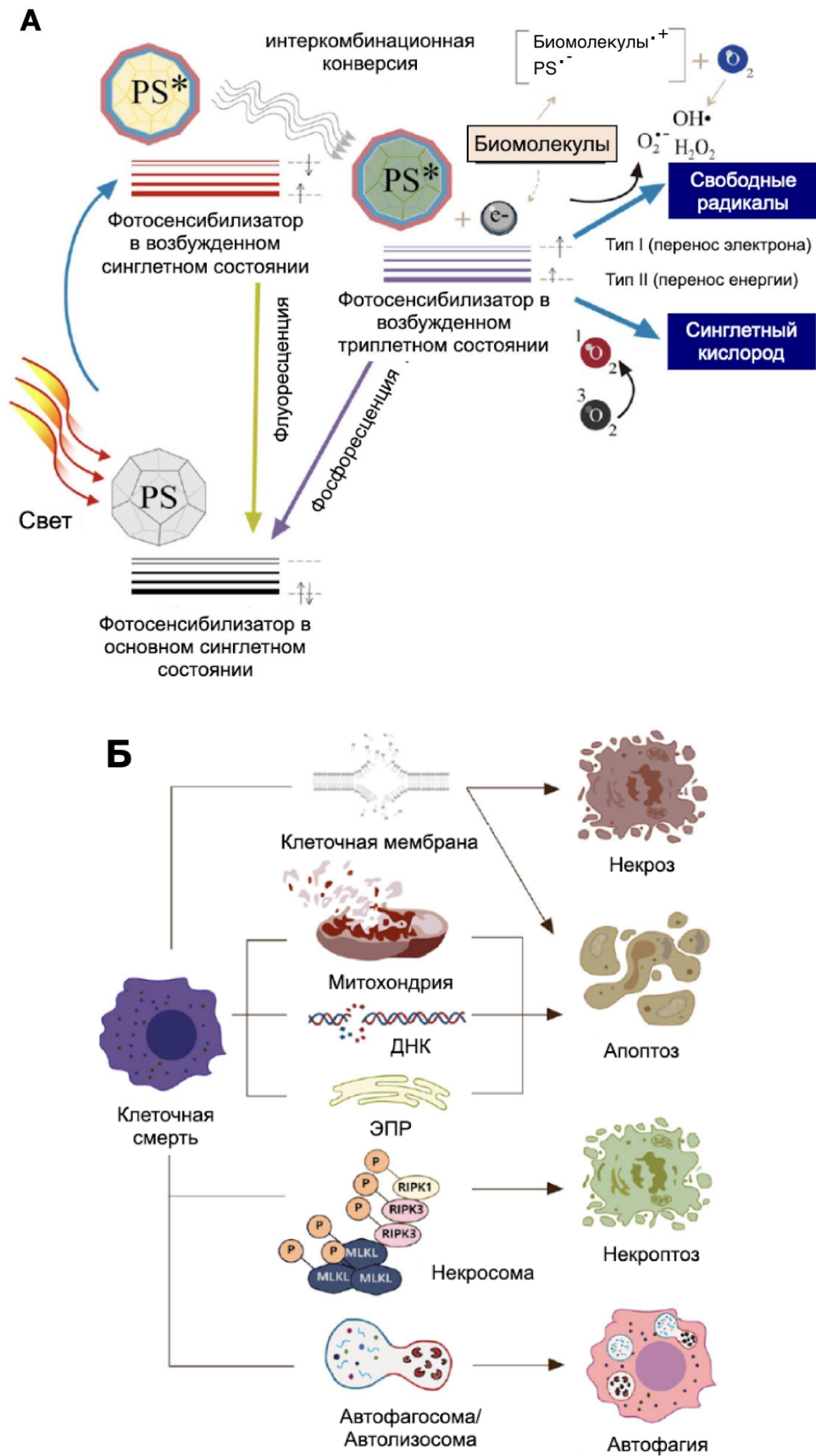
Фотосенсибилизаторы – это красители, способные вырабатывать активные формы кислорода при облучении светом. Фотодинамическое воздействие приводит к окислению органических молекул, что может вызвать необратимые последствия внутри клетки, а также ее гибель. Так, фотодинамические реакции иногда вызывают заболевания у людей и животных [41] и приводят к нарушениям фотосинтеза у растений [42].

Фотосенсибилизаторы также используются в биологических, химических и медицинских исследованиях. В частности, фотодинамическая терапия основана на избирательном накоплении фотосенсибилизатора в опухолях с последующим локальным облучением светом, приводящим к целенаправленной гибели раковых клеток [43–45].

Существует два типа реакций с участием фотосенсибилизаторов, в которых в качестве основного процесса выступает передача электрона или энергии [46].

### 2.2.1 Механизм образования активных форм кислорода

Молекула фотосенсибилизатора является синглетной в своем основном состоянии, поскольку имеет два электрона с противоположными спинами. При поглощении света фотон с соответствующей энергией приводит к возбуждению и переходу одного электрона на орбиту с более высокой энергией (**Рисунок 4, А**).



**Рисунок 4.** (А) Схематическое изображение фотодинамических реакций (Типа I и Типа II) (Б) Пути гибели клеток при фотодинамической терапии. PS – фотосенсибилизатор. Адаптировано из [47].



Фотосенсибилизатор очень нестабилен в возбужденном синглетном состоянии и может утрачивать избыточную энергию в виде излучения флуоресценции или внутритепловой конверсии. Однако, для перехода в более устойчивое возбужденное триплетное состояние (состояние с параллельными спинами электронов) возбужденный синглетный фотосенсибилизатор может подвергаться процессу, известному как «интеркомбинационная конверсия». Находясь в триплетном состоянии, молекула фотосенсибилизатора также может переходить в основное состояние, теряя энергию за счет фосфоресценции. Но по правилам квантового отбора это «запрещенный процесс», поэтому триплетное состояние существует около нескольких микросекунд и гораздо более стабильно, чем возбужденное синглетное состояние, существующее в интервале от пико- до наносекунд.

Это продолжительное время жизни триплетного состояния фотосенсибилизатора дает достаточно времени для передачи энергии возбужденного состояния путем столкновения с молекулярным кислородом  $O_2$ , который уникален тем, что является молекулярным триплетом в своем основном состоянии. Данная реакция переноса энергии, получившая название фотохимического процесса типа II, приводит к образованию синглетного кислорода  $^1O_2$  и переходу фотосенсибилизатора в основное состояние [48].

Также может происходить другой фотохимический процесс типа I, в результате которого фотосенсибилизатор в возбужденном состоянии подвергается реакциям переноса электронов, которые в конечном итоге образуют активные формы кислорода. Этот механизм может включать в себя приобретение или отдачу электрона с образованием катион-радикала или анион-радикала. Анион-радикал может реагировать с кислородом с образованием супероксид анион-радикала  $O_2^{\cdot-}$ . Дисмутация, или одноэлектронное восстановление  $O_2^{\cdot-}$ , приводит к образованию перекиси водорода  $H_2O_2$ , которая, в свою очередь, может подвергаться другому одноэлектронному восстановлению с образованием мощных окислительных гидроксильных радикалов  $HO^{\cdot}$  [49].

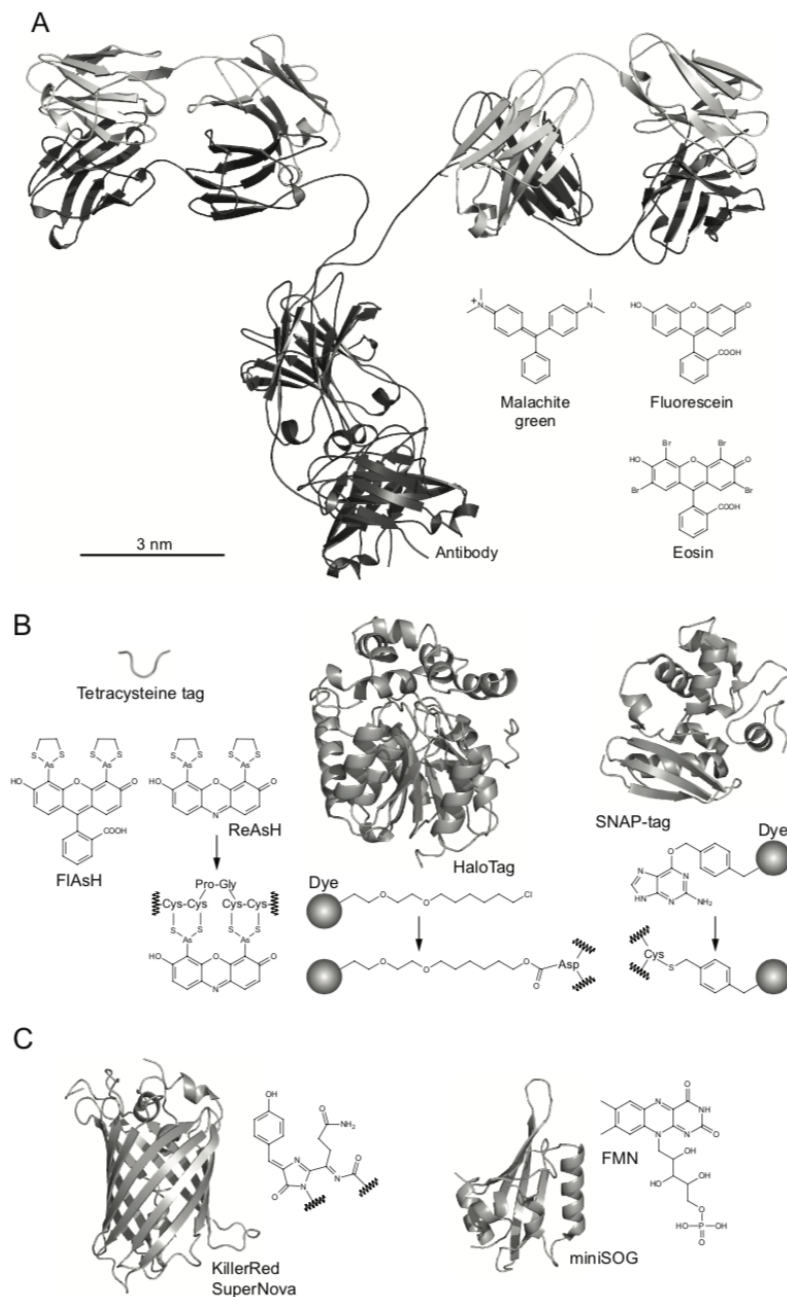
## 2.2.2 Применение химически синтезированных фотосенсибилизаторов

Обычно, фотосенсибилизаторы реализуют один из вышеописанных механизмов образования активных форм кислорода. Тем не менее, в биологических системах происходят реакции обоих типов, а их относительный вклад в производство активных форм кислорода зависит от таких факторов, как концентрация кислорода, химическая природа субстрата (белки, ненасыщенные жирные кислоты, ДНК) и фотосенсибилизатора [50].

Фотодинамические реакции приводят к образованию радикалов и последующему окислению органических молекул, что вызывает нарушение внутриклеточных процессов и гибели клетки (**Рисунок 4, Б**). Поэтому, фотосенсибилизаторы находят применение как в биолого-химических исследованиях, так и в медицине. Например, фотодинамическая терапия, основанная на селективном накоплении гематопорфирина фотофрина в клетках опухоли и ее последующем облучении, эффективно используется при лечении некоторых онкологических и кожных заболеваний [1]. Тип гибели клеток, вызванный фотодинамической терапией, зависит от вида или концентрации фотосенсибилизатора, его внутриклеточной локализации, дозы света и парциального давления кислорода. В ходе фотодинамической терапии некроз является основным механизмом гибели клеток, при которой химический фотосенсибилизатор накапливается в плазматической мембране [51]. Апоптоз может быть вызван сильным окислительным стрессом, когда фотосенсибилизатор локализован не только в плазматической мембране [46], но и в ядре [52], митохондриях [53], эндоплазматическом ретикулуме [54] и лизосомах [55] (**Рисунок 4**).

Другой важной областью применения фотосенсибилизаторов является функциональная протеомика, где их используют для прицельной фотоинактивации клеточных белков в технологии CALI (Chromophore-Assisted Light Inactivation) [56]. Как правило, молекулы фотосенсибилизатора химически присоединяют к специфическим антителам на исследуемый белок (**Рисунок 5, А**), либо модифицируют сам белок специальной меткой в виде тетрацистеинового мотива (**Рисунок 5, В**), к которому присоединяется

фотосенсибилизатор. При облучении фотосенсибилизатор производит активные формы кислорода, которые стимулируют инактивацию белка-мишени. Специфичность действия обусловлена ограниченностью распространения активных форм кислорода в клетке, благодаря которой не происходит значительных повреждений нецелевых молекул [57].



**Рисунок 5.** Схема структур белков и химических веществ, используемых в технологии CALI. А – Модифицированные антитела с синтетическими фотосенсибилизаторами; В – “Тетрацистеиновый таг” пептид CCPGCC, ковалентно связывающий синтетические красители (слева); Halo-Tag и SNAP-Tag, ковалентно связывающие свои специфические субстраты (справа); С – Генетически кодируемые фотосенсибилизаторы, красные флуоресцентные белки KillerRed и SuperNova (слева) и miniSOG (справа) [58].

Благодаря особым физико-химическим свойствам, фотосенсибилизаторы некоторых химических классов имеют тенденцию накапливаться в клеточных компартментах, таких как плазматическая мембрана, эндоплазматический ретикулум, лизосомы и митохондрии, что используется в медицинских и научных целях [59,60]. Например, мономеры производных гематопорфирина имеют тенденцию накапливаться в митохондриях, а его олигомеры – в плазматической мембране [61]. Другой фотосенсибилизатор, моноаспартилхлорин еб, после эндоцитоза локализуется в лизосомах [62]. Фотосенсибилизаторы группы фталоцианинов обычно накапливаются в митохондриях [63], а производные бензопорфирина преимущественно локализуются в аппарате Гольджи [64].

Несмотря на большое разнообразие химически синтезированных фотосенсибилизаторов и успешность их применения, было показано, что специфическая локализация химических фотосенсибилизаторов носит относительный характер, и не исключает их распределение в других клеточных компартментах [65]. Так, фотосенсибилизаторы, которые имеют тенденцию накапливаться в плазматической мембране, также проникают и в мембраны органоидов: эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи и лизосом [66]. Из-за низкой селективности использование синтетических фотосенсибилизаторов, которые вводятся в биологическую систему экзогенно, ограничивает возможности их применения в биотехнологии и фундаментальных биологических исследованиях, поэтому для ученых особый интерес представляют генетически кодируемые фотосенсибилизаторы [67].

## 2.3 Генетически кодируемые фотосенсибилизаторы

Потенциально генетически кодируемый фотосенсибилизатор может быть использован для решения широкого круга задач экспериментальной биологии – эмбриологии, молекулярной и клеточной биологии. В отличие от химических фотосенсибилизаторов, генетически кодируемые фотосенсибилизаторы могут быть направлены в определенный тип клеток (с использованием специфичных промоторов) либо в определенный компартмент клетки (с использованием сигналов локализации белков). Также, развитие методов адресной доставки

генов в раковые клетки в перспективе позволит применять фототоксичные белки для фотодинамической терапии опухолей.

### 2.3.1 Типы генетически кодируемых фотосенсибилизаторов

Существующие генетически кодируемые фотосенсибилизаторы можно разделить на два типа. К первому типу относятся генетически модифицированные белки, которые связывают органические молекулы, выступающие в качестве генераторов активных форм кислорода (**Рисунок 5, В, С**). Это фотосенсибилизаторы с экзогенным хромофором, к которым относятся miniSOG [10], SOPP3 [11], FAP [13], HaloTag [68]. Фотосенсибилизирующие молекулы могут быть как эндогенного происхождения, например, флавинмононуклеотид, так и молекулы, которые добавляются извне, такие как эозин или малахитовый зеленый. Из достоинств таких белков можно отметить высокую фототоксичность, большой квантовый выход активных форм кислорода и их относительно малый размер.

Ко второму типу относятся GFP-подобные флуоресцентные белки KillerRed и SuperNova (**Рисунок 5, С**), у которых в качестве фотосенсибилизатора выступает их собственный хромофор. Оба белка обладают более низким квантовым выходом активных форм кислорода, но при этом хромофор является частью белка, что не вызывает неспецифического воздействия. Кроме того, эти белки возбуждаются оранжевым светом, имеющим большую проникающую способность, что является несомненным достоинством сенсibilизаторов данного типа.

### 2.3.2 Генетически кодируемые фотосенсибилизаторы с экзогенным хромофором

Генетически кодируемый фотосенсибилизатор с экзогенным хромофором это белок, который сам по себе не является фотоактивным, но при связывании кофактора – экзогенного хромофора, становится фототоксичным. HaloTag – модифицированный бактериальный белок-галогеналкандегалогеназа [68], который способен ковалентно связывать синтетические лиганды, в том

числе красители, несущие специально разработанный галогеналкановый линкер (**Рисунок 5, В**). Поскольку количество химических лигандов для HaloTag огромно и ограничено лишь возможностью присоединения галогеналканового линкера, HaloTag является эффективной системой мечения белков, предназначенной для решения широкого круга задач, от простой очистки белков и микроскопии до выявления белок-белковых взаимодействий. Также эта система успешно применяется в технологии CALI [69].

В 2011 году Такемото и соавторы показали, что при использовании в технологии CALI [69], HaloTag с эозином образует синглетный кислород в 11 раз эффективнее, по сравнению с флуоресцином, и инактивирует  $\beta$ -галактозидазу в 5 раз эффективнее, чем связанное с ней антитело с тем же красителем.

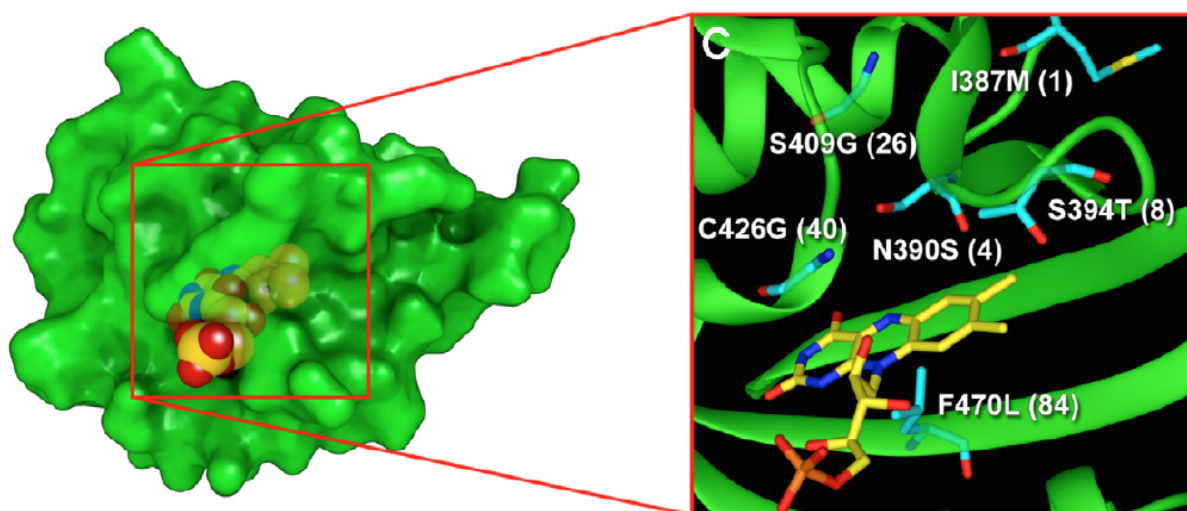
В этом же году была создана аналогичная система SNAP-Tag, работающая по схожему принципу [70]. SNAP-Tag основан на работе 20 кД фермента Об-алкилгуандин-ДНК-алкилтрансферазы. Данный фермент переносит бензильную группу с Об-бензилгуанидина на свой цистеин с образованием тиоэфирной связи. Существует несколько производных бензилгуанидина с флуорофорными группами в пара-положении, которые не мешают переносу бензильной группы.

Из-за большого разнообразия лигандов HaloTag и SNAP-Tag имеют широкое экспериментальное применение, а в случае технологии CALI позволяют использовать разнообразную палитру красителей. Однако, они имеют такой же недостаток, как и синтетические фотосенсибилизаторы – для их функционирования хромофор необходимо вводить экзогенно. Но, по сравнению с синтетическими фотосенсибилизаторами, эти системы мечения имеют гораздо большую специфичность, что позволяет использовать их в биологических исследованиях.

miniSOG – флуоресцентный флавопротеин, полученный генно-инженерными методами из домена рецептора синего света, фототропина. LOV (light, oxygen, and voltage)-домен фототропина связывает флавиномононуклеотид (ФМН), который сам по себе является эффективным фотосенсибилизатором. ФМН выполняет критически важные биологические функции в клетке, такие как транспорт электронов в митохондриях, окисление

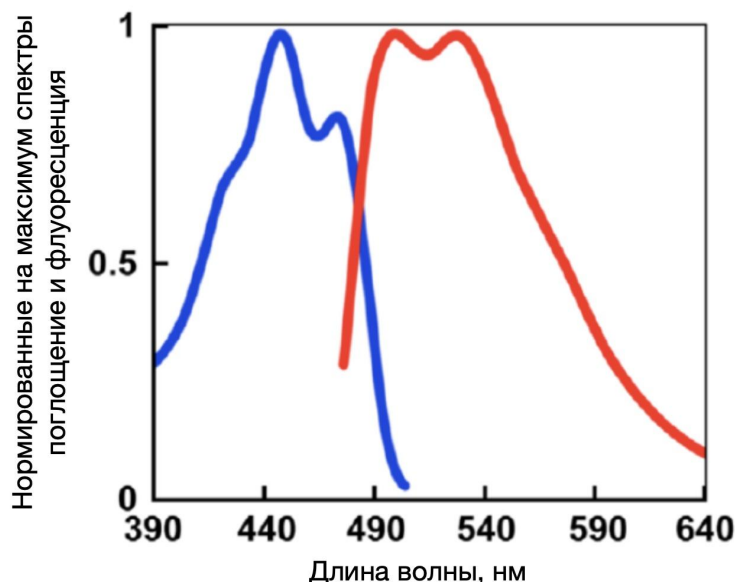
жирных кислот и участие в метаболизме витаминов [71]. Этот кофактор повсеместно присутствует в клеточных компартментах, но отсутствует вне клетки, из-за чего использование miniSOG может быть ограничено.

В фототропине энергия возбужденного состояния ФМН поглощается с образованием ковалентной связи между ФМН и цистеином в LOV-домене. При замене C426G и еще нескольких аминокислотных заменах в сайте связывания ФМН был получен зеленый фототоксичный флуоресцентный белок miniSOG (**Рисунок 6**). В miniSOG ФМН стал более доступен для кислорода, что увеличило вероятность переноса энергии с возбужденного флавинмононуклеотида на молекулярный кислород и, как следствие, вероятность образования синглетного кислорода.



**Рисунок 6.** Структура белка miniSOG и сайта связывания ФМН [10].

miniSOG состоит всего из 106 аминокислотных остатков и при экспрессии не склонен к формированию агрегатов. Максимум его поглощения приходится на 488 нм, с плечом на 473 нм, с коэффициентами экстинкции 16700 и 13600  $M^{-1}cm^{-1}$ , соответственно. Возбуждение miniSOG синим светом приводит к зеленой флуоресценции с двумя максимумами на 500 и 528 нм (**Рисунок 7**). Квантовый выход активных форм кислорода у miniSOG сравнительно высокий и составляет 47%. У свободного ФМН это значение достигает 51%.



**Рисунок 7.** Спектры поглощения и флуоресценции miniSOG [10].

Благодаря высокой фототоксичности miniSOG является перспективным фотосенсибилизатором и потенциально может использоваться для селективной неинвазивной фотодинамической терапии рака [72]. Однако синий свет, требуемый для возбуждения miniSOG, не имеет такого проникающего эффекта, как зеленый или красный, а также возбуждает свободный ФМН, что является токсичным для клетки [73]. Из недостатков также можно отметить, что miniSOG неэффективен в опухолевых клетках *in vivo*, в отличие от другого генетически кодируемого фотосенсибилизатора KillerRed [74].

### 2.3.3 Генетически кодируемые фотосенсибилизаторы на основе GFP-подобных белков

Представителями другого класса генетически кодируемых фотосенсибилизаторов являются белок KillerRed и его мономерный вариант SuperNova.

Как правило, для GFP-подобных флуоресцентных белков фототоксичность не характерна, что несомненно является достоинством для основных приложений флуоресцентных белков. Как было сказано выше, структурной основой низкой фототоксичности флуоресцентных белков предположительно является их строение, а именно, плотный  $\beta$ -бочонок, который блокирует доступ кислорода и других молекул к возбужденному



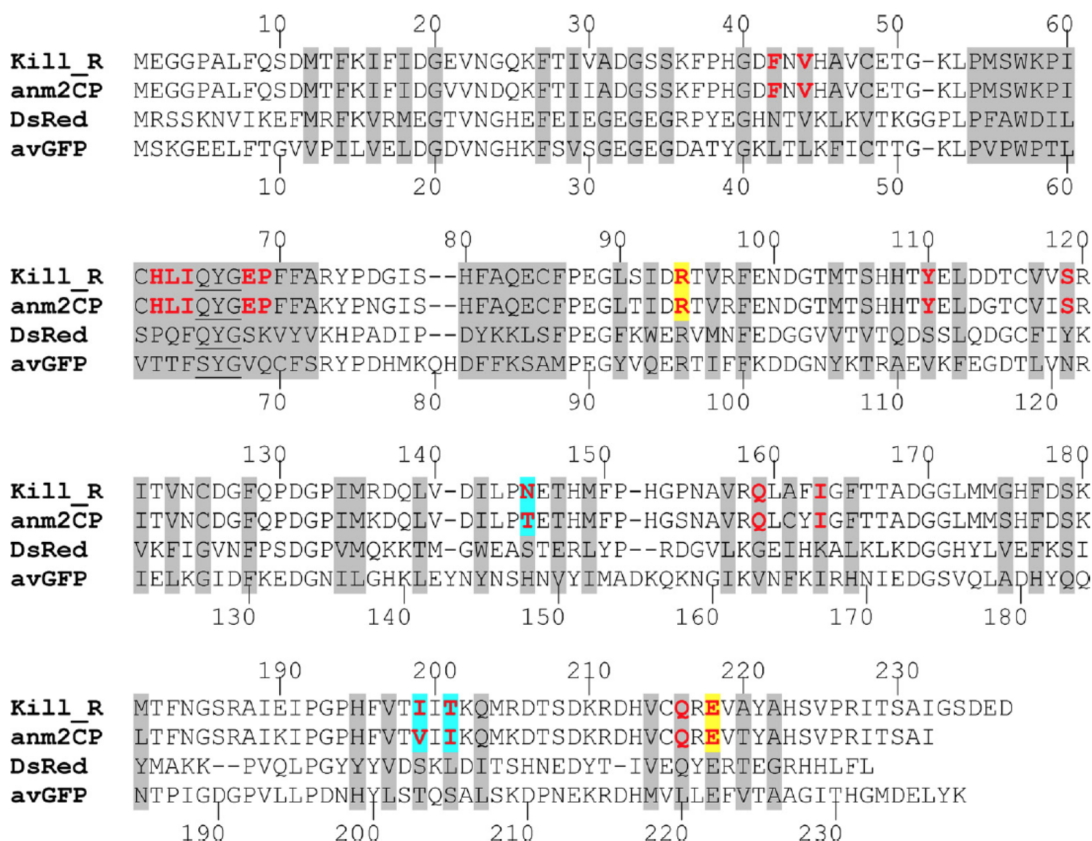
хромофору. Кроме того, недавние исследования показали, что чистый синтетический хромофор GFP производит едва уловимое количество синглетного кислорода [75]. Это также объясняет низкую фототоксичность флуоресцентных белков.

Низкая фототоксичность природных флуоресцентных белков вполне логична и, вероятно, вызвана естественным отбором. В противном случае сильное освещение, при котором живут экспрессирующие их организмы в тропиках, повредило бы их ткани [76]. В связи с этим представляется маловероятным, что среди природных флуоресцентных белков будет найден эффективный генетически кодируемый фотосенсибилизатор [2].

## 2.4 KillerRed

Первый фототоксичный флуоресцентный белок KillerRed был создан в 2006 году в результате мутагенеза нефототоксичного хромобелка anm2CP с отбором на яркость флуоресценции. KillerRed представляет собой димерный красный флуоресцентный белок с максимумами возбуждения и эмиссии при 585 и 610 нм, коэффициентом экстинкции  $45000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  и квантовым выходом флуоресценции 25% [6]. Трехмерная структура KillerRed схожа со структурами других членов семейства GFP-подобных флуоресцентных белков и представляет собой  $\beta$ -бочонок. Хромофор представлен тремя аминокислотными остатками Gln65-Tyr66-Gly67 и встроен в середину  $\alpha$ -спирали, расположенной вдоль продольной оси  $\beta$ -бочонка. С-концевой участок 224-233 имеет неупорядоченную конформацию и отходит от боковой поверхности белка.

При нескольких раундах случайного мутагенеза нефототоксичного хромобелка anm2CP в результате отбора на яркость красной флуоресценции был получен фототоксичный белок KillerRed, который отличается от исходного белка 20 аминокислотными заменами (**Рисунок 8**) [6].

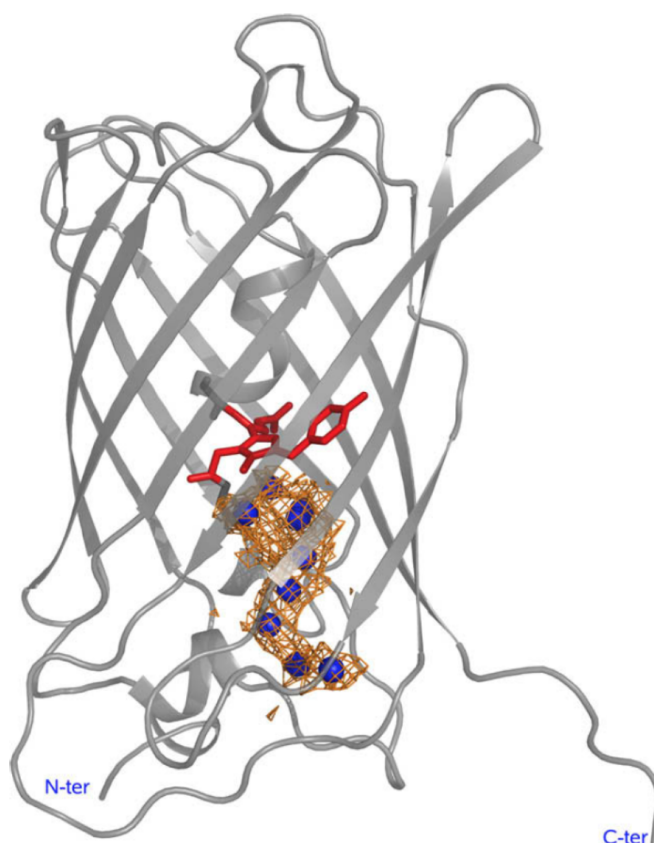


**Рисунок 8.** Выравнивание белковой последовательности KillerRed, его предшественника anm2CP, avGFP и DsRed [6].

## 2.4.2 Структура водного канала KillerRed

Уникальным отличием KillerRed от остальных GFP-подобных белков является наличие водного канала, который проходит сверху от  $\beta$ -бочонка до самого хромофора (**Рисунок 9**). Непрерывная цепь водородных связей молекул воды покрывает расстояние от Pro192, фланкирующего “крышку” бочонка, до каталитического остатка Glu218 в области хромофора. Молекулы воды контактируют с хромофором в области имидазольного кольца – предположительно, наиболее реакционноспособной части хромофора в возбужденном состоянии [77]. Стереохимический состав канала точно определяет положение молекул воды в нем. Все молекулы воды в этом канале образуют водородные связи как между собой, так и с проксимальными аминокислотными остатками, формирующими канал. Авторы двух опубликованных работ, посвященных структуре KillerRed, связывают наличие этого канала с фототоксичностью белка KillerRed [4,5]. Изучение трехмерной структуры белка KillerRed и проведение сайт-направленного мутагенеза

способствовали выявлению ключевых аминокислотных остатков, отвечающих за фототоксичный эффект.



**Рисунок 9.** Пространственная структура мономера KillerRed. Пептидная цепь обозначена серым цветом, хромофор (Gln65–Tyr66–Gly67) – красным; пространство канала показано в виде оранжевой сетки, охватывающей молекулы воды (синие сферы) [4].

Так, например, аминокислотные остатки P154 и E190 (S и K в apt2CP, соответственно), участвующие в формировании канала, облегчают прохождение кислорода из окружающей среды в канал и обратно. I199 (V в apt2CP) образует ван-дер-Ваальсову связь с хромофором и формирует гидрофобный участок между полостью и хромофором, вероятно, предотвращая контакт активных форм кислорода с гидроксibenзильденовым фрагментом хромофора.

В работе Плетнева и соавторов [5] был также проведен ряд экспериментов с мутагенезом аминокислотных остатков, формирующих водный канал, направленных либо на увеличение доступа воды к хромофору, либо блокирование доступа воды к нему. Все полученные мутанты имели очень низкие показатели созревания, что не позволяло сравнить их фототоксичность

с исходным KillerRed. Однако, мутант A220T, по-видимому, частично перекрывал канал, уменьшив фототоксичность примерно в 10 раз, при этом сохранив спектральные свойства и эффективность созревания, близкими к таковым у KillerRed (**Рисунок 13**).

Тем не менее, в целом канал, вероятно, похож на канал в apt2CP, и предполагается, что KillerRed генерирует активные формы кислорода в основном из-за мутаций, которые трансформировали хромобелок apt2CP в флуоресцентный белок. По сравнению с хромобелками, флуоресцентные белки находятся в возбужденном состоянии намного дольше, что увеличивает вероятность реакции с кислородом. Поэтому, вклад в фототоксичность белка KillerRed вносит не только водный канал, но и хромофор с его окружением.

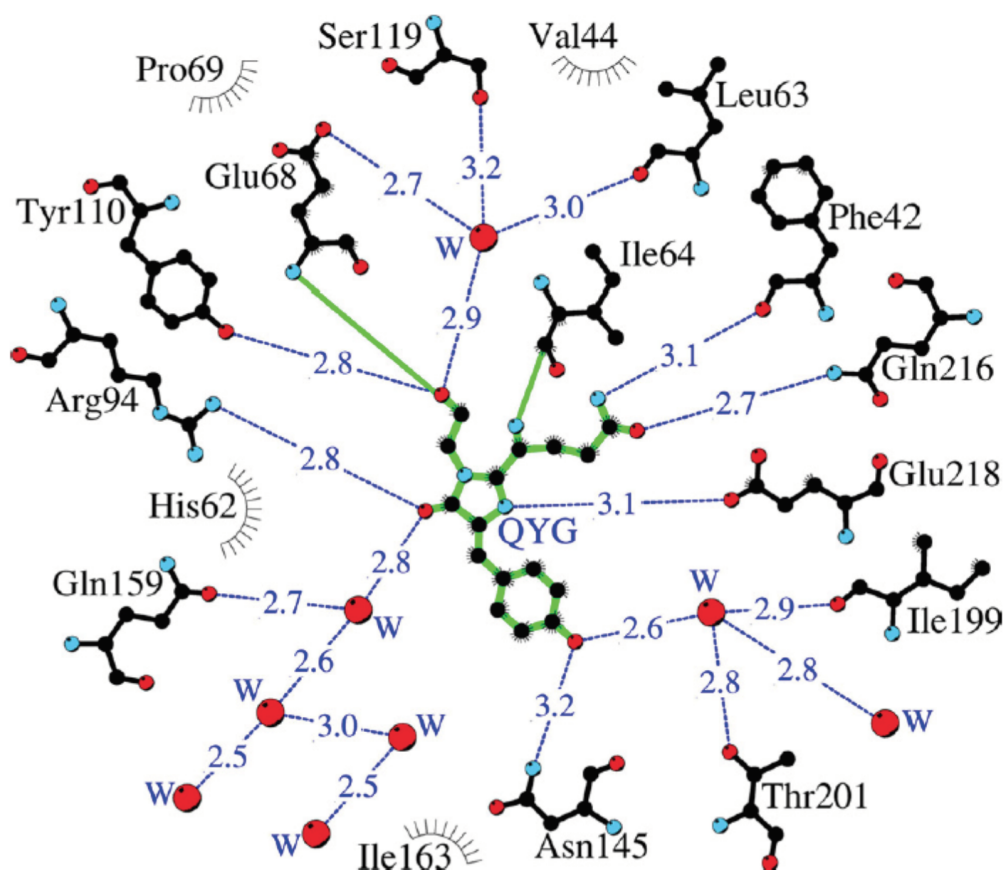
### 2.4.3 Хромофор KillerRed

В результате посттрансляционной модификации последовательности Gln65-Tyr66-Gly67 формируется хромофор, состоящий из имидазольного гетероцикла с *p*-гидроксипенцилиденовым заместителем (DsRed-подобный хромофор). Фенольное кольцо Tyr66 находится в *цис*-ориентации по отношению к Ca-N связи и лежит практически в одной плоскости с имидазольным кольцом. Как и у всех красных и дальнекрасных флуоресцентных белков,  $\alpha$ -атом углерода первого остатка хромофора Gln65 участвует в образовании двойной N-ацилиминной связи N=Ca. Эта связь способствует вовлечению новых атомов в сопряженную *p*-электронную систему хромофора, в результате чего происходит батохромный сдвиг в спектрах поглощения и эмиссии [78].

Структура KillerRed показывает существование поры на поверхности  $\beta$ -цилиндра, образованной основной цепью из аминокислотных остатков Ile142, Leu143, Pro144, Ile199, Ile200 и Thr201. Цепь из трех молекул воды проходит через пору извне к гидроксифенильному фрагменту хромофора. Наличие аналогичной поры было показано для нескольких нефототоксичных флуоресцентных белков, таких как TurboGFP (вариант *rpluGFP2*, *Pontellina plumata*), zGFP506, zYFP538, zRFP574 (*Zoanthus*) и mKate (вариант *EqFP578*, *Entacmaea quadricolor*) [79,80]. На основании экспериментов по проведению мутагенеза аминокислотных остатков, формирующих эту пору, было выдвинуто

предположение, что она имеет важное значение для скорости созревания хромофора, предоставляя дополнительный доступ для молекулярного кислорода.

Хромофор, находясь в центре  $\beta$ -бочонка, довольно тесно контактирует со своим микроокружением. В радиусе 4 Å он образует сеть водородных связей, напрямую или через молекулы воды, примерно с 17 аминокислотными остатками, включая каталитические остатки Arg94 и Glu218 (Arg96 и Glu222 в GFP, соответственно) (**Рисунок 10**). Образование сети водородных связей идет при активном участии молекул воды. Некоторые из этих молекул, как предполагается, образовались в результате процесса созревания хромофора. Такая сеть, по-видимому, имеет важное значение, потенциально обеспечивая перенос протонов в процессах созревания и деградации хромофора.

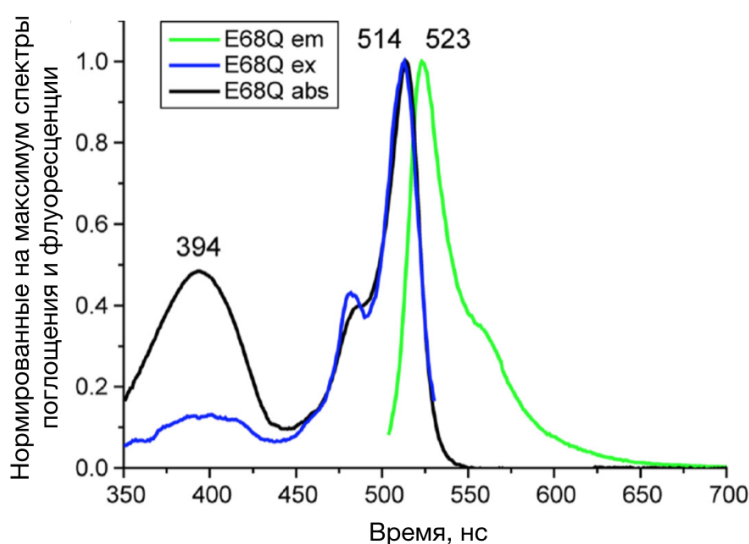


**Рисунок 10.** Схема, иллюстрирующая окружение хромофора в белке KillerRed [5].

#### 2.4.4 Аминокислотное окружение хромофора KillerRed

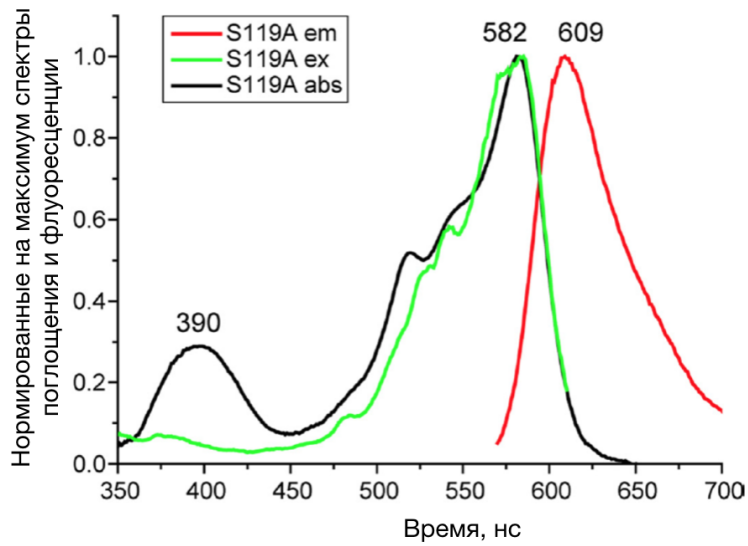
Роль аминокислотных остатков, входящих в окружение хромофора, была изучена с помощью сайт-направленного мутагенеза и анализа структуры KillerRed.

Замена E68Q привела к полному ингибированию образования красного хромофора. Полученный мутант имел максимумы поглощения при 394 и 514 нм (протонированный и депротонированный хромофор GFP) и не был фототоксичным (**Рисунок 11**). Таким образом, глутамат в 68 положении является одним из важных аминокислотных остатков, участвующих в образовании красного хромофора [5].

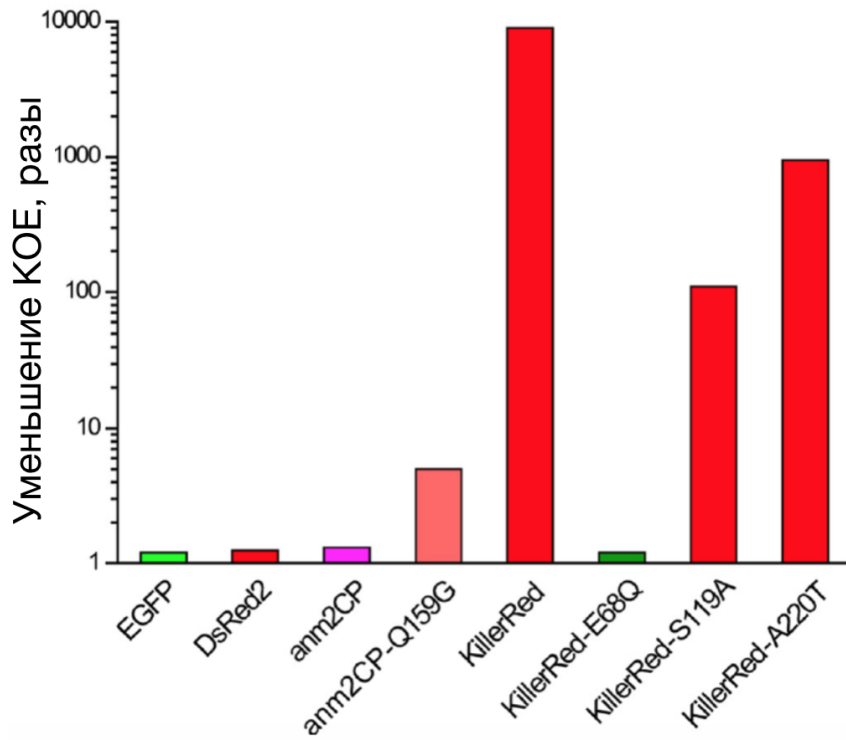


**Рисунок 11.** Спектр возбуждения и флуоресценции мутанта KillerRed E68Q [5].

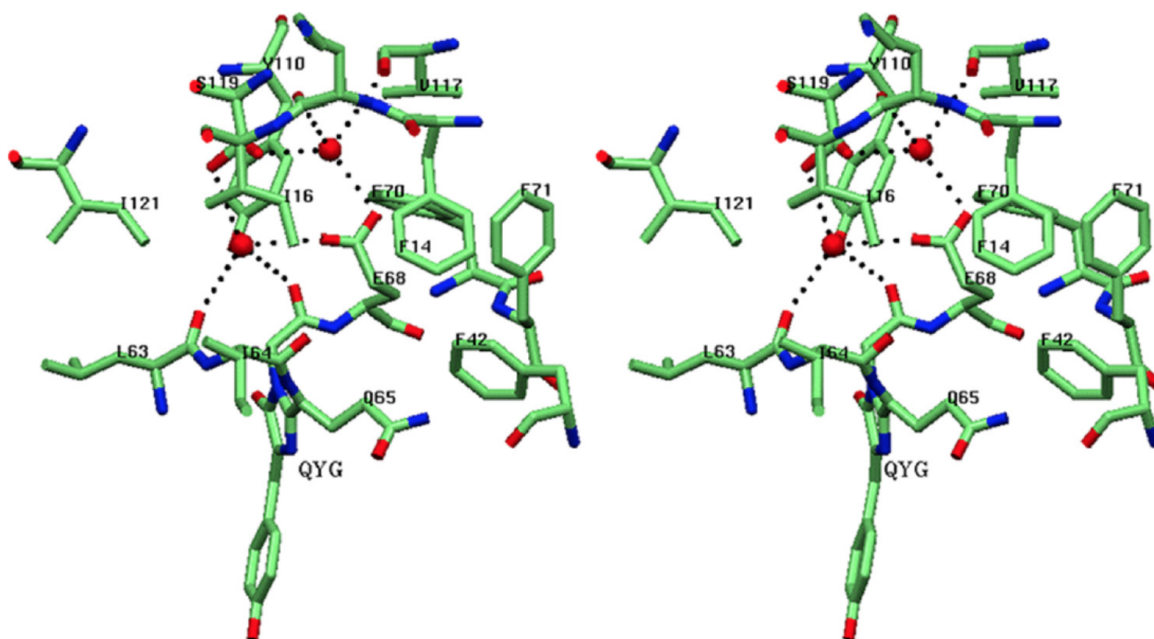
Замена S119A незначительно повлияла на спектральные свойства белка, однако фототоксичность упала в 100 раз [5] (**Рисунок 12, 13**). Замена гидрофильного Ser119 гидрофобным Ala, возможно, приводит к удалению молекул воды, находящихся между Glu68, Ser119 и хромофором (**Рисунок 14**). По-видимому, гидрофобная изоляция отрицательно заряженной группы Glu68 (а так же удаление гидрофильного Ser119) из сети водородных связей может сыграть решающую роль в производстве активных форм кислорода.



**Рисунок 12.** Спектр возбуждения и флуоресценции мутанта KillerRed S119A [5].



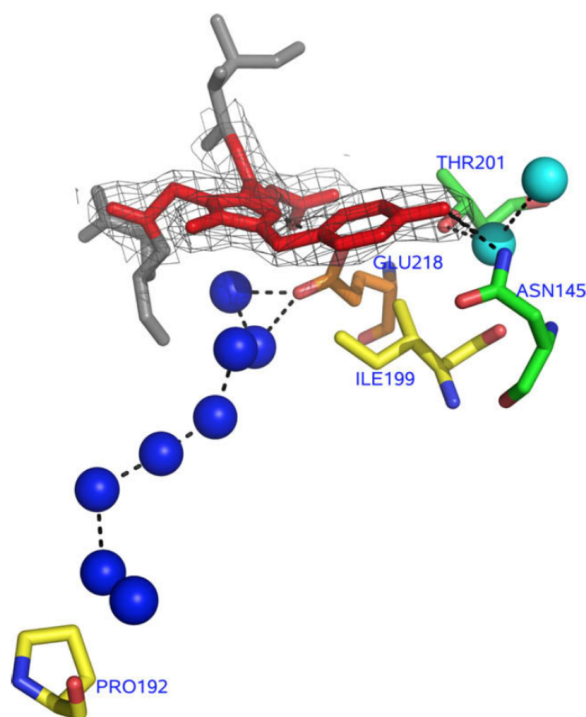
**Рисунок 13.** Уменьшение количества жизнеспособных бактерий (колониобразующих единиц (КОЕ)), экспрессирующих данные флуоресцентные белки, после облучения белым светом [5].



**Рисунок 14.** Ключевые аминокислотные остатки, прилегающие к хромофору. Glu68 образует водородную связь с Ser119 с помощью двух молекул воды в основном гидрофобном кармане. Боковая цепь Ser119 показана в двух альтернативных ориентациях [5].

Три аминокислотных замены T145N, C161A и T201I находятся в непосредственной близости от фенольного кольца хромофора. Первые две аминокислотные замены, как было показано, являются наиболее критичными для цитотоксических и флуоресцентных свойств KillerRed. Эти две мутации вносят основной вклад в преобразование нефлуоресцентного транс-хромофора апт2CP во флуоресцентный цис-хромофор KillerRed. Asn145 и Thr201 образуют водородные связи с гидроксилом Tyr66 напрямую и через молекулу воды, соответственно, тем самым стабилизируя хромофор в цис-положении. Эксперименты по направленному мутагенезу показали, что аминокислотные остатки Asn145 и Ala161, замененные на Thr145 и Cys161 как в апт2CP, приводят к потере флуоресценции у KillerRed. Структурный анализ показал, что Cys161 находится близко к Asn145, тем самым не допуская образования водородной связи с гидроксилом хромофора. Поэтому, предполагается, что Ala161, имеющий меньший остаток боковой цепи, будет устранять это негативное влияние (**Рисунок 15**).





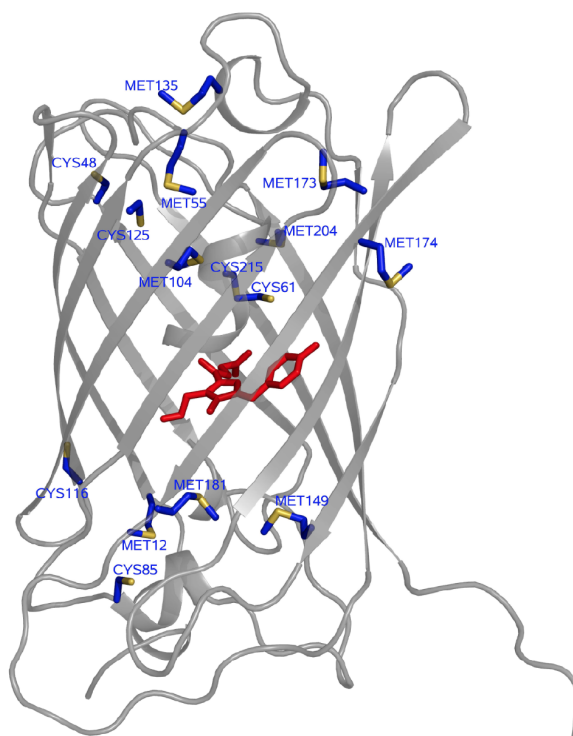
**Рисунок 15.** Структурные основы фототоксичности KillerRed. Цепочка молекул воды, связывающая хромофор (красный) с растворителем, показана в виде темно-синих сфер. Водородные связи показаны пунктирными линиями. Мутированные в белке anm2CP аминокислотные остатки, которые участвуют в формировании канала, показаны желтым, а в стабилизации хромофора – зеленым. Также показан остаток Glu218 (оранжевый), и две молекулы воды (голубые сферы), стабилизирующие хромофор [4].

Кроме того, предполагается, что транс-состояние нефлуоресцентного хромофора в anm2CP стабилизируется водородной связью с Gln159. По-видимому, образование связи с Gln159 предпочтительнее, чем с Thr145, незначительного для стабилизации цис-формы.

Белок DsRed имеет остаток глицина в положении 159: глицин меньше, чем глутамин, и дает возможность стабилизировать Ser145 цис-форму хромофора через аналогичную водородную связь с гидроксильной группой Tyr66. Действительно, замена Q159G в anm2CP дестабилизирует нефлуоресцентную транс-форму хромофора и смещает равновесие в пользу флуоресцентной цис-формы, стабилизированной водородной связью с Thr145. При этом у данного мутанта наблюдается слабая флуоресценция, а фототоксичность возрастает примерно в 10 раз, по сравнению с немутантной формой. Данный факт еще раз подтверждает то, что существенный вклад в фототоксичность вносит цис-положение хромофора KillerRed.

Следует отметить, что DsRed, несмотря на наличие такого же хромофора, не проявляет признаков фототоксичности. Важным различием между KillerRed и DsRed является то, что в последнем молекулы воды с торцевой части “крышки”  $\beta$ -бочонка не достигают хромофора. Боковая цепь проксимального остатка лизина в положении 69 образует водородную связь с Ser199, тем самым блокируя прямой доступ молекул воды к хромофору. У KillerRed, напротив, аминокислотные остатки пролина и изолейцина, находящиеся в таких же положениях, оставляют канал открытым.

Эффективный фотосенсибилизатор должен защищать себя от повреждающего воздействия активных форм кислорода. Яркой особенностью KillerRed является большая доля серосодержащих остатков (6 цистеинов и 10 метеонинов), распределенных по всему  $\beta$ -бочонку (**Рисунок 16**). Вполне возможно, что эти остатки играют защитную роль от фотоиндуцированного окисления. В частности, известно, что остатки метионина легко окисляются активными формами кислорода с образованием метионинсульфоксида, обеспечивая защиту от эндогенного окислительного стресса [81].



**Рисунок 16.** Серосодержащие аминокислотные остатки в KillerRed. Хромофор изображен красным цветом, остатки цистеина и метионина отображаются синим цветом, а атомы серы выделены желтым.

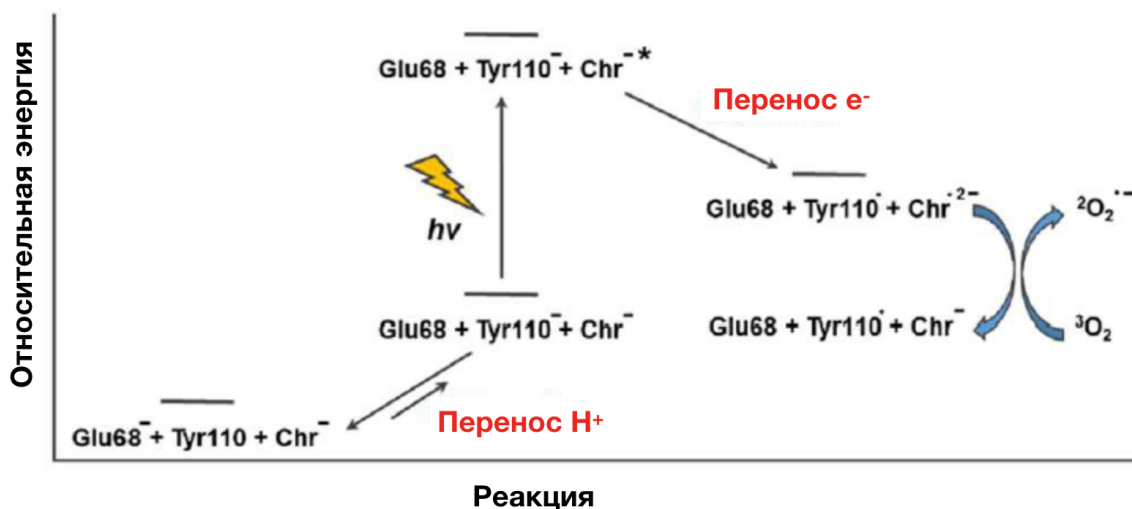
## 2.4.5 Предполагаемый механизм фототоксичности KillerRed

Несмотря на обширный мутационный анализ белка KillerRed, механизм образования активных форм кислорода так и оставался неизвестным. Понимание того, как KillerRed генерирует АФК, имеет большое значение, поскольку оно может дать ключ к повышению его фототоксичности. Так как KillerRed является фотосенсибилизатором типа I [9], выяснение процесса, посредством которого происходит фотоиндуцированный перенос электрона, будет важным шагом вперед.

В недавно опубликованной статье [82] Ли и соавторы провели компьютерное моделирование процессов фотоиндуцированного переноса электронов, происходящего в KillerRed. Основываясь на оценке, что KillerRed является фотосенсибилизатором типа I, авторы статьи попытались найти аминокислотные остатки, которые могут быть донорами электронов для возбужденного хромофора.

Они выяснили, что таким донором может служить аминокислотный остаток Tyr110. Он расположен в непосредственной близости от хромофора и находится рядом с аминокислотными остатками Glu68 и Ser119. Для переноса электрона с Tyr110 на хромофор, Tyr110 должен находиться в депротонированном состоянии. Данное состояние может достигаться путем переноса протона с Tyr110 на депротонированный Glu68. Моделирование показало, что в белке KillerRed лишь 0,1% Tyr110 будет существовать в его депротонированной форме, и что координация молекулы воды между Glu68 и Tyr110 будет иметь решающее значение для переноса протона. Стоит отметить, что из-за чрезвычайно гидрофобной среды вокруг Glu68 основная популяция Glu68 считается протонированной. Однако Glu68 должен быть депротонирован, чтобы иметь возможность депротонировать Tyr110. После проведения дополнительных расчетов выяснилось, что Ser119, образующий водородную связь с Glu68, стабилизирует депротонированный Glu68, тем самым способствуя переносу протона с Tyr110 на Glu68. Эти результаты согласуются с предыдущими мутационными исследованиями, где мутант S119A KillerRed проявлял незначительную фототоксичность.

Таким образом, авторы статьи показали, что перенос протона в основном состоянии от Tyr110 к Glu68 является необходимым для фотоиндуцированного переноса электрона от Tyr110 к хромофору KillerRed, что, в свою очередь, приводит к образованию активных форм кислорода (**Рисунок 17**).



**Рисунок 17.** Схема фотопродукции супероксида в белке KillerRed [82].

#### 2.4.6 Димерная структура белка KillerRed

KillerRed относится к GFP-подобным белкам из семейства *Anthozoa*, и в отличие от тетрамерных красных флуоресцентных белков и хромобелков этого семейства, существует в виде димера как в растворе, так и в кристаллическом состоянии. В кристалле димеры упакованы под углом 45° и образуют олигомерную спираль. Димер белка стабилизируется за счет нескольких типов взаимодействий.

Главный вклад в стабилизацию димера белка KillerRed вносят два аминокислотных остатка Glu99 и Arg158, образующих солевые мостики. Два ароматических остатка Phe162, экранированные четырьмя остатками гистидина и двумя остатками лейцина, формируют стеклинг-взаимодействие, что так же вносит свой вклад в стабилизацию димера. Кроме перечисленных выше взаимодействий, вклад в образование димера вносят водородные связи между остатками боковых аминокислотных групп и слабые Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия. Нерегулярная С-концевая часть белка (остатки 224-233)

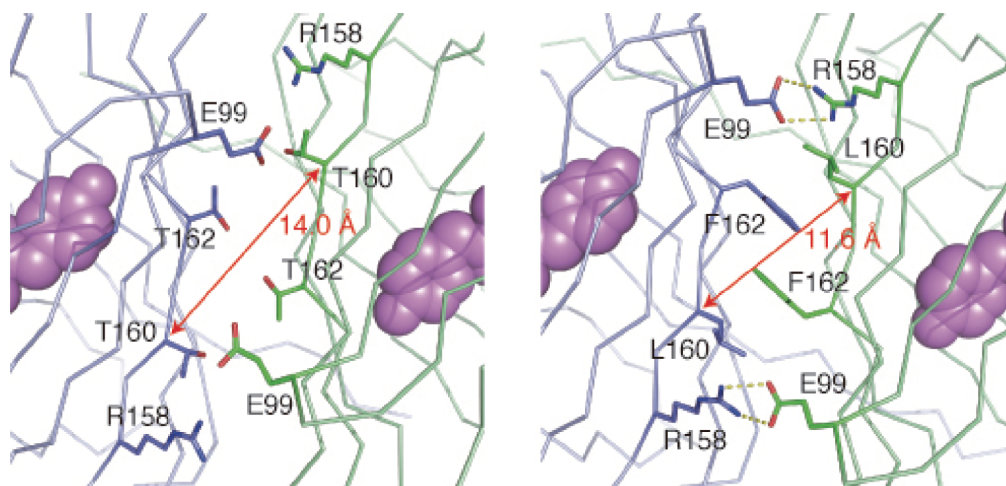
отходит от нижней части  $\beta$ -бочонка и взаимодействует с поверхностью соседнего мономера, что также способствует стабилизации интерфейса между двумя белками.

Будучи слитым с другими белками, KillerRed может приводить к потере их функциональности. Например, экспрессия химерного гена H2A-KillerRed даже без облучения приводит к утрате способности клеток делиться [83]. Поэтому используется тандемная версия KillerRed, содержащая две копии белка, соединенных гибким линкером. Для других димерных флуоресцентных белков было показано, что в таком случае они формируют внутримолекулярные димеры и ведут себя как псевдомонимерные метки [84], что подтвердилось и в данном случае [7].

#### 2.4.7 SuperNova – мономерный вариант KillerRed

SuperNova [12] мономерный вариант KillerRed. Этот белок отличается от KillerRed шестью аминокислотными заменами. Мутации L160T и F162T ослабляют гидрофобные взаимодействия между двумя мономерами (взаимодействия между Phe162 каждого мономера, между Leu160 и Phe162 в KillerRed). Кроме того, эти замены приводят к удалению солевого мостика между Glu99 и Arg158 (**Рисунок 18**)

Мутант KillerRed с двумя аминокислотными заменами L160T и F162T в растворе присутствует в виде мономера. Это подтверждается рентгеноструктурным анализом, по результатам которого видно, что расстояние между мономерами заметно увеличилось [12]. Однако данный мутант KillerRed не является флуоресцентным. Аминокислотные замены G3V, N145S, L172K, M204T приводят к восстановлению красной флуоресценции. Спектроскопический анализ показал, что SuperNova имеет схожие спектры поглощения и эмиссии с максимумами 579 и 610 нм, соответственно. Тем не менее, несмотря на преимущество SuperNova перед KillerRed в виде мономерной структуры, этот белок созревает дольше, чем KillerRed и имеет сниженную фотостабильность и фототоксичность [12].



**Рисунок 18.** Аминокислотные остатки, входящие в область взаимодействия двух мономеров, SuperNova – слева, KillerRed – справа [12].

#### 2.4.8 Использование KillerRed и SuperNova

Активные формы кислорода очень реакционноспособны, поэтому они не распространяются на большие расстояния и реагируют с биологическими молекулами в микронном диапазоне. По этой причине генетически кодируемые фотосенсибилизаторы, такие как KillerRed или SuperNova, получили широкое распространение в биологических исследованиях [85]. С помощью методов генной инженерии можно менять их внутриклеточную локализацию и селективно влиять на процессы внутри клетки, изучать окислительный стресс и индуцировать клеточную гибель.

Известно, что плазматическая мембрана играет важную роль в поддержании клеточного гомеостаза, целостности клеток и транспорте питательных веществ [86]. Окисление ненасыщенных липидов активными формами кислорода вызывает конформационные изменения и нарушает структуру клеточной мембраны, что в конечном итоге приводит к некрозу [87]. Так например, KillerRed с мембранной локализацией успешно использовался при селективной абляции нейронов у червей *Caenorhabditis elegans* [88] или рыб *Danio rerio* [89]. При экспрессии под специфичным промотором в клетках миокарда KillerRed с мембранной локализацией может вызывать изменения частоты сердечных сокращений и сократительной способности сердца у рыбок *Danio rerio* [90], а у головастиков *Xenopus laevis* он может вызвать

окислительный стресс, что внесло вклад в изучение механизмов восстановления сердца после некроза [91].

В случае локализации KillerRed в межмембранном пространстве митохондрий, можно изменить механизм фототоксического воздействия на клетку и запустить в ней программируемый апоптоз. Так, было показано, что окислительный стресс, вызванный KillerRed с митохондриальной локализацией, может увеличить проницаемость митохондриальной мембраны, привести к высвобождению цитохрома C, активации каспаз и в итоге к апоптозу [92,93]. Интересно, что KillerRed с той же митохондриальной локализацией иногда может индуцировать независимую от каспаз гибель клеток за счет деполяризации митохондриальной мембраны, что приводит к увеличению образования активных форм кислорода и разрушению митохондрий [94,95].

При локализации в ядре tdKillerRed во фьюзе с белком TRF1 вызывает повреждение теломерной ДНК, что приводит к преждевременному старению и гибели клеток [96]. На этой же модели был показан механизм защиты теломер от окислительного повреждения [97]. Слияние tdKillerRed с гистоном H2A или белком ядерной оболочки B1 может вызвать остановку клеточного цикла путем увеличения разрывов в ДНК, что в конечном итоге приводит к гибели опухолевых клеток [98]. Поскольку индуцированное активными формами кислорода повреждение ДНК может быть исправлено по пути эксцизионной репарации оснований, то KillerRed с ядерной локализацией используют для исследования того, как белки репарации рекрутируются в участки повреждения ДНК в клетках [99,100].

## 3. Материалы и методы

### 3.1 Амплификация ДНК

Для амплификации ДНК при клонировании, а также при тестировании полученных конструкций применяли стандартную полимеразную цепную реакцию с использованием Q5 полимеразы (NEB). Амплификацию проводили на приборе PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research), продукты амплификации

анализировали в 1,5-2% агарозном геле, содержащем 0.5 мкг/мл бромистого этидия.

## 3.2 Клонирование ДНК методом Golden Gate

Сборка плазмид методом Golden Gate используется для “бесшовной” сборки нескольких фрагментов ДНК [101]. Данный метод использует преимущества рестриктаз IIS типа, например, рестриктаз BsaI, BpiI, Esp3I, которые разрезают ДНК на расстоянии нескольких нуклеотидов от сайта распознавания. Разделение сайта распознавания и сайта разрезания имеет два следствия:

- можно задать любой “липкий” конец для лигирования ДНК, что позволяет собирать множество фрагментов ДНК одновременно;
- реакцию рестрикции и лигирования можно проводить в одной реакционной смеси. Разделение сайта узнавания и сайта разрезания позволяет правильно собранным продуктам оставаться соединенными, а в случае рестрикции и лигирования исходных последовательностей – провести повторную реакцию в той же смеси. Это делает сборку плазмид из нескольких фрагментов ДНК гораздо более эффективной, по сравнению с обычным методом клонирования, при котором рестрикцию и лигирование проводят отдельно.

При постановке реакции Golden Gate использовались рестриктазы BsaI, BpiI, Esp3I и T4-ДНК лигаза (Thermo Fisher Scientific, США).

Состав реакционной смеси:

2 мкл - 10x буфер для T4-ДНК лигазы

1 мкл - Рестриктаза

1 мкл - T4-ДНК лигаза

20 фмоль каждой из плазмид/фрагмента ДНК

Оставшийся объем доводили до 20 мкл mQ.

Реакцию проводили в ДНК-амплификаторе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США) при следующих условиях: 37 °C – 10 мин., далее 30 циклов с температурным



режимом 37 °C – 1,5 мин., 16 °C – 3 мин., далее 50 °C – 10 мин. и 80 °C – 5 мин [102].

### 3.3 Создание векторов для экспрессии в клетках бактерий и млекопитающих

Плазмиды для экспрессии белков в клетках бактерий конструировали согласно методу Golden Gate [103], следуя синтаксису из набора модульного клонирования MoClo, как описано в [104]. Каждый элемент вектора: рUC ориджин репликации, устойчивость к антибиотику канамицину, маркер LacZ для сине-голубой селекции трансформантов и araBAD промотор с белком AraC были амплифицированы с использованием специфичных праймеров, содержащих сайты для рестриктазы Esp3I. С полученными ПЦР продуктами ставили реакцию Golden Gate с использованием рестриктазы Esp3I (Thermo Fisher Scientific, США) и T4-ДНК лигазы при следующих условиях: 37 °C – 10 мин., далее 30 циклов с температурным режимом 37 °C – 1,5 мин., 16 °C – 3 мин., далее 50 °C – 10 мин. и 80 °C – 5 мин. В результате был получен вектор pBAD Level 1, позволяющий проводить индукцию экспрессии генов интереса арабинозой.

Последовательности белков SuperNova и KillerRed были оптимизированы (удалены сайты рестриктаз BsaI и BpiI, необходимых для клонирования) и синтезированы в компании Twist Bioscience (США). Для экспрессии в бактериях кодирующие последовательности белков, а также библиотеки мутантов, клонировали в вектор pBAD Level 1. Клонирование осуществляли методом Golden Gate с использованием рестриктазы BsaI.

Для экспрессии генов в эукариотических клетках линии Hela Kyoto и создания стабильных клеточных линий было решено создать вектор, совместимый с логикой клонирования MoClo [104], используя вектор pLVT [105] в качестве основы. Каждый элемент вектора: рUC ориджин репликации, ген устойчивости к антибиотику ампициллину, селективный маркер – транскрипционная единица с красным флуоресцентным белком mScarlet [106] под контролем конститутивного бактериального промотора – и элементы для вирусной интеграции и экспрессии [107] были амплифицированы с

использованием специфичных праймеров, содержащих сайты для рестриктазы Esp3I. При ПЦР из элементов, необходимых для вирусной транскрипции, обратной транскрипции и интеграции, были удалены сайты BsaI и BpiI. С полученными ПЦР продуктами ставилась реакция Golden Gate с рестриктазой Esp3I (Thermo Fisher Scientific, США) и T4-ДНК лигазой при следующих условиях: 37 °C – 10 мин., далее 30 циклов с температурным режимом 37 °C – 1,5 мин., 16 °C – 3 мин., далее 50 °C – 10 мин. и 80 °C – 5 мин. В результате был получен вектор pLVT Level 1.

### 3.4 Случайный мутагенез кодирующей последовательности белка KillerRed

Случайный мутагенез кодирующей последовательности белков SuperNova и KillerOrange проводили с использованием GeneMorph II Random Mutagenesis Kit (Agilent, США) с прогнозируемой частотой ошибок при амплификации. Подробный протокол доступен на сайте Agilent [108].

Ниже приведен состав реакции для проведения “ПЦР с ошибками” из расчета на 50 мкл реакционной смеси:

40 мкл – деионизированная вода

5 мкл – реакционный буфер Mutazyme II

1 мкл – 40 mM смеси нуклеотидтрифосфатов из набора GeneMorph II Random Mutagenesis Kit

2 мкл – смесь праймеров (5 мкМ каждый)

1 мкл – полимеразы Mutazyme II (2.5 Ед/мкл)

1 мкл – 100 нг вектора pQE-30, содержащего кодирующую последовательность белков SuperNova или KillerOrange

ПЦР проводили в амплификаторе при следующих условиях: 95 °C – 60 сек., далее 30 циклов с температурным режимом 95 °C – 60 сек., 60 °C – 30 сек., далее 72 °C – 60 сек.

Амплифицированную ДНК очищали на колонках для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей Cleanup Standard (Евроген, Россия).

Затем проводили рестрикцию соответствующими ферментами BsaI (при клонировании по технологии Golden Gate) или BamHI и HindIII (при клонировании в pQE-30) (Thermo Fisher Scientific, США). Результаты расщепления анализировали методом электрофореза в агарозном геле, после чего продукты рестрикции очищали из геля с помощью набора для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей Cleanup Standard (Евроген, Россия). Очищенные фрагменты лигировали с использованием ДНК-лигазы бактериофага T4 (Сибэнзим, Россия) в вектор pQE-30, линейаризованный по сайтам BamHI и HindIII, или в вектор pBAD Level 1 методом Golden Gate. Продукт реакции лигирования использовали для электрической трансформации клеток *E.coli* штамма XL1-Blue или TOP10.

### 3.5 Химическая трансформация клеток *E.coli*

100 мкл химических компетентных клеток (штамм XL1-Blue или TOP10) размораживали во льду, в пробирку добавляли 2 мкл реакции лигирования и инкубировали во льду 30 минут. Далее помещали пробирку в термостат и инкубировали 90 секунд при 42 °С. Затем добавляли 300 мкл среды SOB и ставили в термостат на 1 час при 37 °С. После этого 200 мкл бактериальной суспензии клеток высевали на чашку Петри с агаризованной средой, содержащей необходимый антибиотик.

### 3.6 Электрическая трансформация клеток *E.coli*

Перед проведением электротрансформации с целью удаления солей реакцию лигирования очищали с использованием набора для очистки ДНК Cleanup Mini (Евроген, Россия). Продукты лигирования смывали с колонки 20 мкл mQ. 40 мкл электрокомпетентных клеток размораживали при 0°С, и в размороженные клетки вносили 5 мкл реакции лигирования. Клетки переносили в предварительно охлажденную кювету для электропорации (Bio-Rad, США) и проводили электропорацию в приборе MicroPulser (Bio-Rad, США) согласно стандартному протоколу. Сразу после этого в кювету добавляли 3 мл среды SOB и полученную бактериальную суспензию переносили в

пластиковые пробирки объемом 1,5 мл. Пробирки инкубировали 1 час в термостате на 37°C. Бактериальную суспензию высевали на 20 чашек Петри со средой, содержащей ампициллин или канамицин (200 или 50 мг/мл, соответственно). Чашки инкубировали при 37°C в течение 18 часов.

### 3.7 Выделение плазмидной ДНК

Для выделения плазмидной ДНК колонию трансформанта *E. coli* переносили из чашки Петри в пластиковую пробирку с 5 мл среды LB с ампициллином или канамицином (200 или 50 мг/мл, соответственно) и инкубировали в течение 12-18 часов при 37 °C и интенсивном перемешивании в термостатируемом шейкере. 5 мл полученной жидкой культуры *E.coli* осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 4500 об/мин, супернатант удаляли. Полученный осадок ресуспензировали в 250 мкл раствора 1, содержащего 10мМ ЭДТА и РНКаза А 10 мг/мл. Затем, в пробирку вносили 250 мкл раствора 2 (0,2М NaOH + 1%SDS) и аккуратно перемешивали, переворачивая пробирку. Далее добавляли 350 мкл раствора 3 (3М ацетат калия), интенсивно перемешивали, после чего центрифугировали 10 мин при 13400 об/мин, супернатант переносили в чистую пробирку. К супернатанту добавляли 750 мкл изопропилового спирта, встряхивали, и центрифугировали 10 мин при 13400 об/мин. Супернатант удаляли, осадок промывали 700 мкл 70% этанолом. Осадок высушивали и растворяли в 100 мкл TAE буфера.

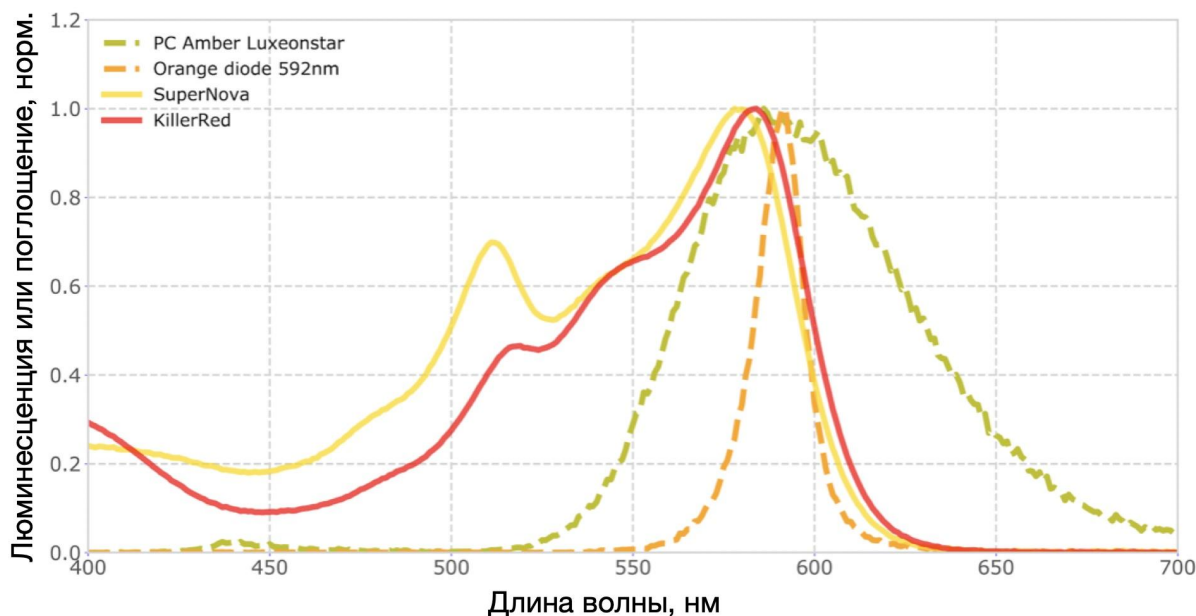
### 3.8 Тест на фототоксичность в клетках *E.coli* методом подсчета колониеобразующих единиц

Штамм TOP10 *E. coli* трансформировали экспрессионным вектором pBAD Level 1, в который были клонированы кодирующие последовательности EGFP, SuperNova, SuperNova2, KillerRed или KillerRed2. На следующий день брали по одной колонии с каждой чашки и разводили в PBS. Небольшую часть суспензии, содержащую около 5000 клеток, высевали на чашку Петри и инкубировали в течение 20 ч при 37°C. Затем чашку оставляли при комнатной температуре на 24 часа для лучшего созревания хромофора. После этого колонии смывали с

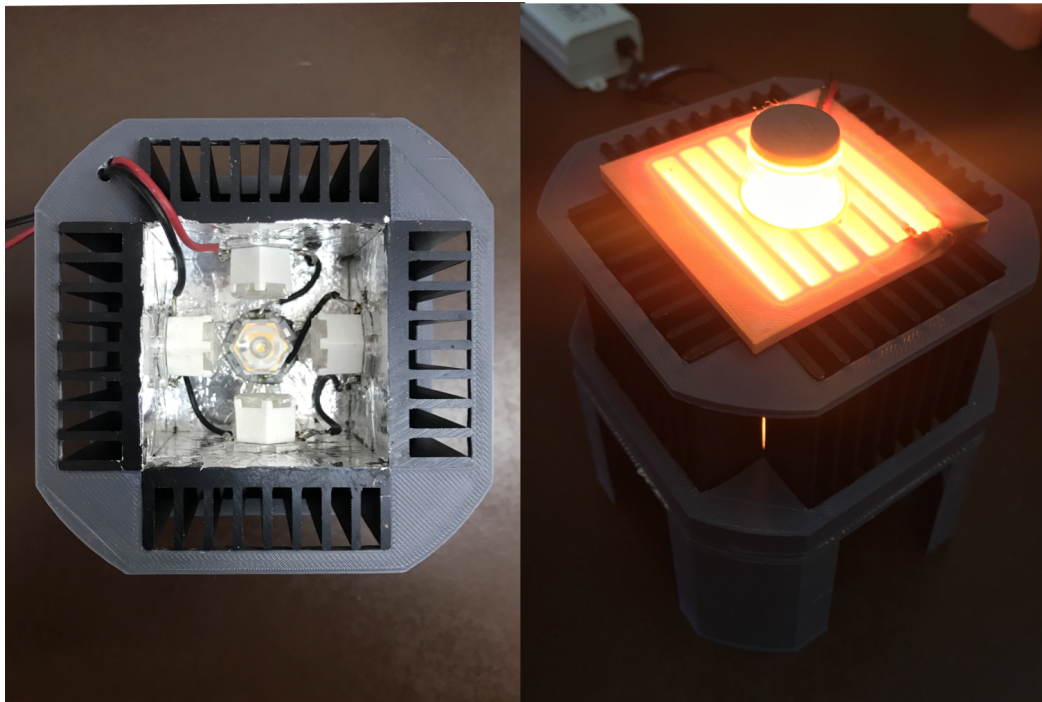
чашек Петри и ресуспендировали в PBS. Суспензию клеток разбавляли в несколько раз до концентрации 1000 клеток на 100 мкл. Клетки с EGFP (нефототоксичный референсный белок) смешивали с клетками, экспрессирующими фотосенсибилизаторы, в соотношении 1:1 в объеме 5 мл в стеклянной пробирке. Перед облучением 50 мкл необлученного образца высевали на чашку Петри. Затем суспензию клеток облучали и отбирали аликвоты по 50 мкл через 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; и 6 мин. Облученные аликвоты высевали на чашки Петри и инкубировали в течение ночи при 37°C. На следующий день подсчитывали зеленые и красные колонии, определяли соотношение красных и зеленых колоний и нормализовали к соотношению, полученному для необлученного образца (0 мин).

Каждый эксперимент по фототоксичности проводили в пяти независимых повторностях. Статистическую значимость разницы значений фототоксичности определяли, используя U-критерий Манна-Уитни.

Образцы облучали пятью светодиодами Rebel PC Amber (591 нм) (LXM2-PL01-0000, Luxeonstar, Канада), прямой ток 350 мА, 550 лм. Спектры излучения светодиодов перекрываются с максимумами спектров поглощения белков SuperNova и KillerRed в области 570 нм (**Рисунок 20**). Установка для облучения показана на (**Рисунок 21**).



**Рисунок 20.** Наложение спектров излучения светодиодов и спектров поглощения KillerRed и SuperNova.



**Рисунок 21.** Фотографии установки светодиодного облучения, используемой при тесте на фототоксичность в клетках *E. coli*. Мощность облучения, используемая в экспериментах, составляла 1 Вт/см<sup>2</sup>.

### 3.9 Трансфекция клеток млекопитающих

За день до трансфекции, 350-450 тысяч клеток HEK293T или Hela Kyoto, рассаживали на 35 мм чашку Петри, чтобы на момент трансфекции культура клеток достигла 70-80% конфлюентности.

Для трансфекции использовали реагент FuGene HD (Promega, США) [109]. В первой пробирке смешивали 50 мкл среды OptiMEM и 3 мкл FuGene HD. К полученной смеси добавляли 100 мкл среды OptiMEM, содержащей 1-1,2 мкг плазмидной ДНК, и инкубировали 30 минут. Во время инкубации заменяли клеткам среду DMEM на OptiMEM, 650 мкл на 35 мм чашку Петри. После инкубации, добавляли трансфекционную смесь к клеткам по каплям, равномерно по всей чашке, постоянно перемешивая. Спустя 5 часов заменяли клеткам среду на DMEM с 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS).

### 3.10 Трансдукция клеток млекопитающих

За день до трансфекции 200 тысяч клеток линии HEK293T рассаживали на 35 мм чашку Петри, чтобы на момент трансфекции культура клеток достигла 30-40% конфлюентности. На следующий день культуру клеток HEK293T трансфицировали смесью из трех плазмид: трансферная плазида, содержащая генетическую конструкцию для интеграции в геном, и две вспомогательные плазмиды pMDG и pR8.91, содержащие необходимые элементы для сборки вирусных частиц и интеграции трансгена в геном [105]. Соотношение плазмид в трансфекционной смеси: 4:1:2 – трансферная плазида, pMDG и pR8.91, соответственно. Трансфекцию проводили по протоколу, приведенному в пункте 4.10.

Через день после трансфекции 50 тысяч клеток Hela Kyoto рассаживали на 35 мм чашку Петри для подготовки к трансдукции. На следующий день (через два дня после трансфекции) среду DMEM с вирусными частицами отбирали, разделяли на аликвоты по 500 мкл и замораживали при -80 °C. Одну из аликвот оставляли и добавляли к 500 мкл среды DMEM в подготовленной заранее чашке Петри с клетками Hela Kyoto. Через сутки после добавления вирусных частиц среду заменяли на 2 мл DMEM с 10% FBS. Через 3 дня оценивали уровень экспрессии трансгена по яркости флуоресценции. Если уровень экспрессии был высоким, то клетки рассаживались на новую чашку Петри для дальнейшего отбора на проточном цитофлуориметре.

### 3.11 Проточная цитофлуориметрия

Для подготовки клеток к проточной цитофлуориметрии использовали модифицированный протокол [110]. Трансдуцированную культуру клеток рассаживали на новую 35 мм чашку Петри для достижения 80% конфлюентности, около 800 тысяч клеток. Клетки снимали с чашки 1 мл раствором Версена, содержащем 0,25% трипсина (Панэко, Россия), после чего добавляли 5 мл среды DMEM с 10% FBS и центрифугировали при 900 об./мин на центрифуге Multi centrifuge CM6M. Супернатант удаляли, а клетки ресуспендировали в PBS (pH 7.4) и ставили на лед. Для сортировки клеток использовали проточный цитофлуориметр BD FACSAria III (BD Biosciences, США).

Для сортировки клеток использовали аргоновый лазер с длиной волны 405 нм и фильтр DAPI 450/50 нм. При сортировке отбирали самые яркие клетки, составлявшие 10% от всей популяции клеток. Для каждого образца собирали по 10-15 тысяч клеток в 1,5 мл пробирку с 300 мкл DMEM с 10% FBS. После сортировки клетки рассаживались в лунки 24-луночного планшета. Через 4 дня клетки рассаживали на 35 мм чашки Петри со средой DMEM и пассивировали для дальнейших экспериментов.

### 3.12 Тест на фототоксичность в клетках млекопитающих

Все линии клеток млекопитающих культивировали в модифицированной среде DMEM, содержащей 2 mM глутамина и 4,5 г/л глюкозы (ПанЭко, Россия), с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки HyClone (Thermo Fisher Scientific, США) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. При определении фототоксичности в клетках млекопитающих использовали подход, аналогичный тому, который применялся в экспериментах на бактериях, и описанный в части 4.9.

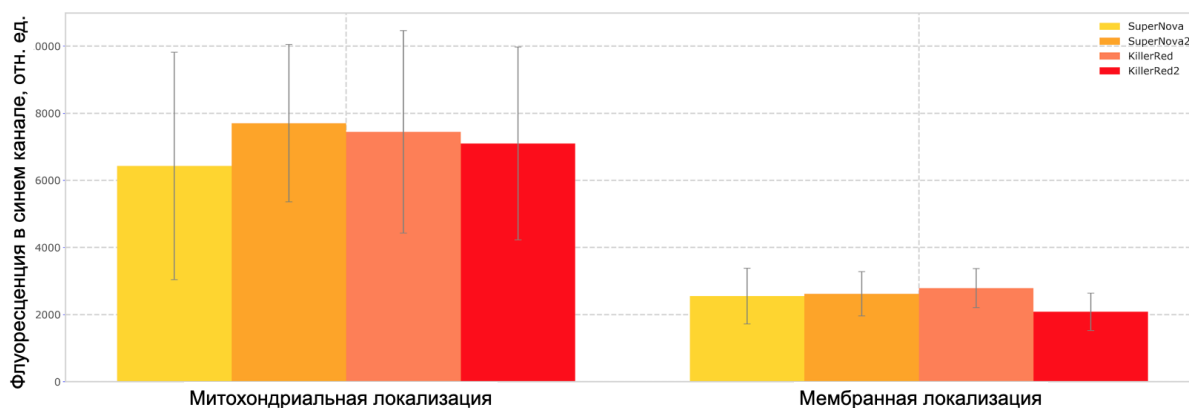
Было создано девять стабильных клеточных линий HeLa Kyoto, экспрессирующих трансгены с одной из генетических конструкций:

- CMV промотор – сигнал митохондриальной локализации – фотосенсибилизатор – T2A TagBFP2 – сигнал ядерной локализации,
- CAG промотор – сигнал мембранной локализации – фотосенсибилизатор – T2A TagBFP2 – сигнал ядерной локализации,
- CMV промотор – EGFP – сигнал ядерной локализации (нефототоксичный контроль).

На месте фотосенсибилизатора находится кодирующая последовательность SuperNova, SuperNova2, KillerRed или KillerRed2. Уровень экспрессии KillerRed, SuperNova и их мутантов проблематично определить по яркости их флуоресценции, так как они имеют разную яркость. Поэтому для нормировки на уровень экспрессии использовали флуоресценцию референсного TagBFP2, который соединен с фотосенсибилизатором через саморазрезающийся T2A пептид [111], что обеспечивает одинаковое соотношение TagBFP2 и фотосенсибилизатора. После трансдукции клетки,

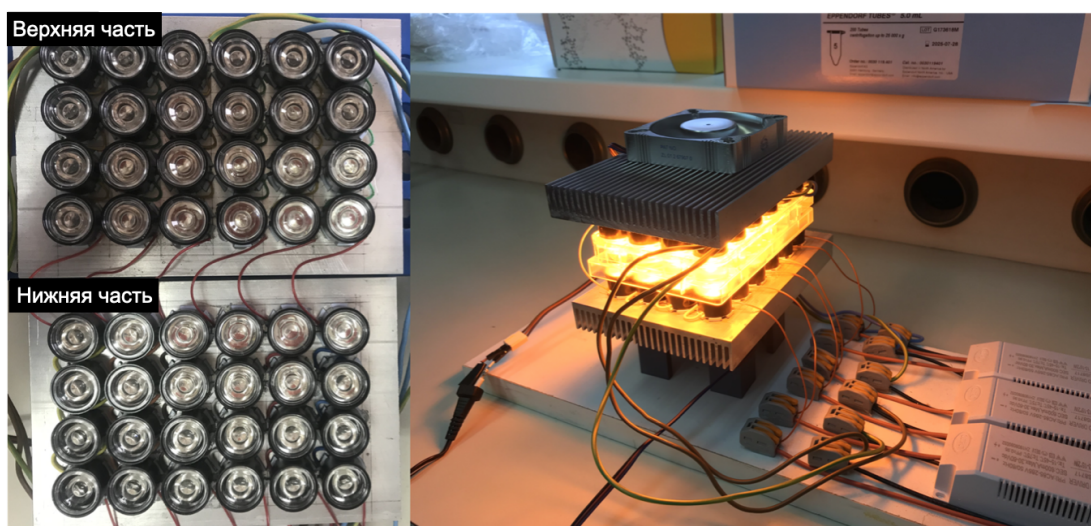


имеющие сходную яркость в синем канале, сортировали на проточном цитофлуориметре BD FACSAria III и высевали по 50 000 клеток на 3 см чашку Петри. Через неделю после сортировки полученные стабильные линии были проанализированы на сопоставимость уровня яркости флуоресценции в синем канале (**Рисунок 22**).



**Рисунок 22.** Яркость синей флуоресценции клеточных линий, стабильно экспрессирующих конструкции с фотосенсибилизаторами с разными локализациями.

Затем клеточную линию, экспрессирующую фотосенсибилизатор, смешивали с клетками, экспрессирующими EGFP, в соотношении 1:1 и высевали в 24-луночный планшет по 50 тысяч клеток на лунку. На следующий день среду меняли на PBS. 24-луночный планшет был помещен между двумя светодиодными сборками таким образом, что одна лунка облучалась двумя диодами сверху и снизу (**Рисунок 23**).



**Рисунок 23.** Фотографии установки светодиодного облучения, используемой в тесте на фототоксичность в клетках млекопитающих. Мощность облучения, используемая в экспериментах, составляла 160 мВт/см<sup>2</sup> на лунку.

Каждую лунку облучали двумя оранжевыми светодиодами Orange diode 592 нм, прямой ток 500 мА, 160 мВт/см<sup>2</sup>. Спектры светодиода показаны на **Рисунке 20**. В экспериментах было шесть временных точек (0, 4, 6, 8, 10, 12 мин для митохондриальной локализации и 0, 5, 10, 15, 20, 25 мин для мембранной локализации), с четырьмя лунками на одну временную точку – технические повторности. После облучения раствор PBS заменяли полной средой DMEM и планшеты помещали в инкубатор на 24 часа. В каждой лунке фотографировали в среднем 300–400 клеток в одном поле зрения на инвертированном микроскопе Leica DMI6000b (Leica Microsystems, Германия), оснащенном объективом HCX PL FLUOTAR L 20/0,40. Количество клеток, экспрессирующих EGFP или фотосенсибилизатор, подсчитывали с использованием программного обеспечения ImageJ [112]. Для каждой временной точки определяли соотношение красных и зеленых клеток и нормализовали его на соотношение в необлученном образце. Для детекции зеленой флуоресценции использовали фильтр GFP (возбуждение 470/40 нм, эмиссия 525/50 нм, дихроичное зеркало 495 нм, Leica, Германия), для красной флуоресценции – фильтр mCherry/TFT (возбуждение 578/21 нм, эмиссия 641/75 нм, дихроичное зеркало 596 нм, Semrock, США).

Статистическую значимость разницы значений фототоксичности определяли, используя U-критерий Манна-Уитни.

### 3.13 Измерение скорости созревания хромофора *in vivo*

Протокол определения скорости созревания хромофора *in vivo* был основан на протоколе, приведенном в статье [106]. Клетки HEK293T высевали в 8-луночный слайд (Ibidi, Германия). На следующий день клетки трансфицировали плазмидой, содержащей CMV-промотор mTurquoise2-T2A-фотосенсибилизатор. Через четыре часа после трансфекции Opti-MEM заменили на среду для визуализации (среда MEM без бикарбоната натрия с добавлением 20 мМ HEPES) и помещали в термостатируемую камеру 37°C на микроскопе. Для детекции голубой флуоресценции использовали фильтр CFP (возбуждение 448/20 нм, эмиссия 482/25 нм, дихроичное зеркало 466 нм, Semrock, США), для красной флуоресценции – фильтр mCherry/TFT

(возбуждение 578/21 нм, эмиссия 641/75 нм, дихроичное зеркало 596 нм, Semrock, США). Изображения в каждом из каналов получали каждые 5 минут в течении 24 часов. С помощью программы ImageJ [112] было выделено несколько отдельных клеток, а значения флуоресценции были скорректированы с учетом фоновой флуоресценции. Затем значения средней флуоресценции в каждом кадре в каждой выделенной области извлекали с помощью функции Z-stack, и все полученные кривые были синхронизированы с начальной временной точкой. Поскольку увеличение флуоресценции является функцией не только кинетики созревания, но и кинетики синтеза белка, мы нормализовали флуоресценцию в красном канале на флуоресценцию в синем канале, чтобы получить относительную кинетику созревания красных белков. Кривые, полученные для каждой клетки, усредняли и находили стандартное отклонение. Количество клеток, проанализированных в этих экспериментах, было: N = 15 для SuperNova, N = 12 для SuperNova2, N = 20 для KillerRed и N = 14 для KillerRed2.

### 3.14 Измерение скорости созревания хромофора *in vitro*

Так как созревание хромофора проходит через этап окисления (**Рисунок 3**), то измерение скорости созревания хромофора требует анаэробных условий, чтобы уловить начальные стадии созревания [34]. Мы экспрессировали фототоксичные белки в *E. coli*, используя дегазированную среду LB. 200 мкл ночной культуры клеток *E. coli* TOP10 инокулировали в 200 мл дегазированной среды LB с канамицином (50 мг/мл) в герметичной колбе объемом 500 мл. Затем колбу помещали в термостатируемый шейкер на 3 ч (37°C, 250 об/мин). Через 3 ч к культуре добавляли дегазированный раствор арабинозы до конечной концентрации 10 мМ и снова помещали колбу в шейкер еще на 20 ч. После этого герметичную колбу инкубировали в воде со льдом 30 мин. Все последующие манипуляции проводились очень быстро и на льду. Культуру клеток центрифугировали 10 мин при 4500 об/мин при 4°C. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 6 мл дегазированного PBS, pH 7,4. Разрушение клеток проводили ультразвуком с помощью ультразвукового аппарата Sonics Vibra Cell (Sonics & Materials Inc, США) (программа: 10 с – вкл., 5

с — выкл., 40 циклов, амплитуда — 30%). Затем клеточную суспензию центрифугировали с помощью Eppendorf 5415R (Eppendorf, Германия) при 13000 об/мин при 4°C в течение 10 мин. Супернатант переносили в 5 мл Eppendorf с 200 л металлоафинной смолы Talon (Takara Bio, США), уравновешенной дегазированным PBS. Пробирку встряхивали на бане с ледяной водой в течение 10 мин. После этого металлоафинную смолу с белком трижды промывали 5 мл дегазированного PBS. Затем белок элюировали 200 мкл PBS, содержащим 200 мМ ЭДТА. Концентрированный белковый раствор разделяли на две части. Одну часть разводили в 10 раз и помещали в кювету для измерения кинетики спектров поглощения, другую разбавляли в 50 раз и помещали в кювету для измерения кинетики флуоресценции. Для визуализации созревания различных форм хромофора нормализовали спектры поглощения на 280 нм — общую концентрацию белка в растворе.

### 3.15 Измерение фотостабильности флуоресцентных белков

Эксперименты по фотостабильности проводили на широкопольном инвертированном микроскопе Leica DMI6000b (Leica Microsystems, Германия), оснащенный объективом HC PL Apo 40 0,85, что позволяло визуализировать около 200 клеток в одном поле зрения. Мы использовали стабильные клеточные линии HeLa Kyoto, экспрессирующие KillerRed, SuperNova, KillerRed2, SuperNova2 с митохондриальной и мембранной локализацией. Для фотообесцвечивания использовали фильтр mCherry/TFT (возбуждение 578/21 нм, эмиссия 641/75 нм, дихроичное зеркало 596 нм (Semrock, США)). Клетки непрерывно облучали светом, проходящим через возбуждающий фильтр, в течение 10 мин. Интенсивность света над объективом в фокальной плоскости соответствовала 10 Вт/см<sup>2</sup>. Во время фотообесцвечивания камера получала изображения каждые 10 с. Используя программу ImageJ [112], было выделено несколько отдельных клеток, а значения флуоресценции были скорректированы с учетом фоновой флуоресценции. Затем значения средней флуоресценции в каждом кадре в каждой выделенной области извлекали с помощью функции Z-stack. Полученные значения флуоресценции

нормализовали на значение флуоресценции первого кадра для построения кривых и определение фотостабильности.

### 3.16 Выделение и очистка флуоресцентных белков

Для очистки рекомбинантных белков мы инокулировали 200 мкл ночной культуры клеток *E. coli* TOP10, экспрессирующих ген флуоресцентного белка, в колбу объемом 800 мл, содержащую 200 мл среды LB с канамицином (50 мг/мл). Затем колбу помещали в термостатируемый шейкер на 3 часа (37°C, 250 об/мин). Через 3 часа к культуре клеток добавляли индуктор транскрипции (арабиноза) до конечной концентрации 10 мМ, и колбу инкубировали еще 20 часов. Все последующие операции проводили на льду.

Культуру клеток центрифугировали на центрифуге Heraeus Multifuge (Thermo Fisher Scientific, США) в течение 20 мин при 4500 об/мин при 4°C. Супернатант убирали, а осадок ресуспендировали в 4 мл фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 7,4). Клетки разрушали ультразвуком на соникаторе Sonics Vibra Cell (программа: 10 с — вкл., 5 с — выкл., 40 циклов, амплитуда — 30%). Затем суспензию клеток центрифугировали с помощью 5415R (Eppendorf, Германия) при 13000 об/мин при 4°C. Супернатант переносили в чистую пробирку с 400 мкл металлоафинной смолы Talon (Takara Bio, США), уравновешенной PBS. Пробирку помещали в шейкер на 1 ч (200 об/мин, комнатная температура). После этого металлоафинную смолу несколько раз промывали PBS. Затем белок элюировали буфером PBS, содержащим 200 мМ EDTA. Далее, буфер был заменен PBS на колонках Amicon Ultra 5 кДа 0,5 мл (Merck, Германия).

### 3.17 Измерение спектров поглощения и флуоресценции

Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре Cary 100 BioUV-VIS (Agilent, США). Флуоресцентный спектрофотометр Cary Eclipse (Agilent, США) использовали для измерения спектров возбуждения и флуоресценции. Спектры белков измеряли в PBS, pH 7,4. Чтобы точно определить концентрацию белка со зрелым хромофором, мы определили общую концентрацию хромофора путем денатурации щелочью. В 0,1М NaOH и зеленая, и красная формы

DsRed-подобного хромофора переходят в одну спектральную форму, которая имеет максимум поглощения на 450 нм с коэффициентом экстинкции  $44000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [29]. Это позволяет определить долю молекул с полностью созревшим хромофором путем нормировки к общей концентрации белка, определенной по поглощению при 280 нм. Коэффициент экстинкции при 280 нм рассчитывали в программе ProtParam (ExPASy, SIB Bioinformatics Resource Portal [113]).

## 4. Результаты и обсуждение

KillerRed был первым генетически кодируемым фотосенсибилизатором, разработанным в 2006 году [6]. С тех пор были опубликованы еще несколько работ о белках, которые образуют активные формы кислорода без добавления дополнительных кофакторов: SuperNova [12] мономерный вариант KillerRed, miniSOG [10] и SOPP3 [11] – флавопротеины, которые образуют синглетный кислород при облучении синим светом, главным образом, по механизму типа II. Вместе они охватывают спектральный диапазон от 430 до 590 нм, который можно использовать для производства активных форм кислорода.

Получение новых генетически кодируемых фотосенсибилизаторов и разработка более эффективных систем контроля за внутриклеточными белками на их основе позволит существенно расширить их применение в научных исследованиях и медицине.

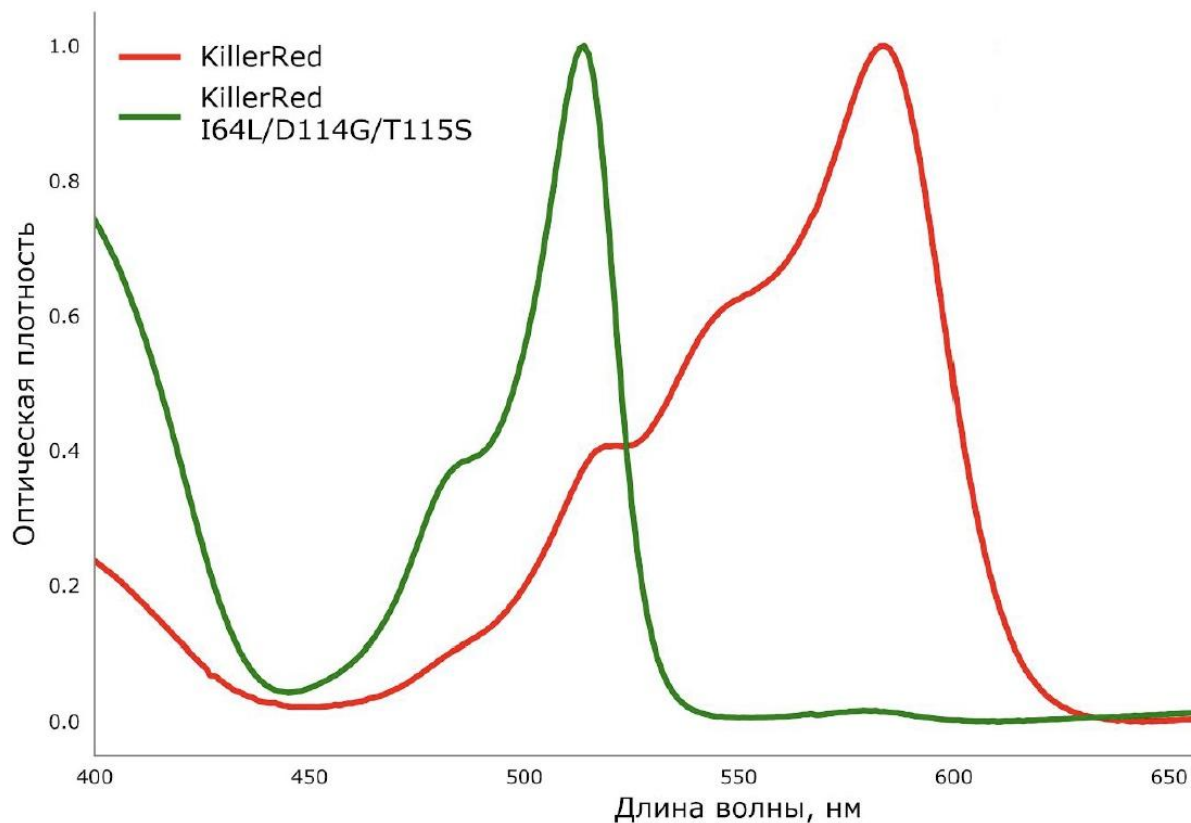
В настоящей работе были поставлены две задачи: создать новый вариант KillerRed с измененными спектрами возбуждения и эмиссии и создать вариант красного генетически кодируемого фотосенсибилизатора с увеличенной фототоксичностью.

На первом этапе работы мы планировали создать белок, который при облучении будет вырабатывать активные формы кислорода независимо от KillerRed, чтобы появилась возможность влиять на разные клеточные популяции или синхронные биологические процессы одновременно и независимо друг от друга. Такой подход, приводящий к высокой селективности, быстро развивается в ряде химических и биохимических систем [114].

Во второй части работы мы сфокусировались на изучении характеристик красных фототоксичных флуоресцентных белков KillerRed и SuperNova, которые могут влиять на их фототоксичность. Мы показали, что изменение одного из важных параметров – увеличения эффективности созревания красного хромофора – приводит к росту фототоксичности белков KillerRed и SuperNova.

#### 4.1 Создание варианта белка KillerRed, который не формирует DsRed-подобный хромофор

KillerRed обладает DsRed-подобным хромофором (**Рисунок 2**). Было показано, что белки, имеющие данный тип хромофора, проходят через зеленую или синюю переходные формы до того, как их хромофор созревает в красную форму [2]. Для получения мутанта с другим спектром поглощения, мы провели случайный мутагенез белка KillerRed, ожидая найти замену, нарушающую образование ацилиминной связи в процессе созревания хромофора, и, следовательно, образование красного хромофора. После визуального скрининга около 100 000 колоний мы обнаружили мутант KillerRed, который имел заметную зеленую флуоресценцию и очень тусклую флуоресценцию в красной части спектра. Полученный мутант содержал три аминокислотные замены, относительно исходного белка – I64L, D114G и T115S [115]. Поскольку белки с GFP-подобными хромофорами и DsRed-подобными хромофорами имеют специфические спектры поглощения, которые легко отличить друг от друга, мы выделили и очистили белок KillerRed и его мутант KillerRed I64L/D114G/T115S (**Рисунок 24**). Спектр поглощения очищенного KillerRed I64L/D114G /T115S значительно отличается от спектра поглощения KillerRed и имеет пик с максимумом при 514 нм и смещенное в синюю область спектра плечо, характерное для GFP-подобных хромофоров.

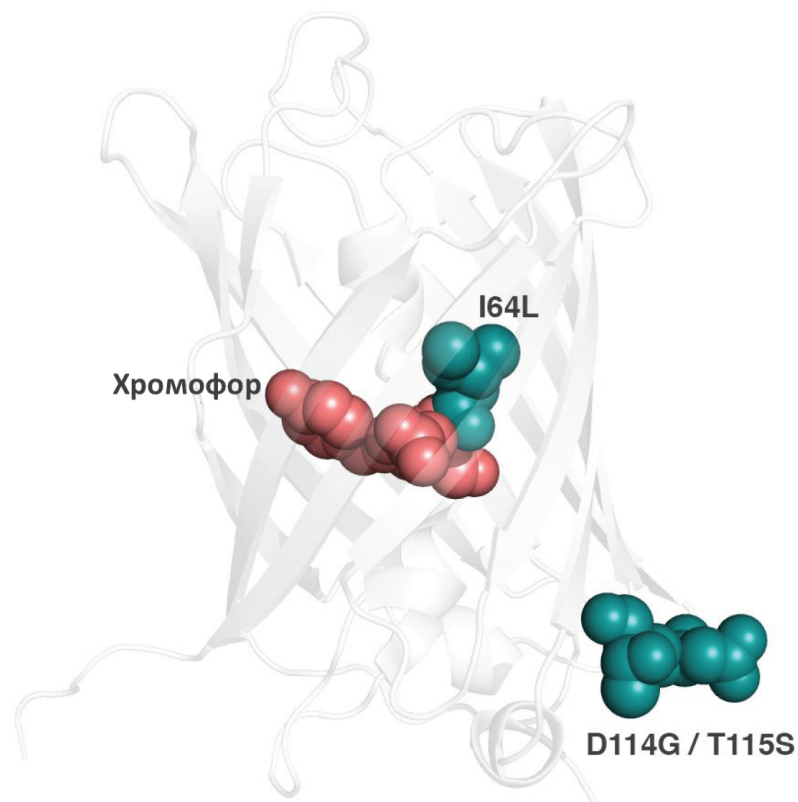


**Рисунок 24.** Спектры поглощения белков KillerRed и KillerRed I64L/D114G/T115S.

Отсутствие поглощения при 550-600 нм у KillerRed I64L/D114G/T115S указывает на то, что введенные мутации почти полностью предотвращают образование DsRed-подобного хромофора. Пик с максимумом при 514 нм и характерным плечом при 480–485 нм свидетельствует о том, что образование хромофора останавливается на стадии «классического» GFP-подобного хромофора [2].

Мутации, обнаруженные в идентифицированном нами варианте KillerRed, представляют интерес в контексте существующей литературы, посвященной мутагенезу флуоресцентных белков. В частности, мутации в положении 64 ранее были описаны, как влияющие на созревание хромофора: например, в *A. victoria* GFP мутация F64L улучшает созревание хромофора при экспрессии при 37°C [2], а в хромопротеине из *Acropora millepora* мутация S64C изменяет цвет белка [116]. Мутации D114G и T115S расположены в соседних положениях петли, соединяющей  $\beta$ -цепи 5 и 6 (**Рисунок 25**), и могут вносить вклад в адаптацию  $\beta$ -бочонка при замене изолейцина на лейцин в положении 64.





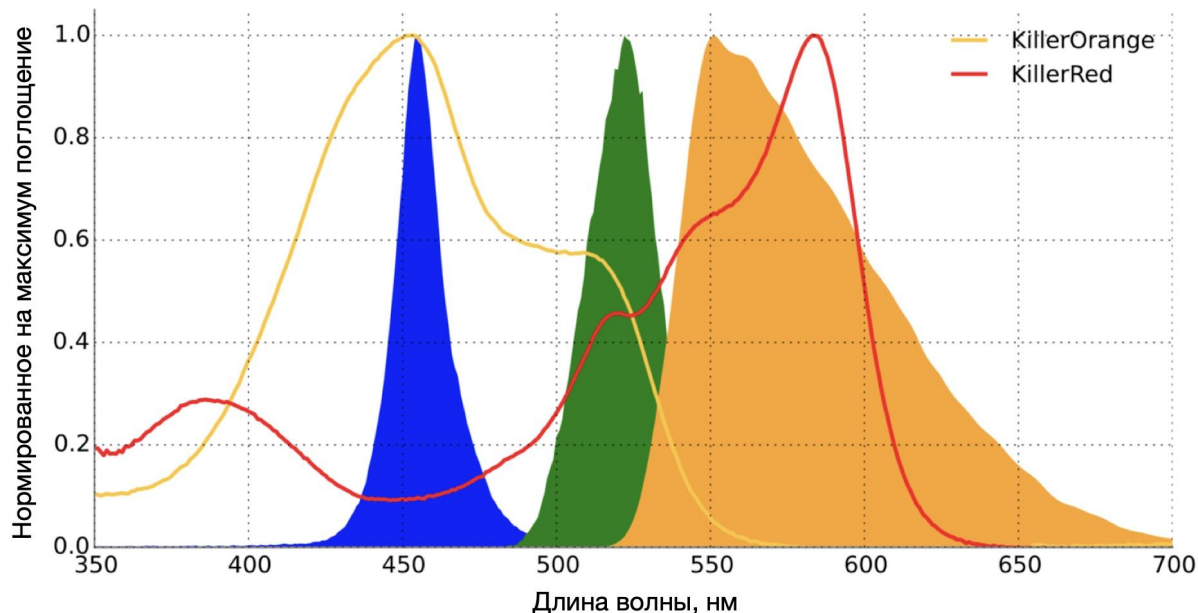
**Рисунок 25.** Расположение хромофора и мутаций I64L, D114G и T115S в структуре белка KillerRed.

Полученный мутант KillerRed I64L/D114G/T115S образует хромофор на основе тирозина, однако степень созревания его хромофора в 2,5 раза ниже, чем у KillerRed.

## 4.2 Разработка KillerOrange – оранжевого варианта белка KillerRed

После создания зеленого варианта белка KillerRed, было принято решение изменить стратегию – не менять аминокислотное окружение хромофора случайным мутагенезом, а целенаправленно заменить 66 аминокислотный остаток тирозина в хромофоре KillerRed на ароматические аминокислоты гистидин, фенилаланин и триптофан. Замены Y66H и Y66F приводили к полной потере флуоресценции KillerRed. Последующий раунд случайного мутагенеза не привел к появлению флуоресцентных клонов у данных мутантов. Мутант с заменой Y66W был слабо флуоресцентным в оранжевой области спектра, и нам удалось увеличить его яркость посредством

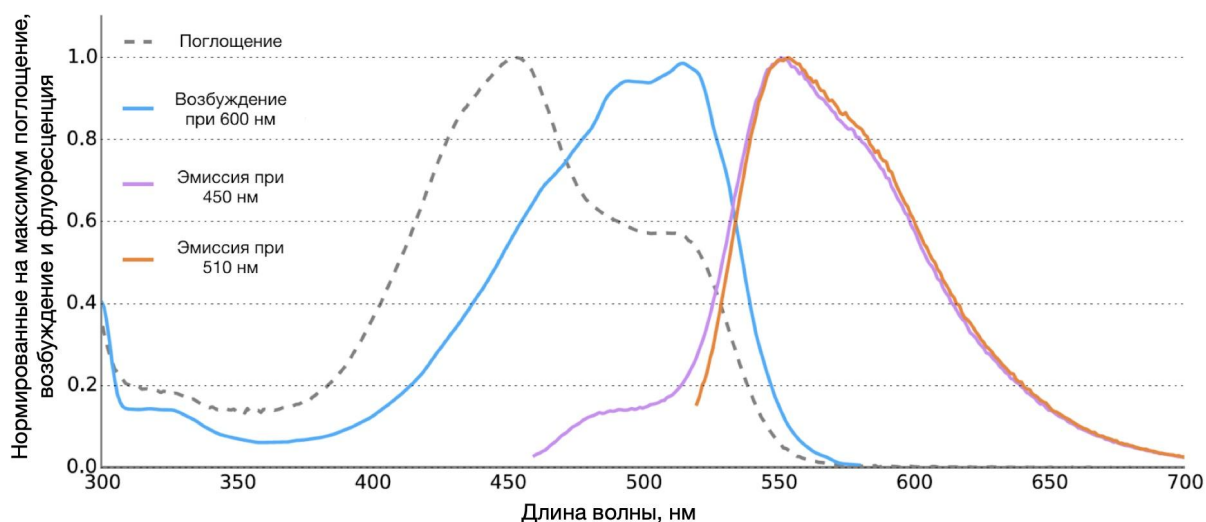
трех раундов случайного мутагенеза. Конечный мутант, несущий 7 замен (KillerRed G3C/Y66W/D113S/N145S/F177L/Y221H/E236Q), представлял собой ярко-оранжевый флуоресцентный белок с максимумом возбуждения при 512 нм и максимумом эмиссии при 555 нм (**Рисунок 26**). Мы назвали его KillerOrange.



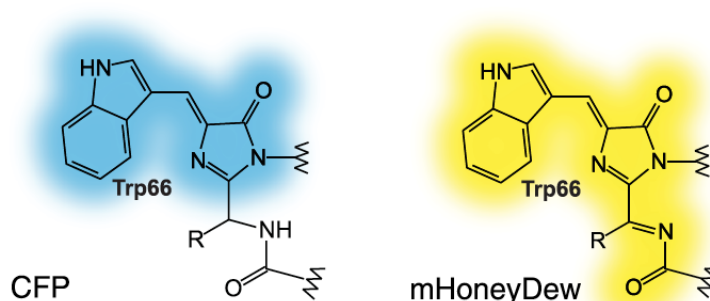
**Рисунок 26.** Спектры поглощения KillerRed и KillerOrange. Сплошной заливкой показаны спектры эмиссии диодов 450–495, 505–545 и 540–600 нм, синий, зеленый и оранжевый, соответственно.

#### 4.2.1 Спектральные характеристики KillerOrange

Спектры поглощения KillerOrange имеют два максимума при 455 и 514 нм (**Рисунок 27**), которые, вероятно, соответствуют незрелому CFP-подобному хромофору и зрелому mHoney-Dew-подобному ацилимин-содержащему хромофору на основе триптофана [117] (**Рисунок 28**). Коэффициенты экстинкции KillerOrange составляли  $41200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  при 455 нм и  $22600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  при 514 нм. Несмотря на наличие двух форм флуоресценция белка практически полностью находится в оранжевой области спектра с максимумом при 555 нм (сдвиг Стокса более 40 нм) и квантовым выходом 42%. При этом незрелая форма на 455 нм мало способствует излучению флуоресценции.

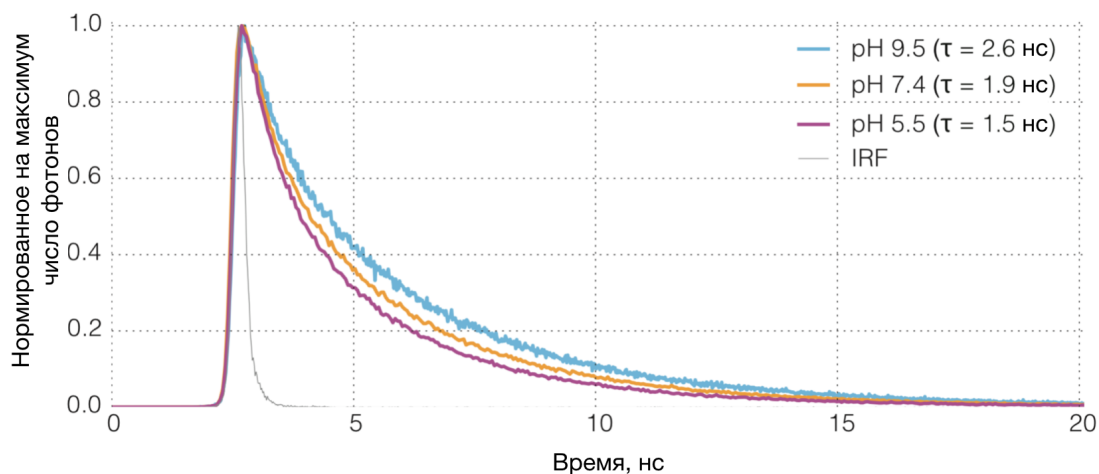


**Рисунок 27.** Спектры поглощения, возбуждения и флуоресценции белка KillerOrange.

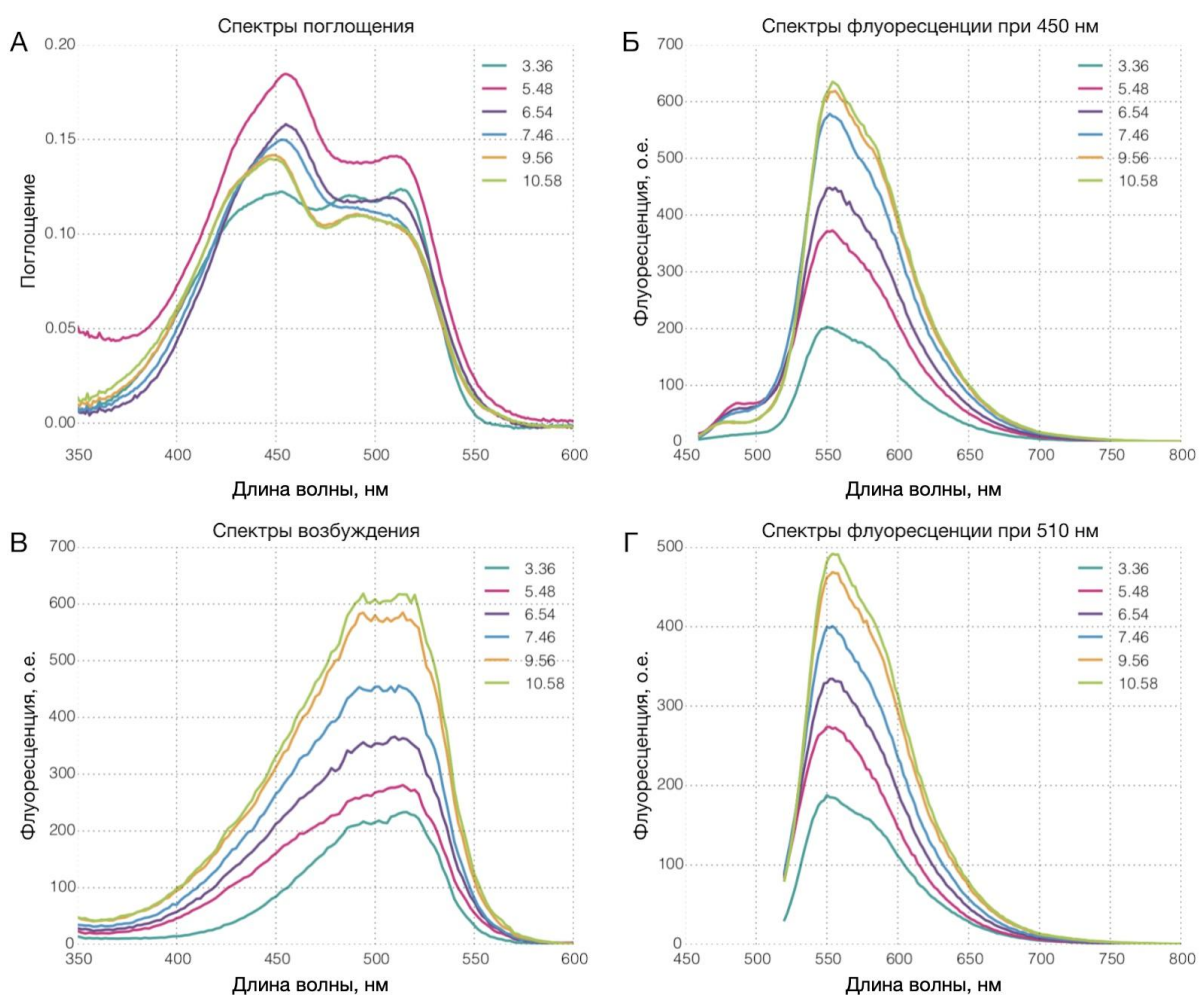


**Рисунок 28.** Структура хромофоров CFP и mHoneyDew.

Время жизни флуоресценции KillerOrange характеризуется полиэкспоненциальным затуханием и зависит от значения pH: 1,5 нс при pH 5,5, 1,9 нс при pH 7,4 и 2,6 нс при pH 9,5 (**Рисунок 29**). Как видно из pH-зависимости спектров KillerOrange (**Рисунок 30**), увеличение времени жизни флуоресценции в щелочных условиях сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции, что свидетельствует о повышении квантового выхода при увеличении pH.



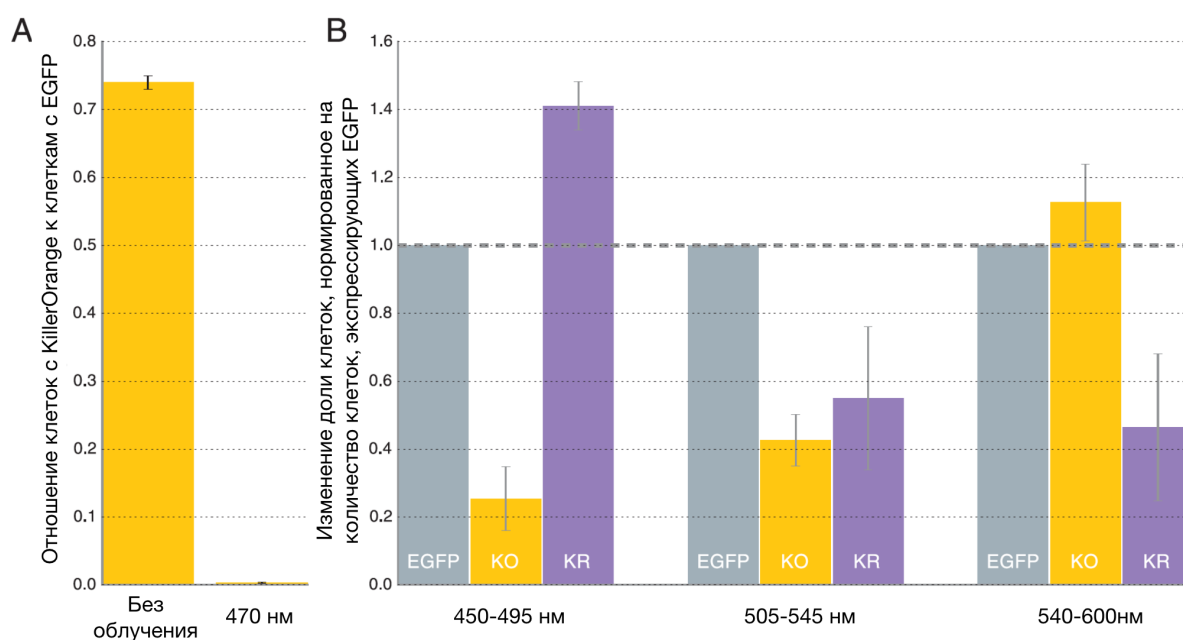
**Рисунок 29.** Зависимость времени жизни флуоресценции белка KillerOrange от pH.



**Рисунок 30.** (А) Зависимость спектров поглощения белка KillerOrange от pH; (Б) Спектры флуоресценции при возбуждении светом 450 нм; (В) Спектры возбуждения при детекции флуоресценции 610 нм; (Г) Спектры флуоресценции при возбуждении светом 510 нм.

## 4.2.2 Определение фототоксичности KillerOrange

Для оценки фототоксичности KillerOrange при различных условиях освещения мы проводили тест на фототоксичность с использованием методики подсчета колониеобразующих единиц. Используя синий свет с высокой степенью интенсивности (470/20 нм, 1 Вт / см<sup>2</sup>), мы обнаружили, что клетки, экспрессирующие KillerOrange, практически полностью погибают в результате 60-секундного облучения (уменьшение в 222 раза) (**Рисунок 31, А**), что подтверждает высокий уровень фототоксичности белка KillerOrange.



**Рисунок 31.** (А) Облучение синим светом 470/20 нм приводит к избирательному уничтожению бактериальных клеток, экспрессирующих KillerOrange, в смеси с клетками, экспрессирующими EGFP. (В) Токсичность KillerOrange (KO) и KillerRed (KR) при облучении светом разных длин волн.

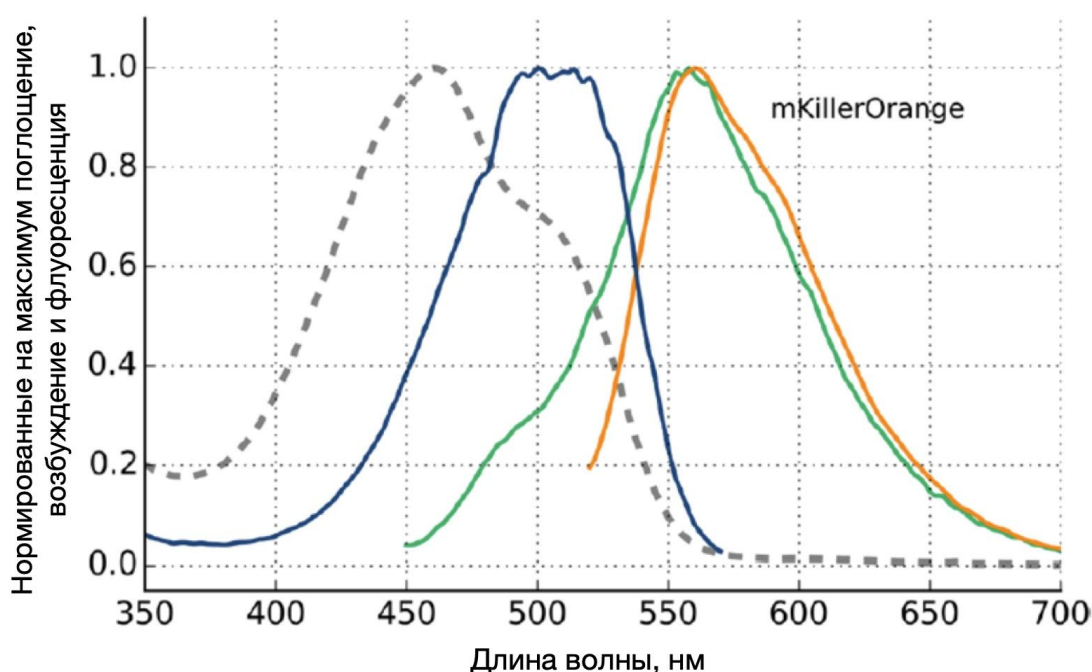
Для проверки возможности независимого использования KillerOrange и KillerRed мы провели аналогичный эксперимент с тремя белками (**Рисунок 31, В**). Мы смешивали три популяции клеток *E. coli*, по отдельности экспрессирующие белки KillerOrange, EGFP и KillerRed. Мы облучали аликвоты суспензии клеток светом 450–495, 505–545 и 540–600 нм (спектры светодиодов показаны на **Рисунке 26**). Облучение светом 540–600 нм приводило к селективному уничтожению клеток, экспрессирующих KillerRed, тогда как облучение светом 450–495 нм убивало большинство клеток, экспрессирующих

KillerOrange. Интересно, что облучение светом с длиной волны 505-545 нм было почти одинаково эффективным при уничтожении клеток KillerOrange и KillerRed.

Таким образом, мы показали, что, комбинируя различные источники света, можно добиться точного контроля над клеточными популяциями, экспрессирующими KillerOrange и KillerRed.

### 4.2.3 Создание мономерного варианта KillerOrange

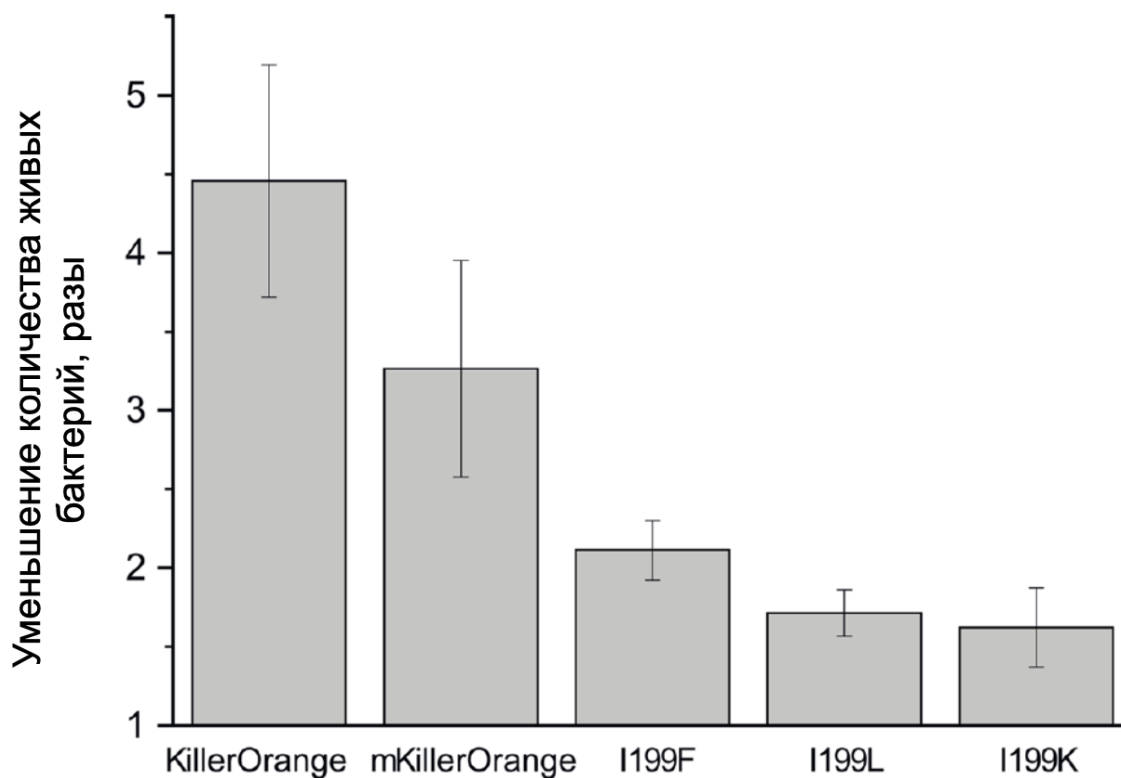
Мы также создали мономерный mKillerOrange путем введения единственной замены Y66W в белок SuperNova [15]. Интересно, что полученный белок имел практически такие же спектры поглощения и флуоресценции (**Рисунок 32**), как и KillerOrange, но при этом не содержал дополнительных замен. К сожалению, mKillerOrange в клетках бактерий обладал меньшей фототоксичностью, чем KillerOrange (**Рисунок 32**). Это ожидаемо, учитывая невысокую фототоксичность белка SuperNova и отсутствие мутаций, которые компенсировали бы негативный эффект от введения объемного остатка триптофана в 66 положение.



**Рисунок 32.** Спектры поглощения, возбуждения и флуоресценции белка mKillerOrange. Обозначения: пунктир – спектр поглощения, зеленый – спектр флуоресценции при возбуждении на 440 нм, оранжевый – спектр флуоресценции при возбуждении на 510 нм, синий – спектр возбуждения при детекции флуоресценции на 580 нм.

На основе полученных нашими коллегами кристаллических структур мы решили провести сайт-направленный мутагенез, чтобы идентифицировать аминокислотные остатки, ответственные за фототоксичность KillerOrange и mKillerOrange. Глутамин в 159 положении и треонин в 201 были идентифицированы как сайты, влияющие на равновесие транс-цис- и цис-цис-конформаций триптофана 66 в хромофоре. Также в более раннем исследовании KillerRed [5] было показано, что глутамат в 68 положении, расположенный сразу после хромофора, влияет на фототоксичность белка (**Рисунок 13**). Поэтому мы создали мутанты со следующими одиночными заменами: Q159G и E68Q в KillerOrange и T201A в mKillerOrange. К сожалению, все три мутации привели к неспособности белков к формированию зрелого хромофора, что затрудняет вывод о конкретной роли этих остатков в фототоксичности и флуоресценции KillerOrange и mKillerOrange.

Мы также применили сайт-направленный мутагенез, чтобы заблокировать водный канал, который, как считается, имеет решающее значение для образования активных форм кислорода. Замена I199F и I199L в KillerOrange привела к значительной потере фототоксичности (**Рисунок 33**), в то время как спектральные свойства соответствующих мутантов были довольно сходны со спектральными свойствами KillerOrange (**Таблица 1**).



**Рисунок 33.** Уменьшение количества жизнеспособных бактерий после облучения синим светом *E.coli*, экспрессирующих данные флуоресцентные белки.

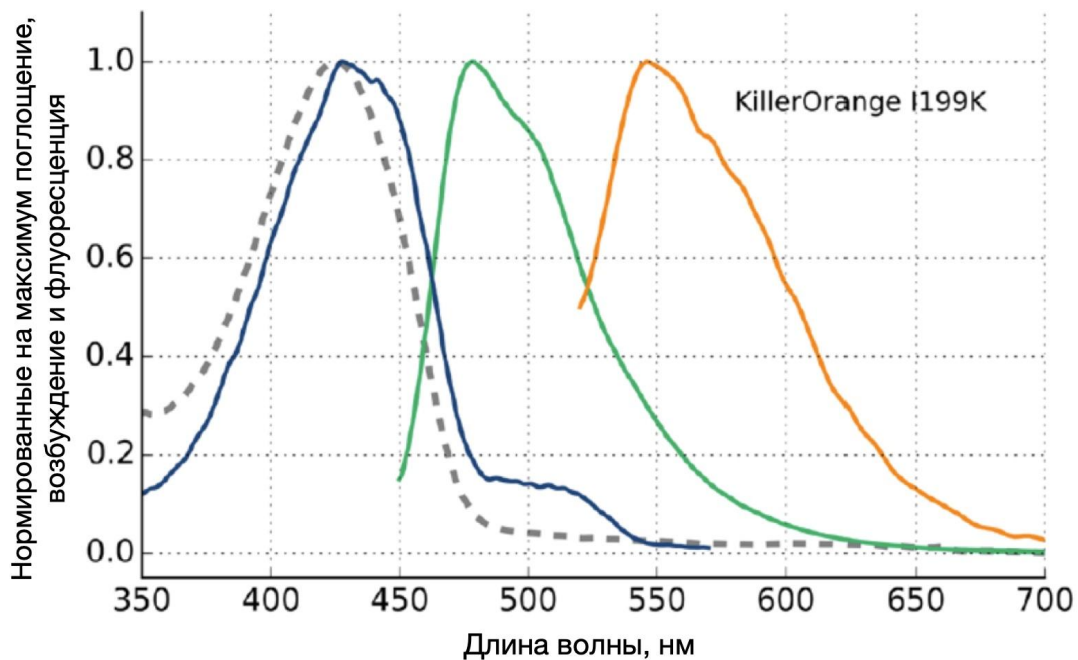
**Таблица 1.** Спектральные характеристики KillerOrange и его мутантов.

	KillerOrange	mKillerOrange	KillerOrange I199F	KillerOrange I199L	KillerOrange I199K
<b>Поглощение, нм (ЕС<sup>a</sup>)</b>	452 (35000)	458 (35000)	452 (29000)	450 (42000)	450 (43000)
<b>ЕС при 514 нм</b>	19000	20000	8000	23000	600
<b>Циановая эмиссия, нм</b>	~480 нм (плечо)	~480 нм (плечо)	~480 нм (плечо)	~480 нм (плечо)	478 нм (основной пик)
<b>Оранжевая эмиссия, нм</b>	555 нм (основной пик)	560 нм (основной пик)	563 нм (основной пик)	555 нм (основной пик)	545 нм (плечо)
<b>Квантовый выход, при возбуждении на 510 нм</b>	0.42	0.50	0.75	0.87	0.85

<sup>a</sup> ЕС – коэффициент экстинкции, М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>

Удивительно, но замена изолейцина 199 на положительно заряженный объемный лизин привела к появлению низкофототоксичного белка с преимущественно циановой флуоресценцией (**Рисунок 34, Таблица 1**).





**Рисунок 34.** Спектры поглощения, возбуждения и флуоресценции белка KillerOrange I199K. Обозначения: Пунктир – спектр поглощения, зеленый – спектр флуоресценции при возбуждении на 440 нм, оранжевый – спектр флуоресценции при возбуждении на 510 нм, синий – спектр возбуждения при детекции флуоресценции на 580 нм.

Другие мутанты – A82S, I199M и I199R – имели тусклую оранжевую флуоресценцию и демонстрировали очень низкую скорость созревания, что не позволяло проводить прямое сравнение их фототоксичности с фототоксичностью родительского KillerOrange.

Результаты мутагенеза показали, что введение объемных остатков фенилаланина и лейцина в 199 положение прерывает цепь из молекул воды в водном канале, что приводит к снижению фототоксичности мутантов – предположительно, за счет замедления продукции активных форм кислорода. Все протестированные мутанты I199F/L/K обладали заметно более высоким квантовым выходом оранжевой флуоресценции, по сравнению с родительским белком (**Таблица 1**), что свидетельствует о том, что объемные остатки в положении 199 могут ограничивать свободу движений хромофора, подавляя его безызлучательный переход.

## 4.3 Увеличение фототоксичности белков SuperNova и KillerRed

Одной из важных особенностей фотосенсибилизаторов является их олигомерная структура. Обычно предпочтительны мономерные фотосенсибилизаторы, так как они могут быть слиты с другими белками для направленной доставки активных форм кислорода без образования олигомерных структур и нарушения нормальной физиологии клеток [7,118]. Так, в результате мутагенеза димерного фототоксического красного флуоресцентного белка KillerRed был создан мономерный фотосенсибилизатор под названием SuperNova [12]. Однако в наших экспериментах фототоксичность SuperNova была недостаточной для большинства применений. Поэтому мы решили провести случайный мутагенез белка SuperNova, найти мутации, которые увеличивают фототоксичность данного белка, и проверить, как найденные мутации влияют на фототоксичность белка KillerRed.

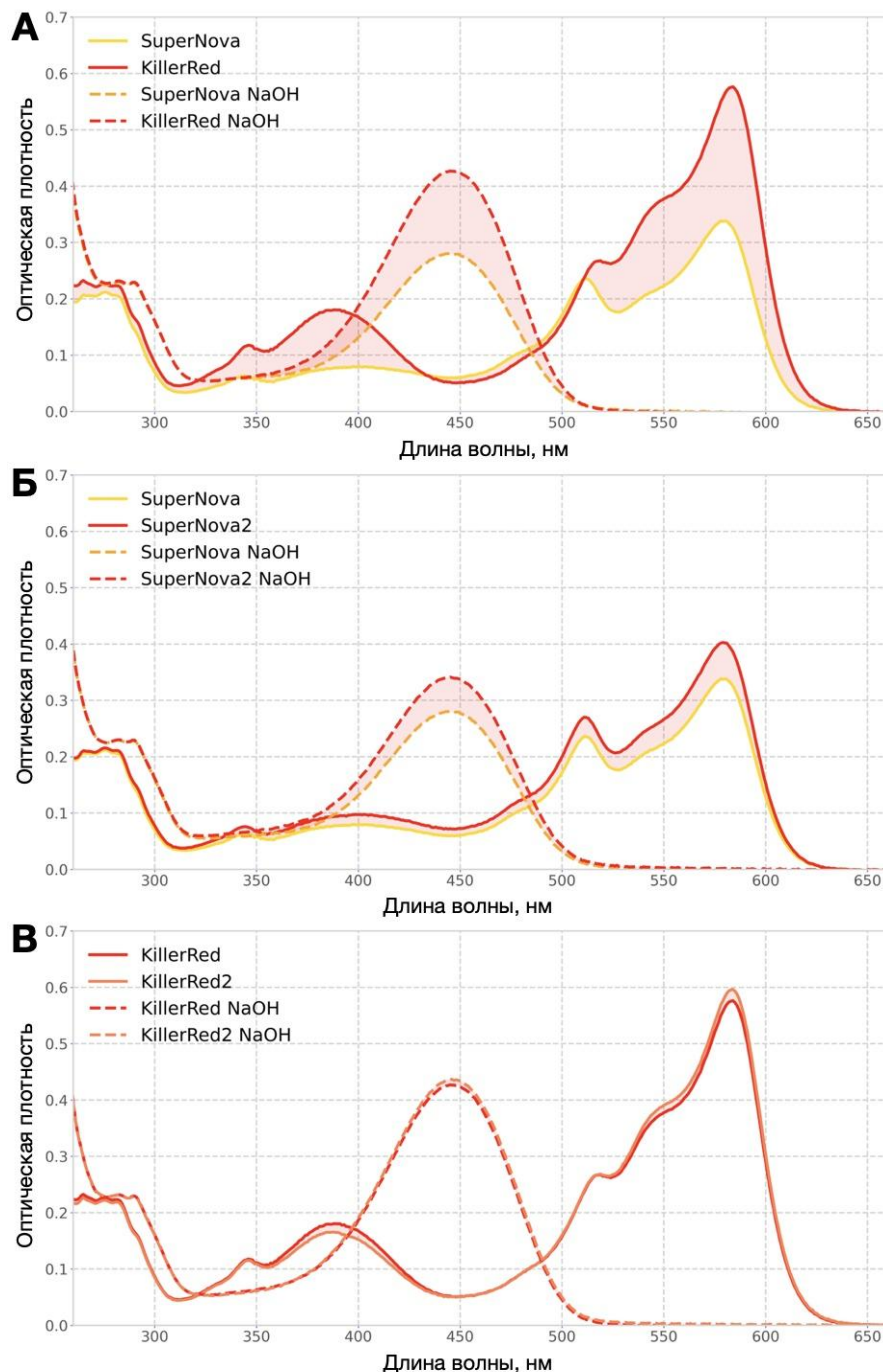
Направленная эволюция фототоксичности флуоресцентных белков является сложной задачей, частично из-за недостаточного понимания ее структурных детерминант, но в значительной степени из-за отсутствия подходящего высокопроизводительного метода скрининга. Ни один из существующих фототоксических флуоресцентных белков семейства GFP не был улучшен методами направленной эволюции, будь то рациональный дизайн или случайный мутагенез.

При работе с KillerRed и KillerOrange мы заметили, что фототоксичность данных белков повышалась с увеличением возраста бактерий. Мы предположили, что причиной роста фототоксичности является увеличение фракции полностью созревшего белка. Известно, что красные флуоресцентные белки образуют свои хромофоры в результате многоступенчатого процесса окисления с несколькими возможными конечными продуктами. В KillerRed, только красная форма хромофора отвечает за генерацию активных форм кислорода [5,82]. Это могло бы объяснить наблюдаемую связь между возрастом бактериальных колоний и фототоксичностью.

Мы решили проверить наше предположение и найти мутантов SuperNova и KillerRed с улучшенной эффективностью сворачивания и скоростью созревания хромофора и, возможно, с повышенной фототоксичностью.

### 4.3.1 Мутация S10R в белках SuperNova и KillerRed приводит к увеличению эффективности созревания красного хромофора

На первом этапе работы мы решили определить, какой процент молекул SuperNova и KillerRed формируют хромофор. Для этого мы выделили и очистили данные белки и денатурировали их в щелочи. При щелочной денатурации Ds-Red подобных белков происходит преобразование как зеленой, так и красной формы хромофора в один и тот же спектральный вид [29]. По соотношению белка, содержащего хромофор, и общего количества белка можно судить об эффективности образования хромофора. По данным, полученными при анализе спектров поглощения белков SuperNova и KillerRed в щелочных условиях (**Рисунок 35, А**), используя формулу Бугера-Ламберта-Бера  $A = \epsilon c l$ , которая описывает связь поглощения ( $A$ ), коэффициента экстинкции ( $\epsilon$ ) и концентрации ( $c$ ) мы определили, что доля молекул со зрелым хромофором оказалась низкой. Общую концентрацию белка и концентрацию белка, содержащего хромофор, определяли исходя из значений оптической плотности при 280 нм ( $\epsilon = 11460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [113]) и 455 нм ( $\epsilon = 44000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [29]), соответственно (**Рисунок 35, А**). Оказалось, что только 35% молекул белка SuperNova и около 50% молекул белка KillerRed содержат хромофор, что указывает на возможность значительного улучшения этих белков путем направленной эволюции.

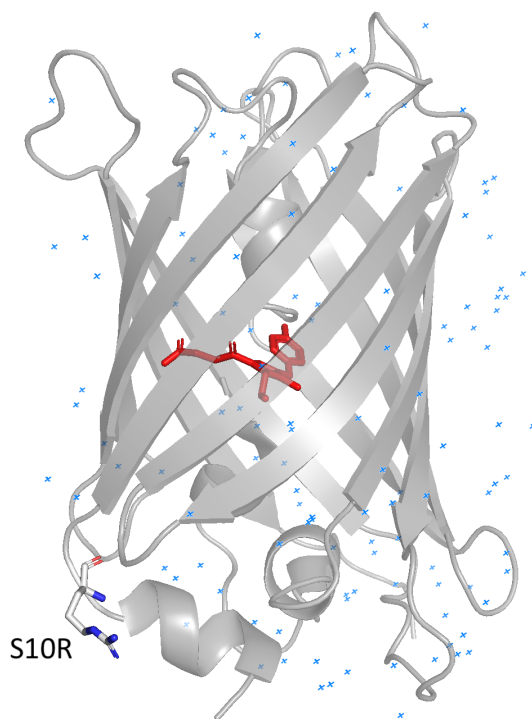


**Рисунок 35.** Спектры поглощения нативных и денатурированных щелочью белков SuperNova, SuperNova2, KillerRed и KillerRed2: (А) Спектры поглощения KillerRed и SuperNova в нативном виде и при денатурации в 1М NaOH; (Б) Сравнение спектров поглощения SuperNova и SuperNova2 в нативном виде и при денатурации в 1М NaOH; (В) Сравнение спектров поглощения KillerRed и KillerRed2 в нативном виде и при денатурации в 1М NaOH.

Так как только красная форма хромофора ответственна за фототоксичность, увеличение эффективности созревания должно привести к увеличению фототоксичности. В качестве модели для направленной эволюции, мы решили выбрать белок SuperNova, так как этот белок имеет относительно

низкие яркость, степень созревания хромофора и фототоксичность. Мы предположили, что при скрининге библиотеки мутантов SuperNova на яркость, мы сможем отобрать более эффективно созревающие мутанты SuperNova, которые будут более фототоксичны, чем исходный вариант.

Мы создали библиотеку мутантов белка SuperNova и провели скрининг на яркость в клетках *E. coli*. Среди отобранных мутантов один клон имел значительно улучшенную яркость, более чем в три раза превышающую яркость исходного белка. Он отличался от исходного белка одной заменой S10R. Полученный мутант был назван SuperNova2. Введение этой же мутации в KillerRed привело к варианту KillerRed S10R, который мы назвали KillerRed2. Мутация S10R расположена на первой петле, соединяющей N-концевую  $\alpha$ -спираль и первый  $\beta$ -слой (**Рисунок 36**).

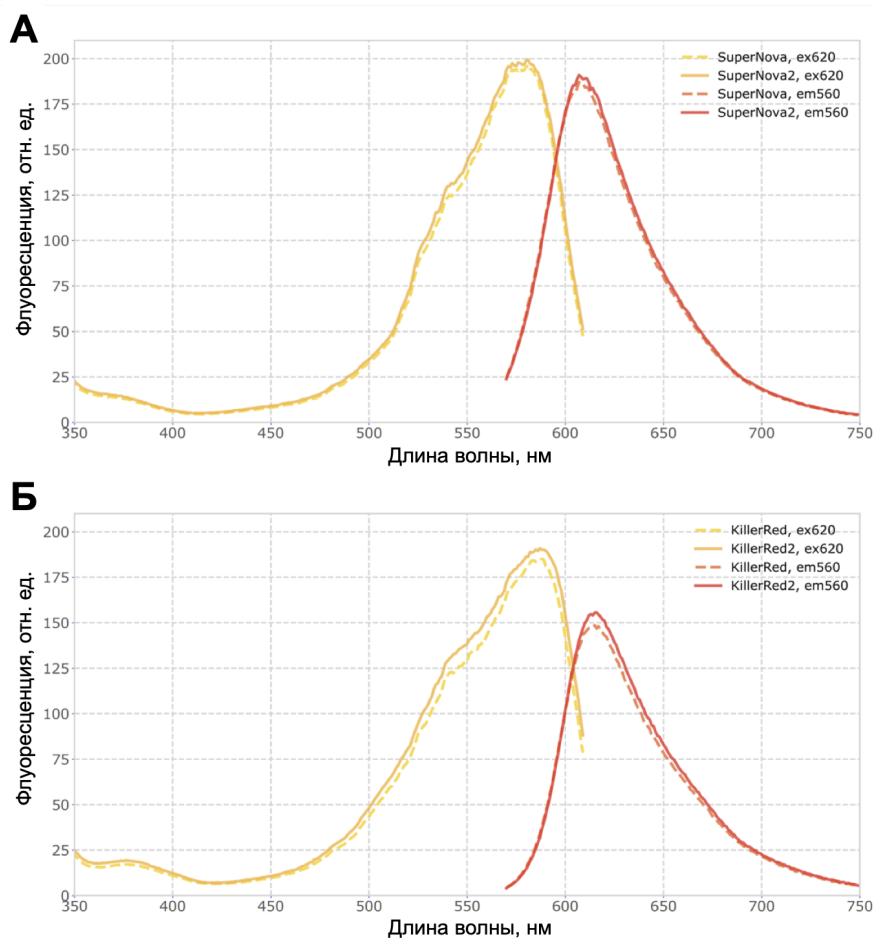


**Рисунок 36.** Модель белка SuperNova с заменой S10R.

#### 4.3.2 Спектральные характеристики SuperNova2 и KillerRed2

Известно, что мутации в петлях между  $\beta$ -слоями в флуоресцентных белках в значительной степени влияют на их сворачивание и яркость [119], что может объяснять вероятный механизм действия мутации S10R. Мы проанализировали долю зрелого хромофора и обнаружили, что в SuperNova2

она увеличилась на 20% по сравнению с SuperNova (**Рисунок 35, Б**), в то время как в KillerRed2 она практически не изменилась (**Рисунок 35, В**). Спектры поглощения очищенных белков (**Рисунок 35, Б, В**) показали, что в обоих мутантах мутация S10R привела к небольшому снижению содержания зеленой формы хромофора и снижению содержания синей формы хромофора у KillerRed2. При этом спектры возбуждения и эмиссии полученных мутантов были аналогичны родительским белкам, как и коэффициент экстинкции и квантовый выход (**Рисунок 37**).



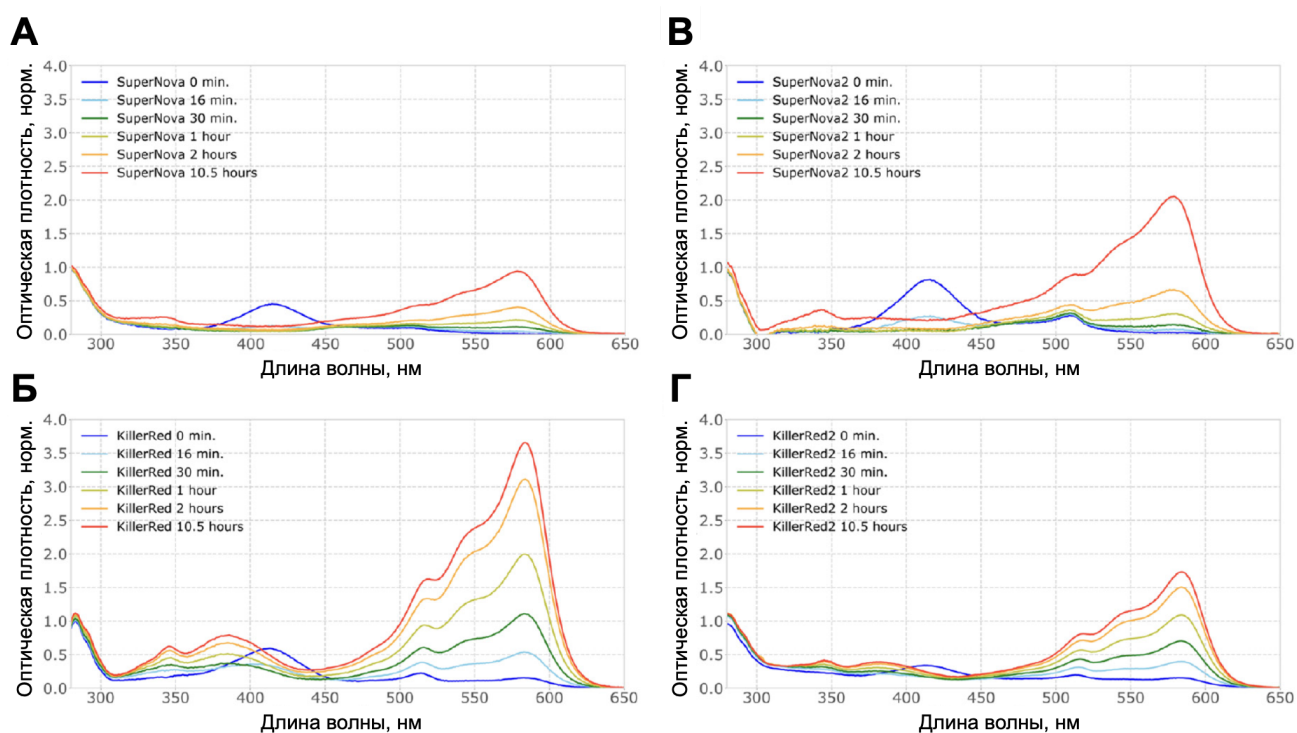
**Рисунок 37.** Спектры возбуждения (эмиссия при 620 нм) и эмиссии (возбуждение при 560 нм) очищенных белков (А) SuperNova и SuperNova2; (Б) KillerRed и KillerRed2.

### 4.3.3 Созревание белков SuperNova2 и KillerRed2 *in vitro*

Дополнительно мы провели эксперименты по определению кинетики созревания белков *in vitro* (**Рисунок 38**), что позволило проследить за

изменением синей, зеленой и красной форм хромофора во время созревания белков SuperNova, KillerRed и их мутантов.

По полученным данным можно сделать вывод, что увеличение эффективности созревания красного хромофора SuperNova2 достигается как за счет увеличения эффективности образования синей формы хромофора, так и за счет более эффективного перехода из синей формы хромофора в красную (**Рисунок 3**). Так, синей формы хромофора у SuperNova2 образуется в 1,5 раза больше, чем у SuperNova (**Рисунок 38, А, В**), а зрелого красного хромофора больше в два раза, что подтверждает увеличение эффективности созревания хромофора SuperNova2. Интересно, что для KillerRed2 данные по полноте созревания хромофора в эксперименте по определению кинетики созревания отличаются от данных, полученных на белках, выделенных из бактерий, что, вероятно, отражает разницу в условиях созревания белков, таких, как температура и рН.



**Рисунок 38.** Кинетика спектров поглощения, демонстрирующая созревание хромофора *in vitro* для белков: (А) SuperNova; (Б) KillerRed; (В) SuperNova2; (Г) KillerRed2. Спектры нормированы на поглощение при 280 нм.

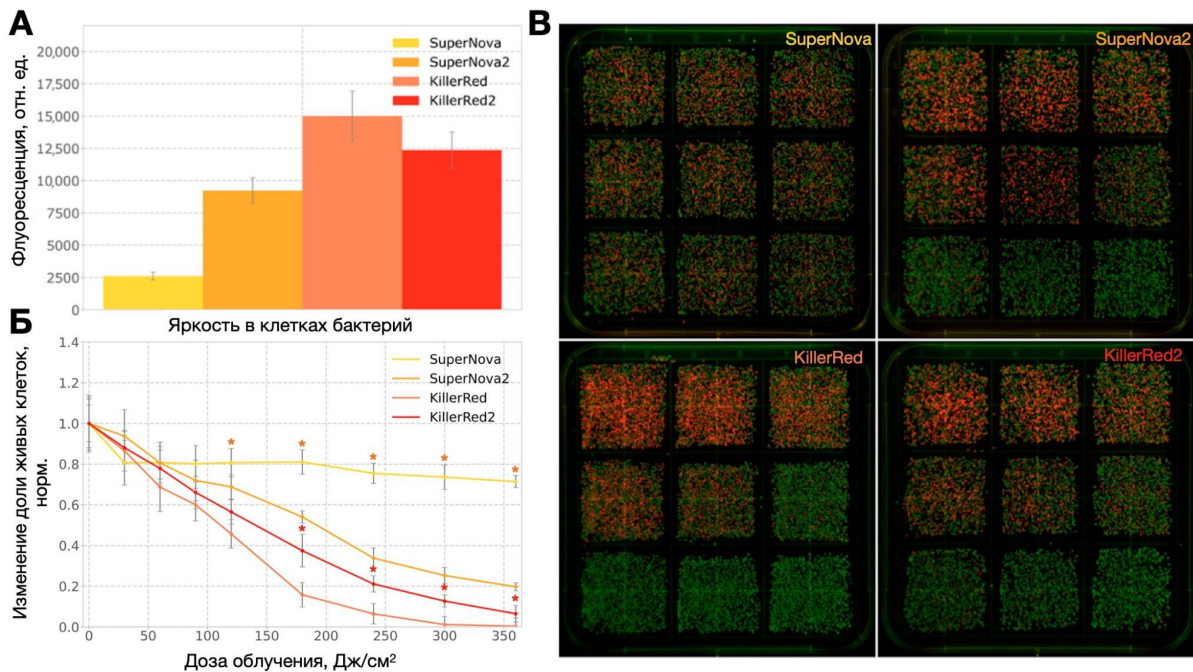
#### 4.3.4 Измерение фототоксичности белков SuperNova2 и KillerRed2 в бактериях

Мы решили выяснить, как мутация S10R влияет на яркость и фототоксичность белков KillerRed и SuperNova внутри клеток бактерий. У бактериальных колоний, экспрессирующих SuperNova2, яркость была более чем в четыре раза выше чем у бактерий, экспрессирующих SuperNova. В то же время KillerRed2 был немного более тусклым, чем исходный белок (**Рисунок 39**).

Фототоксичность в бактериях измеряли путем оценки изменения соотношения красных и зеленых клеток в смеси бактерий, экспрессирующих фототоксичный белок, и бактерий, экспрессирующих EGFP. Эксперименты проводили после 20 ч инкубации при 37°C и последующих 24 ч при комнатной температуре. Вкратце, мы смешали клетки *E. coli*, экспрессирующие GFP, и *E. coli*, экспрессирующие фототоксичный белок, в соотношении 1:1, и полученную смесь бактерий облучали оранжевым светом в течение разных промежутков времени. Затем облученные клетки высевали на чашку Петри. На следующий день подсчитывали зеленые и красные колонии и рассчитывали фототоксичность по изменению соотношения красных и зеленых колоний.

SuperNova2 продемонстрировал значительно более высокую фототоксичность, чем SuperNova, с почти 4-кратной разницей в количестве мертвых клеток, наблюдаемых после шести минут облучения (350 Дж/см<sup>2</sup>) (**Рисунок 39**), в то время как фототоксичность KillerRed2 была немного ниже, чем у KillerRed. Интересно, что когда эксперимент проводили без 24-часовой инкубации при комнатной температуре, SuperNova не обладал фототоксичным эффектом, а фототоксичность KillerRed и KillerRed2 была незначительно выше фототоксичности SuperNova2 (**Рисунок 40**). Это также указывает на то, что мутация S10R улучшает созревание белка SuperNova.

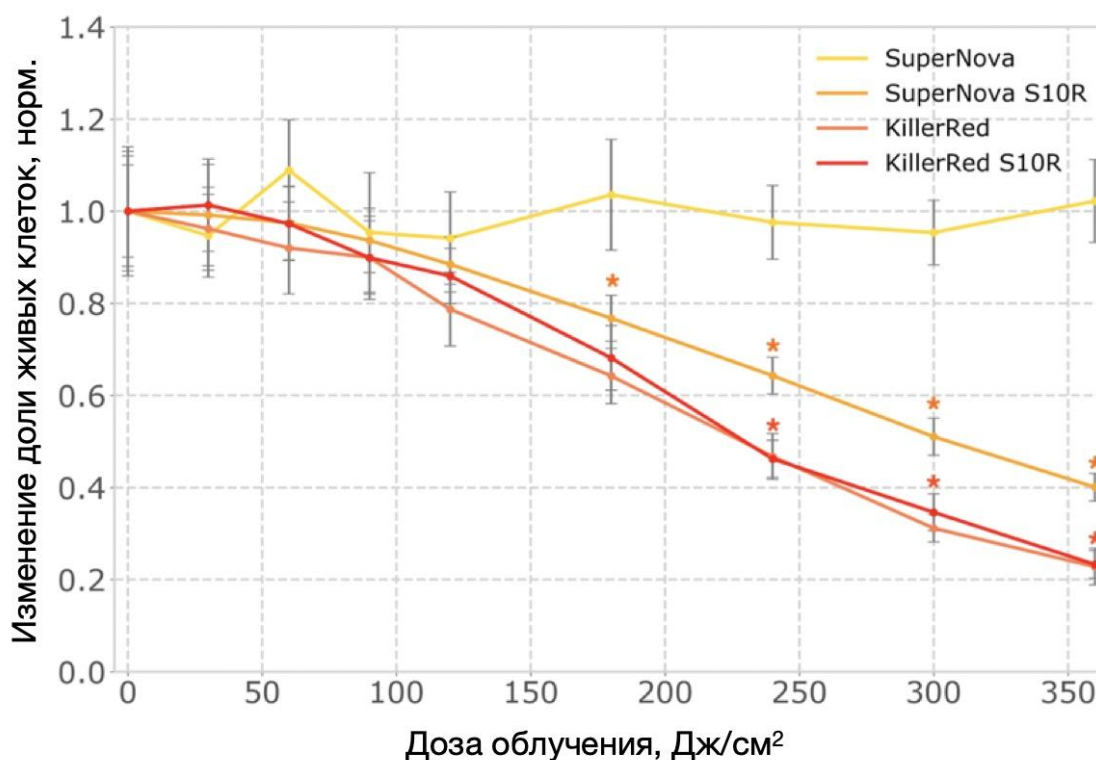




**Рисунок 39.** Экспрессия фототоксичных флуоресцентных белков в бактериях: (А) Яркость в клетках бактерий после инкубации в течение 20 часов при 37°C и 24 часов при комнатной температуре; (Б) Фототоксичность SuperNova, SuperNova2, KillerRed и KillerRed2 в клетках бактерий; (С) Фотографии чашек Петри с бактериальными колониями, экспрессирующими EGFP и один из фотосенсибилизаторов, после эксперимента по фототоксичности. Каждый квадратный участок на чашке представляет собой временную точку (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5 и 6 мин, что эквивалентно дозе облучения 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 и 360 Дж/см<sup>2</sup>. Порядок слева направо и сверху вниз). Ориентировочные значения дозы облучения, необходимые для уничтожения 50% клеток, показаны цветом на оси X на рисунке Б. \* - p-value < 0.05

Статистически значимые различия при сравнении значений фототоксичности SuperNova и SuperNova2, \* - p-value < 0.05

Статистически значимые различия при сравнении значений фототоксичности KillerRed и KillerRed2.

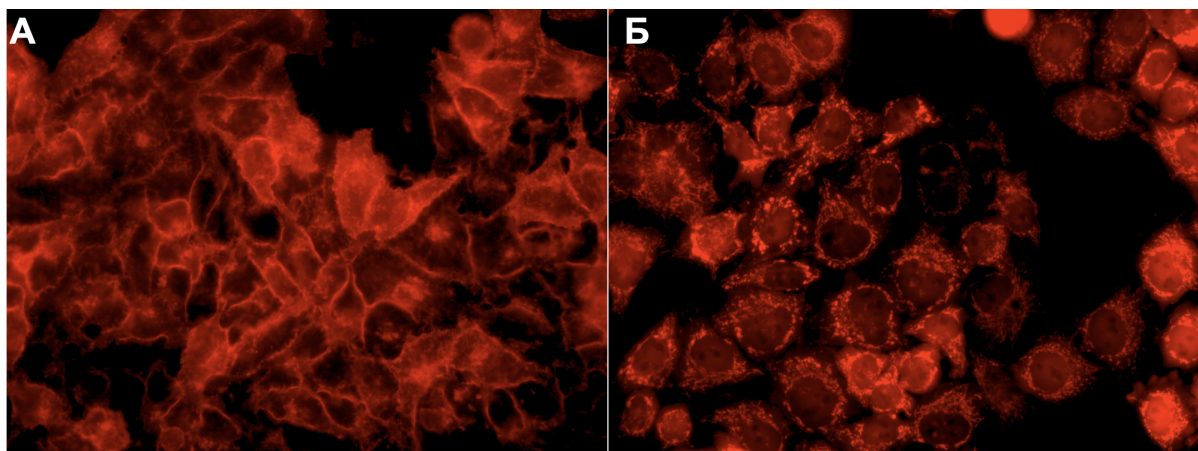


**Рисунок 40.** Фототоксичность SuperNova, SuperNova2, KillerRed и KillerRed2 в бактериях (эксперимент проводили после 20-часовой инкубации при 37 °С без дополнительной инкубации при комнатной температуре). \* - p-value < 0.05 Статистически значимые различия при сравнении значений фототоксичности SuperNova и SuperNova2, \* - p-value < 0.05 Статистически значимые различия при сравнении значений фототоксичности KillerRed и SuperNova2.

#### 4.3.5 Измерение фототоксичности белков SuperNova2 и KillerRed2 в клетках млекопитающих

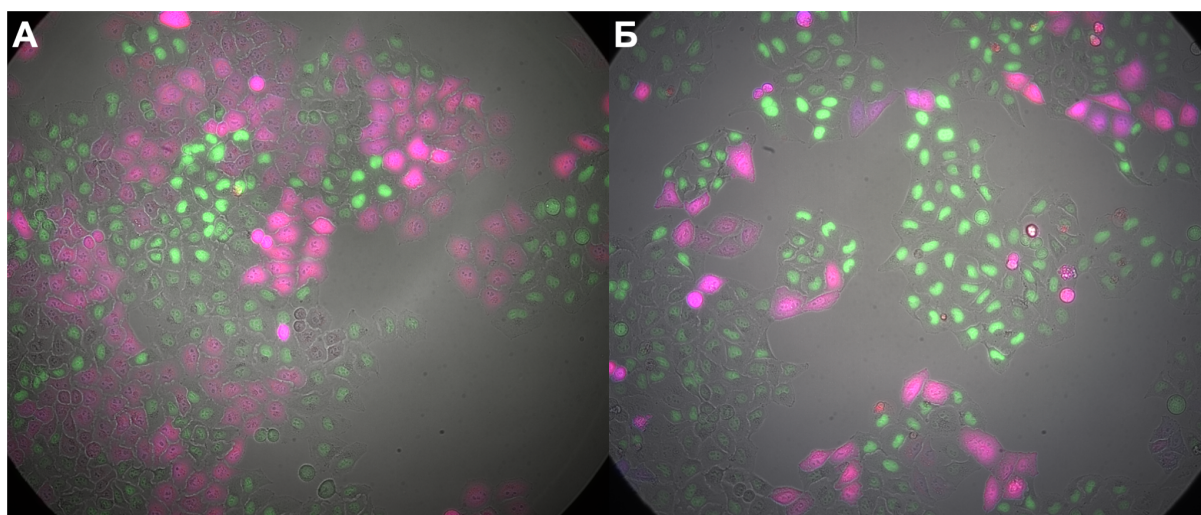
Мы также сравнили фототоксичность SuperNova, SuperNova2, KillerRed и KillerRed2 в культуре клеток млекопитающих. Одним из эффективных способов достижения фототоксического эффекта в клетках является направление фотосенсибилизатора в митохондрии или в плазматическую мембрану клетки. Для этого мы создали стабильные линии клеток HeLa Kyoto (**Рисунок 41, 42**), экспрессирующих один из фототоксичных белков с сигналами мембранной или митохондриальной локализации, соединенный с TagBFP2 через саморазрезающийся T2A пептид [120]. TagBFP2 использовался в качестве референса, на который производили нормировку уровня экспрессии трансгена,

чтобы исключить влияние разного уровня экспрессии на фототоксичность. Поэтому синяя флуоресценция референсного TagBFP2 использовалась при сортировке клеток, чтобы получить стабильные линии клеток с одинаковым уровнем экспрессии фотосенсибилизатора (**Рисунок 22**).



**Рисунок 41.** Стабильные линии клеток HeLa Kyoto, экспрессирующие (А) SuperNova2 с мембранной локализацией и (Б) SuperNova2 с митохондриальной локализацией.

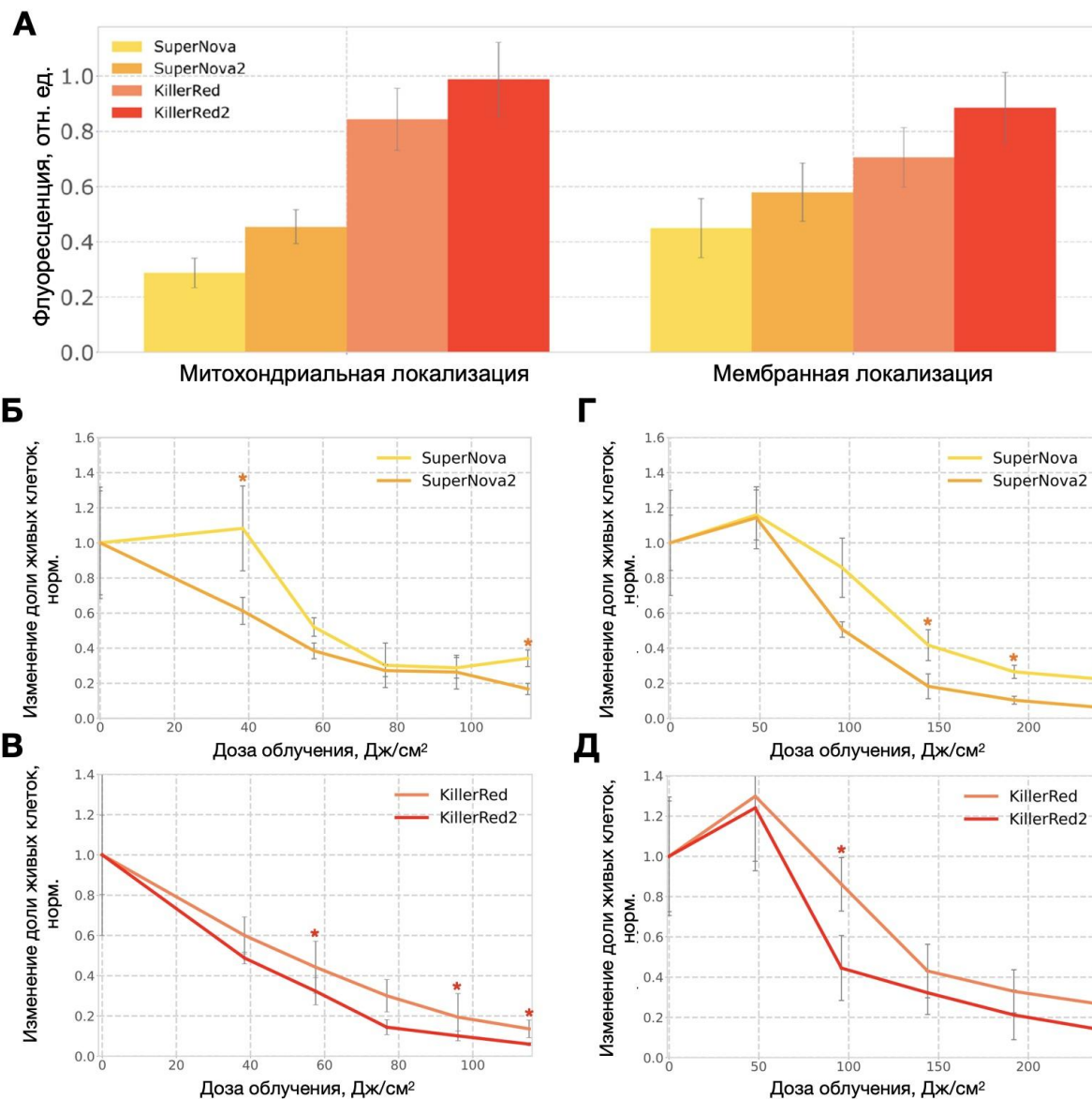
Широкопольный микроскоп, красный флуоресцентный канал.



**Рисунок 42.** Популяции клеток линии HeLa Kyoto, экспрессирующих фототоксичный флуоресцентный белок SuperNova2 с митохондриальной локализацией с референсным белком TagBFP2, соединенный через T2A пептид, и EGFP с ядерной локализацией. (А) Необлученная светом популяция клеток, с практически равным соотношением клеток с SuperNova2 и EGFP; (Б) Облученная светом популяция клеток (доза облучения 115 Дж/см<sup>2</sup>), в которой соотношение клеток с SuperNova2 и EGFP изменилось в пользу клеток с EGFP. Широкопольный микроскоп, совмещенное изображение из четырех каналов: проходящий свет, синий, зеленый и красный флуоресцентные каналы.

В отличие от бактерий (**Рисунок 39, А**) в клетках млекопитающих и SuperNova2, и KillerRed2 были немного ярче, чем их родительские белки (**Рисунок 43, А**). Кроме того, они продемонстрировали более высокую фототоксичность (**Рисунок 43, Б-Д**). Так, например, при митохондриальной локализации при дозе облучения 40 Дж/см<sup>2</sup> SuperNova практически не проявляла фототоксического эффекта, в то время как популяция клеток, экспрессирующая SuperNova2, уменьшалась на 40% (**Рисунок 43, Б**). При мембранной локализации при дозах облучения около 150, 200, 250 Дж/см<sup>2</sup> количество живых клеток, экспрессирующих SuperNova2, в среднем было в два раза меньше, чем клеток, экспрессирующих SuperNova (**Рисунок 43, Г**). Чуть менее выраженное увеличение фототоксичности наблюдалось и для KillerRed2 (**Рисунок 43, В-Д**).

Мутация S10R приводит к более полному созреванию хромофора, что видно по увеличению видимой яркости внутри клетки. Мы полагаем, что увеличение доли белка со зрелым хромофором приводит к увеличению образования активных форм кислорода и, как следствие, увеличению фототоксичности. Интересно, что в клетках, экспрессирующих фотосенсибилизаторы, нацеленные на клеточную мембрану, низкие дозы света увеличивают пролиферацию клеток, в соответствии с наблюдениями, описанными в литературе [121,122].

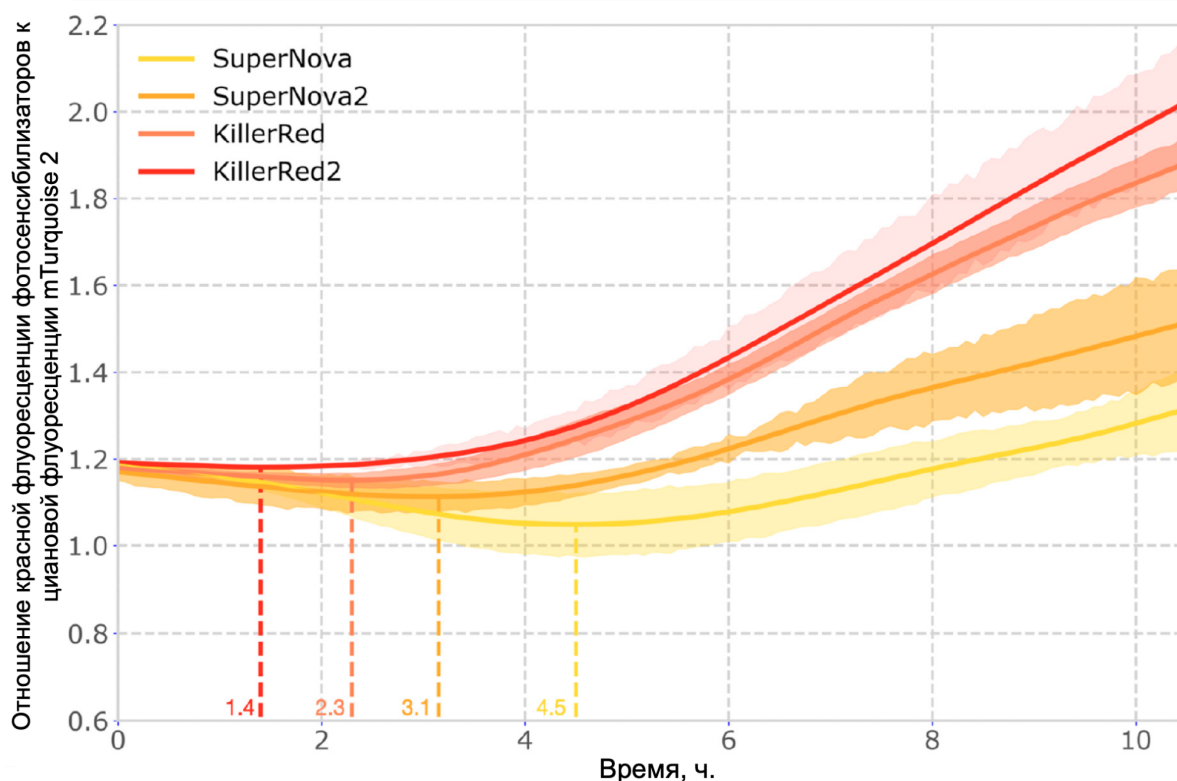


**Рисунок 43.** Экспрессия фототоксичных флуоресцентных белков в клетках HeLa Kyoto: (А) яркость клеток, экспрессирующих фототоксичные белки с митохондриальной и мембранной локализациями; (Б, В) Фототоксичность SuperNova2, SuperNova, KillerRed, KillerRed2 при митохондриальной локализации; (Г, Д) Фототоксичность SuperNova2, SuperNova, KillerRed, KillerRed2 при мембранной локализации. \* - p-value < 0.05 Статистически значимые различия при сравнении значений фототоксичности SuperNova и SuperNova2, \* - p-value < 0.05 Статистически значимые различия при сравнении значений фототоксичности KillerRed и KillerRed2.

#### 4.3.6 Измерение скорости созревания белков SuperNova2 и KillerRed2 *in vivo*

Еще одним важным свойством фототоксичных флуоресцентных белков является скорость созревания их хромофоров *in vivo*. Более быстрое

созревание приводит к более высокой концентрации фототоксичных молекул, что нелинейно соответствует наблюдаемому уровню фототоксичности. Чтобы сравнить скорость созревания красных генетически кодируемых фотосенсибилизаторов, мы использовали коэкспрессию с циановым флуоресцентным белком mTurquoise2 в качестве референса. Мы обнаружили, что в клетках млекопитающих скорость созревания KillerRed2 и SuperNova2 была в полтора раза выше, чем у родительских белков (**Рисунок 44**).



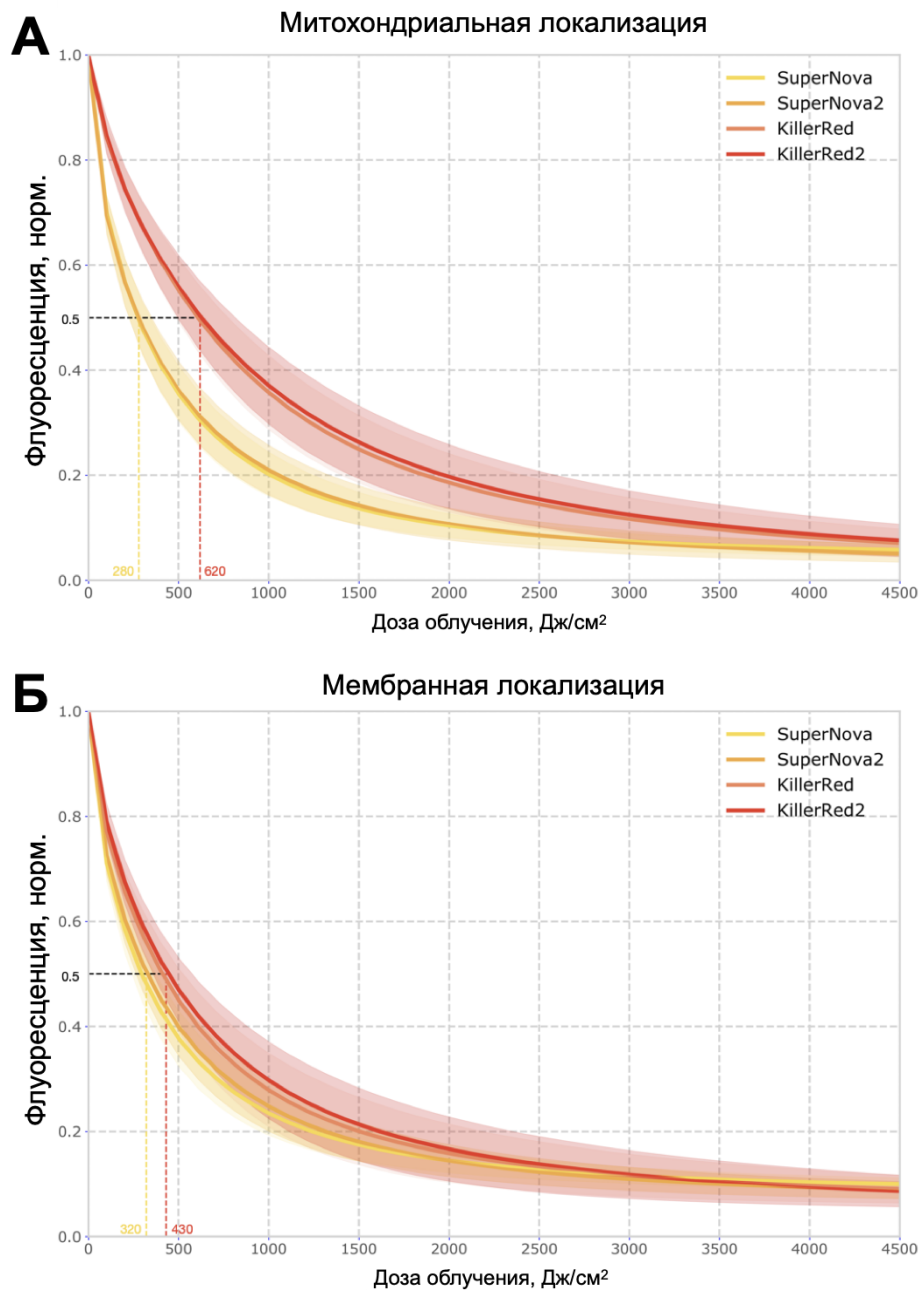
**Рисунок 44.** Динамика отношения красной флуоресценции фотосенсибилизаторов к циановой флуоресценции mTurquoise2 в клетках млекопитающих, коэкспрессирующих красные фототоксичные белки и mTurquoise2. Время, соответствующее экстремуму кривой (когда скорость накопления красной флуоресценции начинает превышать скорость накопления циановой флуоресценции), отмечено на оси X.

#### 4.3.7 Измерение фотостабильности белков SuperNova2 и KillerRed2

Фотостабильность – еще один важный параметр флуоресцентных белков, который может влиять на их фототоксичность. Мы решили проверить фотостабильность KillerRed, SuperNova и их мутантов *in vivo* на стабильных

линиях клеток Hela Kyoto, экспрессирующих фотосенсибилизаторы с мембранной и митохондриальной локализациями (**Рисунок 45**).

Как видно из полученных данных, мутация S10R практически не влияет на фотостабильность. Белки SuperNova и SuperNova2 имеют одинаковую фотостабильность, также как и KillerRed, KillerRed2. Интересно, что KillerRed/KillerRed2 оказались фотостабильнее, чем SuperNova/SuperNova2 примерно в 2-3 раза, в зависимости от локализации. Фотостабильность KillerRed/KillerRed2 при митохондриальной локализации в полтора раза больше, чем при мембранной локализации, в то время как фотостабильность SuperNova/SuperNova2 практически не зависит от локализации. Это может говорить о том, что SuperNova/SuperNova2 и KillerRed/KillerRed2 имеют разные  $pK_a$ .



**Рисунок 45.** Фотостабильность SuperNova2, SuperNova, KillerRed и KillerRed2 *in vivo* при (А) митохондриальной и (Б) мембранной локализации. Доза облучения, необходимая для фотообесцвечивания 50% молекул, указана на оси X цветом.



## 5. Выводы

1. Разработанный количественный тест на фототоксичность для культур клеток млекопитающих и бактерий позволяет сравнить фототоксичность генетически кодируемых фотосенсибилизаторов.
2. Созданные новые фототоксичные белки KillerOrange и mKillerOrange активируются синим светом и могут быть использованы с KillerRed как вместе, так и независимо.
3. Мутация S10R в белках KillerRed и SuperNova увеличивает эффективность и скорость созревания красного хромофора и приводит к увеличению их фототоксичности в клетках бактерий и млекопитающих.

## 6. Список литературы

1. Brodin N.P. et al. Photodynamic Therapy and Its Role in Combined Modality Anticancer Treatment // *Technology in Cancer Research & Treatment*. 2015. Vol. 14, № 4. P. 355–368.
2. Chudakov D.M. et al. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues // *Physiol. Rev.* 2010. Vol. 90, № 3. P. 1103–1163.
3. Lukyanov K.A. et al. Fluorescent proteins as light-inducible photochemical partners // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2010. Vol. 9, № 10. P. 1301–1306.
4. Carpentier P. et al. Structural basis for the phototoxicity of the fluorescent protein KillerRed // *FEBS Lett.* 2009. Vol. 583, № 17. P. 2839–2842.
5. Pletnev S. et al. Structural basis for phototoxicity of the genetically encoded photosensitizer KillerRed // *J. Biol. Chem.* 2009. Vol. 284, № 46. P. 32028–32039.
6. Bulina M.E. et al. A genetically encoded photosensitizer // *Nat. Biotechnol.* 2006. Vol. 24, № 1. P. 95–99.
7. Serebrovskaya E.O. et al. Light-induced blockage of cell division with a chromatin-targeted phototoxic fluorescent protein // *Biochem. J.* 2011. Vol. 435, № 1. P. 65–71.
8. Shirmanova M.V. et al. Phototoxic effects of fluorescent protein KillerRed on tumor cells in mice // *J. Biophotonics*. 2013. Vol. 6, № 3. P. 283–290.
9. Vegh R.B. et al. Reactive oxygen species in photochemistry of the red fluorescent protein “Killer Red” // *Chem. Commun.* . The Royal Society of Chemistry, 2011. Vol. 47, № 17. P. 4887–4889.
10. Shu X. et al. A genetically encoded tag for correlated light and electron microscopy of intact cells, tissues, and organisms // *PLoS Biol.* 2011. Vol. 9, № 4. P. e1001041.
11. Westberg M. et al. No Photon Wasted: An Efficient and Selective Singlet Oxygen Photosensitizing Protein // *J. Phys. Chem. B.* 2017. Vol. 121, № 40. P. 9366–9371.
12. Takemoto K. et al. SuperNova, a monomeric photosensitizing fluorescent protein for chromophore-assisted light inactivation // *Sci. Rep.* 2013. Vol. 3. P. 2629.
13. He J. et al. A genetically targetable near-infrared photosensitizer // *Nat. Methods*. 2016. Vol. 13, № 3. P. 263–268.
14. Sarkisyan K.S. et al. KillerOrange, a Genetically Encoded Photosensitizer Activated

- by Blue and Green Light // PLoS One. 2015. Vol. 10, № 12. P. e0145287.
15. Pletneva N.V. et al. Crystal Structure of Phototoxic Orange Fluorescent Proteins with a Tryptophan-Based Chromophore // PLoS One. 2015. Vol. 10, № 12. P. e0145740.
  16. Pakhomov A.A. et al. Fluorescent protein Dendra2 as a ratiometric genetically encoded pH-sensor // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2017. Vol. 493, № 4. P. 1518–1521.
  17. Yang Y. et al. Improved calcium sensor GCaMP-X overcomes the calcium channel perturbations induced by the calmodulin in GCaMP // Nat. Commun. 2018. Vol. 9, № 1. P. 1504.
  18. González-Vera J.A., Morris M.C. Fluorescent Reporters and Biosensors for Probing the Dynamic Behavior of Protein Kinases // Proteomes. 2015. Vol. 3, № 4. P. 369–410.
  19. Chen N. et al. Designing caspase-3 sensors for imaging of apoptosis in living cells // Chemistry. 2009. Vol. 15, № 37. P. 9311–9314.
  20. Marvin J.S. et al. A genetically encoded fluorescent sensor for in vivo imaging of GABA // Nat. Methods. 2019. Vol. 16, № 8. P. 763–770.
  21. Matz M.V. et al. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species // Nat. Biotechnol. 1999. Vol. 17, № 10. P. 969–973.
  22. Ormö M. et al. Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein // Science. 1996. Vol. 273, № 5280. P. 1392–1395.
  23. Frommer W.B., Davidson M.W., Campbell R.E. Genetically encoded biosensors based on engineered fluorescent proteins // Chem. Soc. Rev. 2009. Vol. 38, № 10. P. 2833–2841.
  24. Yampolsky I.V. et al. Synthesis and properties of the red chromophore of the green-to-red photoconvertible fluorescent protein Kaede and its analogs // Bioorg. Chem. 2008. Vol. 36, № 2. P. 96–104.
  25. Tsien R.Y. The green fluorescent protein // Annu. Rev. Biochem. 1998. Vol. 67. P. 509–544.
  26. Lappe J.W. et al. Base catalysis of chromophore formation in Arg96 and Glu222 variants of green fluorescent protein // of Biological Chemistry. ASBMB, 2005.
  27. Yang T.T. et al. Improved fluorescence and dual color detection with enhanced blue and green variants of the green fluorescent protein // J. Biol. Chem. 1998.

- Vol. 273, № 14. P. 8212–8216.
28. Verkhusha V.V. et al. High stability of Discosoma DsRed as compared to Aequorea EGFP // *Biochemistry*. 2003. Vol. 42, № 26. P. 7879–7884.
  29. Gross L.A. et al. The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000. Vol. 97, № 22. P. 11990–11995.
  30. Mizuno H. et al. Photo-Induced Peptide Cleavage Short Article in the Green-to-Red Conversion of a Fluorescent Protein // *Mol. Cell*. 2003. Vol. 12. P. 1051–1058.
  31. Lukyanov K.A. et al. Discovery and Properties of GFP-Like Proteins from Nonbioluminescent Anthozoa // *Green Fluorescent Protein*. 2005. P. 121–138.
  32. Wiedenmann J. et al. Cracks in the beta -can: Fluorescent proteins from *Anemonia sulcata* (Anthozoa, Actinaria) // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000. Vol. 97, № 26. P. 14091–14096.
  33. Wachter R.M., Watkins J.L., Kim H. Mechanistic diversity of red fluorescence acquisition by GFP-like proteins // *Biochemistry*. 2010. Vol. 49, № 35. P. 7417–7427.
  34. Subach O.M. et al. Structural characterization of acylimine-containing blue and red chromophores in mTagBFP and TagRFP fluorescent proteins // *Chem. Biol*. 2010. Vol. 17, № 4. P. 333–341.
  35. Miyawaki A., Shcherbakova D.M., Verkhusha V.V. Red fluorescent proteins: chromophore formation and cellular applications // *Curr. Opin. Struct. Biol*. 2012. Vol. 22, № 5. P. 679–688.
  36. Stepanenko O.V. et al. Beta-barrel scaffold of fluorescent proteins: folding, stability and role in chromophore formation // *Int. Rev. Cell Mol. Biol*. 2013. Vol. 302. P. 221–278.
  37. Pletnev S. et al. Understanding Blue-to-Red Conversion in Monomeric Fluorescent Timers and Hydrolytic Degradation of Their Chromophores // *Journal of the American Chemical Society*. 2010. Vol. 132, № 7. P. 2243–2253.
  38. Subach F.V. et al. Monomeric fluorescent timers that change color from blue to red report on cellular trafficking // *Nat. Chem. Biol*. 2009. Vol. 5, № 2. P. 118–126.
  39. Liu R. et al. The crystal structure of red fluorescent protein TagRFP-T reveals the mechanism of its superior photostability // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2016. Vol. 477, № 2. P. 229–234.

40. Subach F.V. et al. Bright monomeric photoactivatable red fluorescent protein for two-color super-resolution sptPALM of live cells // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. Vol. 132, № 18. P. 6481–6491.
41. Blum H.F. *Photodynamic Action and Diseases Caused by Light.* 1964.
42. Asada K. THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1999. Vol. 50. P. 601–639.
43. Calzavara-Pinton P.G., Venturini M., Sala R. Photodynamic therapy: update 2006. Part 2: Clinical results // *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. Wiley*, 2007. Vol. 21, № 4. P. 439–451.
44. Huang Z. A review of progress in clinical photodynamic therapy // *Technol. Cancer Res. Treat.* 2005. Vol. 4, № 3. P. 283–293.
45. Verma S. et al. Strategies for enhanced photodynamic therapy effects // *Photochem. Photobiol. Wiley*, 2007. Vol. 83, № 5. P. 996–1005.
46. Buytaert E., Dewaele M., Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. Vol. 1776, № 1. P. 86–107.
47. Sai D.L. et al. Tailoring photosensitive ROS for advanced photodynamic therapy // *Experimental & Molecular Medicine.* 2021. Vol. 53, № 4. P. 495–504.
48. Foote C.S. Mechanisms of Photosensitized Oxidation // *Science.* 1968. Vol. 162, № 3857. P. 963–970.
49. Abrahamse H., Hamblin M.R. New photosensitizers for photodynamic therapy // *Biochem. J.* 2016. Vol. 473, № 4. P. 347–364.
50. Foote C.S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation // *Photochem. Photobiol.* 1991. Vol. 54, № 5. P. 659.
51. Almeida R.D. et al. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy // *Biochim. Biophys. Acta.* 2004. Vol. 1704, № 2. P. 59–86.
52. Oleinick N.L., Evans H.H. The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms // *Radiat. Res.* 1998. Vol. 150, № 5 Suppl. P. S146–S156.
53. Bonora M., Pinton P. The mitochondrial permeability transition pore and cancer: molecular mechanisms involved in cell death // *Front. Oncol.* 2014. Vol. 4. P. 302.
54. Moserova I., Kralova J. Role of ER stress response in photodynamic therapy: ROS generated in different subcellular compartments trigger diverse cell death

- pathways // PLoS One. 2012. Vol. 7, № 3. P. e32972.
55. Lin C.W. et al. Photodynamic destruction of lysosomes mediated by Nile blue photosensitizers // Photochem. Photobiol. 1993. Vol. 58, № 1. P. 81–91.
  56. Tour O. et al. Genetically targeted chromophore-assisted light inactivation // Nat. Biotechnol. 2003. Vol. 21, № 12. P. 1505–1508.
  57. Liao J.C., Roeder J., Jay D.G. Chromophore-assisted laser inactivation of proteins is mediated by the photogeneration of free radicals // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1994. Vol. 91, № 7. P. 2659–2663.
  58. Serebrovskaya E.O., Lukyanov K.A. Chapter 35:Chromophore-Assisted Light Inactivation: A Powerful Tool to Study Protein Functions // Singlet Oxygen. 2016. P. 185–203.
  59. Theodossiou T.A., Noronha-Dutra A., Hothersall J.S. Mitochondria are a primary target of hypericin phototoxicity: synergy of intracellular calcium mobilisation in cell killing // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2006. Vol. 38, № 11. P. 1946–1956.
  60. Weinberg B.D. et al. Results of combined photodynamic therapy (PDT) and high dose rate brachytherapy (HDR) in treatment of obstructive endobronchial non-small cell lung cancer (NSCLC) // Photodiagnosis Photodyn. Ther. 2010. Vol. 7, № 1. P. 50–58.
  61. Scourides P., Mitchell J.B. Photosensitizers // Lasers in Medical Science. 1987. Vol. 2, № S1. P. 6–7.
  62. Berg K., Moan J. Lysosomes and microtubules as targets for photochemotherapy of cancer // Photochem. Photobiol. 1997. Vol. 65, № 3. P. 403–409.
  63. Peng Q. et al. Subcellular localization, redistribution and photobleaching of sulfonated aluminum phthalocyanines in a human melanoma cell line // Int. J. Cancer. 1991. Vol. 49, № 2. P. 290–295.
  64. Rosenkranz A.A., Jans D.A., Sobolev A.S. Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency // Immunol. Cell Biol. 2000. Vol. 78, № 4. P. 452–464.
  65. Kessel D. Subcellular targets for photodynamic therapy: implications for initiation of apoptosis and autophagy // J. Natl. Compr. Canc. Netw. 2012. Vol. 10 Suppl 2. P. S56–S59.
  66. Kessel D. Correlation between subcellular localization and photodynamic efficacy // J. Porphyr. Phthalocyanines. World Scientific Publishing Co., 2004. Vol. 08, №

08. P. 1009–1014.
67. Flors C., Nonell S. Genetically Encoded Photosensitizers // Handbook of Photomedicine. 2013. P. 275–280.
  68. Los G.V. et al. HaloTag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis // ACS Chem. Biol. 2008. Vol. 3, № 6. P. 373–382.
  69. Takemoto K. et al. Chromophore-assisted light inactivation of HaloTag fusion proteins labeled with eosin in living cells // ACS Chem. Biol. 2011. Vol. 6, № 5. P. 401–406.
  70. Keppler A., Ellenberg J. Chromophore-assisted laser inactivation of alpha- and gamma-tubulin SNAP-tag fusion proteins inside living cells // ACS Chem. Biol. 2009. Vol. 4, № 2. P. 127–138.
  71. Giancaspero T.A. et al. Remaining challenges in cellular flavin cofactor homeostasis and flavoprotein biogenesis // Front Chem. 2015. Vol. 3. P. 30.
  72. Souslova E.A., Mironova K.E., Deyev S.M. Applications of genetically encoded photosensitizer miniSOG: from correlative light electron microscopy to immunophotosensitizing // J. Biophotonics. 2017. Vol. 10, № 3. P. 338–352.
  73. Ge J. et al. Standard fluorescent imaging of live cells is highly genotoxic // Cytometry A. 2013. Vol. 83, № 6. P. 552–560.
  74. Ryumina A.P. et al. Flavoprotein miniSOG as a genetically encoded photosensitizer for cancer cells // Biochim. Biophys. Acta. 2013. Vol. 1830, № 11. P. 5059–5067.
  75. Jiménez-Banzo A. et al. Singlet oxygen photosensitization by EGFP and its chromophore HBDI // Biophys. J. 2008. Vol. 94, № 1. P. 168–172.
  76. Palmer C.V., Modi C.K., Mydlarz L.D. Coral fluorescent proteins as antioxidants // PLoS One. 2009. Vol. 4, № 10. P. e7298.
  77. Adam V. et al. Structural basis of X-ray-induced transient photobleaching in a photoactivatable green fluorescent protein // J. Am. Chem. Soc. 2009. Vol. 131, № 50. P. 18063–18065.
  78. Subach F.V., Verkhusha V.V. Chromophore transformations in red fluorescent proteins // Chem. Rev. 2012. Vol. 112, № 7. P. 4308–4327.
  79. Wachter R.M. et al. Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein // Structure. 1998. Vol. 6, № 10. P. 1267–1277.

80. Nienhaus K. et al. Exploring chromophore–protein interactions in fluorescent protein cmFP512 from *Cerianthus membranaceus*: X-ray structure analysis and optical spectroscopy // *Biochemistry*. 2006. Vol. 45, № 43. P. 12942–12953.
81. Luo S., Levine R.L. Methionine in proteins defends against oxidative stress // *FASEB J*. 2009. Vol. 23, № 2. P. 464–472.
82. Lee W., Kim I., Rhee Y.M. A proton transfer network that generates deprotonated tyrosine is a key to producing reactive oxygen species in phototoxic KillerRed protein // *Phys. Chem. Chem. Phys*. 2018. Vol. 20, № 34. P. 22342–22350.
83. Waldeck W. et al. Autofluorescent proteins as photosensitizer in eukaryotes // *Int. J. Med. Sci*. 2009. Vol. 6, № 6. P. 365–373.
84. Shaner N.C. et al. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein // *Nat. Biotechnol*. 2004. Vol. 22, № 12. P. 1567–1572.
85. Liu J. et al. Advances in the Genetically Engineered KillerRed for Photodynamic Therapy Applications // *Int. J. Mol. Sci*. 2021. Vol. 22, № 18.
86. Zhang Y. et al. Plasma membrane changes during programmed cell deaths // *Cell Res*. 2018. Vol. 28, № 1. P. 9–21.
87. Cheng H. et al. Epigenetics-inspired photosensitizer modification for plasma membrane-targeted photodynamic tumor therapy // *Biomaterials*. 2019. Vol. 224. P. 119497.
88. Williams D.C. et al. Rapid and permanent neuronal inactivation in vivo via subcellular generation of reactive oxygen with the use of KillerRed // *Cell Rep*. 2013. Vol. 5, № 2. P. 553–563.
89. Formella I. et al. Real-time visualization of oxidative stress-mediated neurodegeneration of individual spinal motor neurons in vivo // *Redox Biol*. 2018. Vol. 19. P. 226–234.
90. Teh C., Korzh V. In vivo optogenetics for light-induced oxidative stress in transgenic zebrafish expressing the KillerRed photosensitizer protein // *Methods Mol. Biol*. 2014. Vol. 1148. P. 229–238.
91. Jewhurst K., McLaughlin K.A. Recovery of the *Xenopus laevis* heart from ROS-induced stress utilizes conserved pathways of cardiac regeneration // *Dev. Growth Differ. Wiley*, 2019. Vol. 61, № 3. P. 212–227.
92. Ertürk A., Wang Y., Sheng M. Local pruning of dendrites and spines by



- caspase-3-dependent and proteasome-limited mechanisms // *J. Neurosci.* 2014. Vol. 34, № 5. P. 1672–1688.
93. Grimm A., Cummins N., Götz J. Local Oxidative Damage in the Soma and Dendrites Quarantines Neuronal Mitochondria at the Site of Insult // *iScience.* 2018. Vol. 6. P. 114–127.
94. Wang Y. et al. ROS-induced mitochondrial depolarization initiates PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial degradation by autophagy // *Autophagy.* 2012. Vol. 8, № 10. P. 1462–1476.
95. Petrova N.V. et al. Inducing cellular senescence in vitro by using genetically encoded photosensitizers // *Aging .* 2016. Vol. 8, № 10. P. 2449–2462.
96. Sun L. et al. Targeted DNA damage at individual telomeres disrupts their integrity and triggers cell death // *Nucleic Acids Res.* 2015. Vol. 43, № 13. P. 6334–6347.
97. Tan R., Lan L. Induction of Site-Specific Oxidative Damage at Telomeres by Killerred-Fused Sheltretin Proteins // *Methods Mol. Biol.* 2017. Vol. 1587. P. 139–146.
98. Waldeck W. et al. Spatial localization of genes determined by intranuclear DNA fragmentation with the fusion proteins lamin KRED and histone KRED und visible light // *Int. J. Med. Sci.* 2013. Vol. 10, № 9. P. 1136–1148.
99. Whitefield D.B. et al. Quantifying site-specific chromatin mechanics and DNA damage response // *Sci. Rep.* 2018. Vol. 8, № 1. P. 18084.
100. Lan L. et al. Novel method for site-specific induction of oxidative DNA damage reveals differences in recruitment of repair proteins to heterochromatin and euchromatin // *Nucleic Acids Res.* 2014. Vol. 42, № 4. P. 2330–2345.
101. Engler C., Kandzia R., Marillonnet S. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability // *PLoS One.* 2008. Vol. 3, № 11. P. e3647.
102. Iverson S.V. et al. CIDAR MoClo: Improved MoClo Assembly Standard and New E. coli Part Library Enable Rapid Combinatorial Design for Synthetic and Traditional Biology // *ACS Synth. Biol.* 2016. Vol. 5, № 1. P. 99–103.
103. Engler C., Marillonnet S. Golden Gate cloning // *Methods Mol. Biol.* 2014. Vol. 1116. P. 119–131.
104. Weber E. et al. A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs // *PLoS One.* 2011. Vol. 6, № 2. P. e16765.
105. Szulc J. et al. A versatile tool for conditional gene expression and knockdown //

- Nat. Methods. 2006. Vol. 3, № 2. P. 109–116.
106. Bindels D.S. et al. mScarlet: a bright monomeric red fluorescent protein for cellular imaging // Nat. Methods. 2017. Vol. 14, № 1. P. 53–56.
107. Gándara C., Affleck V., Stoll E.A. Manufacture of Third-Generation Lentivirus for Preclinical Use, with Process Development Considerations for Translation to Good Manufacturing Practice // Hum. Gene Ther. Methods. 2018. Vol. 29, № 1. P. 1–15.
108. Manual I. GeneMorph II Random Mutagenesis Kit. Stratagene, 2009.
109. Calvin S. et al. FuGENE® HD transfection reagent: Choice of a transfection reagent with minimal off-target effect as analyzed by microarray transcriptional profiling // BIOCHEMICA-MANNHEIM- ROCHE, 2006. Vol. 4. P. 22.
110. Marks M.S. et al. Protein targeting by tyrosine- and di-leucine-based signals: evidence for distinct saturable components // J. Cell Biol. 1996. Vol. 135, № 2. P. 341–354.
111. Kim J.H. et al. High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice // PLoS One. 2011. Vol. 6, № 4. P. e18556.
112. Broeke J., Perez J.M.M., Pascau J. Image Processing with ImageJ. Packt Publishing Ltd, 2015. 256 p.
113. ExPASy - ProtParam tool [Electronic resource]. URL: <https://web.expasy.org/protparam/> (accessed: 06.02.2022).
114. Hansen M.J. et al. Wavelength-selective cleavage of photoprotecting groups: strategies and applications in dynamic systems // Chem. Soc. Rev. 2015. Vol. 44, № 11. P. 3358–3377.
115. Gorbachev D.A., Sarkisyan K.S. A MUTANT OF THE PHOTOTOXIC PROTEIN KILLERRED THAT DOES NOT FORM DSRED-LIKE CHROMOPHORE // Bulletin of Russian State Medical University. Россия, Москва: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2019. № 6.
116. Alieva N.O. et al. Diversity and evolution of coral fluorescent proteins // PLoS One. 2008. Vol. 3, № 7. P. e2680.

117. Ai H.-W. et al. Exploration of new chromophore structures leads to the identification of improved blue fluorescent proteins // *Biochemistry*. 2007. Vol. 46, № 20. P. 5904–5910.
118. Costantini L.M. et al. Assessing the tendency of fluorescent proteins to oligomerize under physiologic conditions // *Traffic*. 2012. Vol. 13, № 5. P. 643–649.
119. Sarkisyan K.S. et al. Local fitness landscape of the green fluorescent protein // *Nature*. 2016. Vol. 533, № 7603. P. 397–401.
120. Provost E., Rhee J., Leach S.D. Viral 2A peptides allow expression of multiple proteins from a single ORF in transgenic zebrafish embryos // *Genesis*. 2007. Vol. 45, № 10. P. 625–629.
121. Day R.M., Suzuki Y.J. Cell proliferation, reactive oxygen and cellular glutathione // *Dose Response*. 2006. Vol. 3, № 3. P. 425–442.
122. Blazquez-Castro A., Breitenbach T., Ogilby P.R. Singlet oxygen and ROS in a new light: low-dose subcellular photodynamic treatment enhances proliferation at the single cell level // *Photochem. Photobiol. Sci. Royal Society of Chemistry*, 2014. Vol. 13, № 9. P. 1235–1240.