

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Российской академии наук

на правах рукописи

Злобовская Ольга Анатольевна

**Методы светозависимой активации и детекции клеточной гибели с помощью
флуоресцентных белков**

специальность 03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2017

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы

Флуоресцентные белки, относящиеся к семейству GFP (Green Fluorescent Protein), широко используются для различных молекулярно-биологических целей. Для своего созревания они нуждаются только в молекулярном кислороде. Постепенно флуоресцентная палитра пополняется белками из других семейств, требующими дополнительные кофакторы для образования функционального хромофора, но зато позволяющими приблизиться к инфракрасной области спектра.

Дальнекрасная и инфракрасная области спектра флуоресценции особо актуальны для работы на уровне целых организмов, поскольку свет в данной области меньше всего поглощается и рассеивается тканями. Кроме того, возбуждающий свет, также сдвигаясь в более длинноволновую область спектра, в свою очередь меньше рассеивается, становится менее повреждающим для клеток в ходе однофотонного возбуждения и не требует применения сложной установки для двухфотонного возбуждения. Непричинение дополнительного вреда клеткам возбуждающим светом особенно важно, в частности, при установлении механизма клеточной гибели. Например, это существенно при разработке терапии, когда само наблюдение должно минимально влиять на изучаемый процесс.

Большинство современных применений флуоресцентных белков подразумевают их химическую инертность. Она необходима для использования флуоресцентных белков в качестве нетоксичных меток для различных клеточных мишеней. Однако в последнее время значительную популярность приобретает использование особых флуоресцентных белков – фототоксических – для контролируемого генерирования активных форм кислорода.

Фототоксические белки можно применять как в качестве меток (при небольшой дозе облучения), так и для достижения для фотоиндуцируемых внутриклеточных реакций (при увеличении времени и/или мощности облучения). В зависимости от локализации белка и дозы облучения эффект может варьировать от запуска сигнального каскада, не приводящего к гибели клетки, - до уничтожения целых клеточных популяций, несущих фотосенсибилизатор. Разнообразие фототоксических флуоресцентных белков до последних пор было невелико: димерный красный белок из семейства GFP, KillerRed (недавно из него получен мономерный белок SuperNova) и мономерный зеленый флавопротеин miniSOG. Палитра фототоксических флуоресцентных белков нуждается в расширении, а текущие фотосенсибилизаторы – в продолжении изучения и возможном улучшении их свойств.

Цель и задачи работы

Целью данной работы являлось применение флуоресцентных белков для двух задач: использовать их для активации клеточной гибели (исследовать фототоксичность новых

представителей семейства KillerRed); а также для детекции клеточной гибели (создать дальнекрасный-ближнеинфракрасный сенсор на активность каспазы-3). Для выполнения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Сравнить фототоксический эффект белков KillerRed и KillerOrange в митохондриальной локализации при облучении клеток оранжевым светом, возбуждающим KillerRed, или синим светом, возбуждающим KillerOrange;
- 2) Сравнить фототоксический эффект белков KillerRed, SuperNova и SuperNova-2 в митохондриальной, а также мембранной локализациях;
- 3) Проверить *in vitro* возможность использования ближнеинфракрасного флуоресцентного белка iRFP на основе бактериофитохрома в качестве акцептора для ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET) с дальнекрасных флуоресцентных белков mKate2, eqFP650 и eqFP670;
- 4) Создать и протестировать *in vitro* и *in cellulo* несколько вариантов сенсора на активность каспазы-3, в том числе для многоцветной флуоресцентной микроскопии.

Научная новизна и практическая ценность работы

Данная работа посвящена изучению фототоксических свойств белков из семейства KillerRed, а также созданию сенсора для детекции активности каспазы-3 на основе ближнеинфракрасного флуоресцентного белка iRFP.

В первой части работы недавно полученный флуоресцентный белок KillerOrange исследовали на фототоксические свойства для клеток млекопитающих: он оказался токсичным при облучении синим, но не оранжевым светом, что при необходимости позволит использовать его как ортогональный фотосенсибилизатор для KillerRed.

Показано, что исторически первый мономерный вариант KillerRed – SuperNova – созревает медленнее, чем KillerRed. В то же время полученный в нашей лаборатории новый вариант SuperNova-2 наследует от SuperNova мономерное состояние, а от KillerRed - высокую скорость созревания и сходную фототоксичность, что делает SuperNova-2 потенциально перспективным инструментом как для достижения клеточной гибели, так и для технологии CALI.

Во второй части работы создали и протестировали несколько вариантов дальнекрасно-ближнеинфракрасного FRET-сенсора на активность каспазы-3, в состав которых впервые вошел белок на основе бактериофитохрома iRFP. Для наиболее успешного варианта по результатам экспериментов *in vitro* и *in cellulo* – mKate2-DEVD-iRFP – показана применимость для мультicanaльной флуоресцентной микроскопии. Проведенные эксперименты продемонстрировали, что созданный сенсор на активность каспазы-3 – перспективный инструмент для исследования механизма апоптоза, при этом его флуоресценция в дальнекрасной-ближнеинфракрасной области спектра делает сенсор подходящим для работы *in vivo*.

Структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 124 страницах и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов, заключения, списка сокращений и списка литературы, включающего 198 ссылок, а также одного приложения. Диссертация содержит 50 рисунков.

Апробация работы

Основные результаты диссертации были доложены на следующих научных конференциях и школах: «Saratov Fall Meeting», 2015, Саратов; «ADFLIM», 2016, Сочи; «Biomembranes 2016: Mechanisms of Aging and Age-Related Diseases», 2016, Долгопрудный; «XXIX Зимняя молодежная научная школа ИБХ РАН», 2017, Москва.

Публикации

По материалам работы опубликовано 5 статей в рецензируемых журналах, 1 патент РФ.

Содержание работы

Данная работа состоит из двух частей: в первой раскрывается светозависимая активация клеточной гибели в культурах клеток млекопитающих. Для ее достижения использовали генетически кодируемые фотосенсибилизаторы из семейства GFP-подобных белков: KillerRed, KillerOrange, SuperNova и SuperNova-2.

Вторая часть посвящена детекции клеточной гибели путем апоптоза с помощью сенсоров на активность каспазы-3. Было получено три варианта дальнекрасных сенсоров, основанных на технологии безызлучательного переноса энергии FRET, причем в качестве акцептора впервые использовали ближнеинфракрасный белок iRFP. Одновременно с наблюдением за активностью каспазы-3 мониторили другие клеточные процессы, такие как перераспределение проапоптотического химерного белка Вах-EGFP или изменение внутриклеточного pH с помощью сенсора SynHer.

1. Светоиндуцируемая гибель клеток млекопитающих с помощью генетически кодируемых фотосенсибилизаторов

Генетически кодируемые фотосенсибилизаторы являются перспективными инструментами с различными применениями: от изучения влияния АФК (начиная с клеточного уровня – до уровня целого организма) до прицельного уничтожения клеточных популяций.

В настоящее время существует несколько генетически кодируемых фотосенсибилизаторов. Первым был получен KillerRed из семейства GFP (и недавно – его мономерный вариант

SuperNova), обладающий флуоресценцией в красной области спектра. Кроме того, существует неродственный GFP-семейству фотосенсибилизатор miniSOG (получен на основе флавин-связывающего белка из растения *Arabidopsis*), который флуоресцирует в зеленой области спектра.

Для увеличения возможностей применения генетических фотосенсибилизаторов необходимо расширить их палитру; а также, по возможности, усовершенствовать уже имеющиеся варианты, увеличив их яркость и фототоксичность.

1.1 KillerOrange: первый генетически кодируемый фотосенсибилизатор в оранжевой области спектра

1.1.1 Введение

KillerRed, первый генетически кодируемый фотосенсибилизатор, обладает флуоресценцией в красной области спектра (максимум эмиссии – 610 нм). KillerRed обладает хромофором типа DsRed (получается из GFP-хромофора дополнительным окислением C α -N связи по 65 положению).

Ранее в нашей лаборатории с целью изменения спектральных характеристик KillerRed, тирозин в составе хромофора этого белка был изменен на триптофан. Далее, для увеличения яркости флуоресценции и эффективности созревания было проведено несколько замен методом случайного мутагенеза.

Итоговый мутант, названный KillerOrange, содержал замены G3C, Y66W, D113S, N145S, F177L, Y221H и E236Q и обладал флуоресценцией в оранжевой области спектра с максимумами возбуждения и эмиссии 512 и 555 нм, соответственно. Коэффициенты экстинкции составили 41200 M⁻¹ см⁻¹ при 455 нм и 22600 M⁻¹ см⁻¹ при 514 нм, а квантовый выход флуоресценции – 0.42. Судя по спектру поглощения (см. рисунок 1), в белке KillerOrange происходит формирование двух типов хромофора: CFP-подобный и mHoneyDew-подобный, поглощающие при 455 и 514 нм, соответственно. KillerOrange, как и KillerRed, из которого он был получен, является димерным белком.

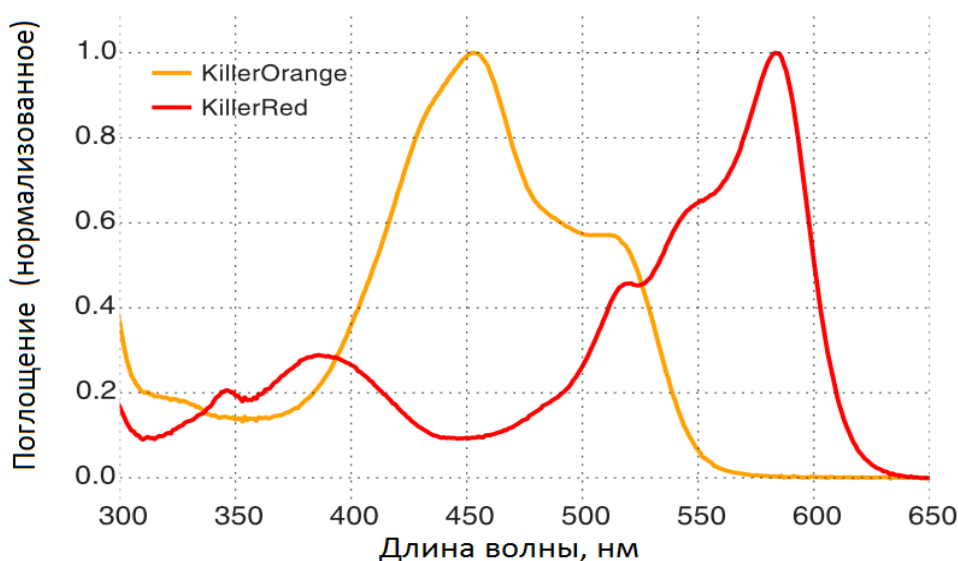


Рисунок 1 – Спектры поглощения белков KillerRed и KillerOrange.

1.1.2 Фототоксичность KillerOrange в клетках млекопитающих

В мои задачи входили демонстрация фототоксического эффекта KillerOrange для клеток млекопитающих, а также его качественное сопоставление с таковым “родительского” белка - KillerRed. KillerOrange был клонирован вместо KillerRed в вектора pKillerRed-dMito и pKillerRed-mem. Правильность последовательности проверена с помощью секвенирования по Сэнгеру, а корректность локализации – с помощью флуоресцентной микроскопии. Впоследствии для работы была выбрана митохондриальная локализация.

Для исследования фототоксичности в клетках эукариот использовали клеточную линию НЕК293. Временно трансфицированные клетки плазмидой pKillerRed-dmito, pKillerOrange-dmito или pEGFP-N смешивали попарно – клетки с фототоксическим белком и клетки с EGFP. Часть смеси оставляли в качестве контроля в темном месте при комнатной температуре вплоть до окончания облучения. Другую часть облучали в прозрачных кюветах на свержярких светодиодах с длиной волны 447 нм или 590 нм. Для предотвращения нагревания между диодом и кюветой помещали чашку Петри, наполненную водой. Через 30, 60 и 90 минут облучения отбирали одинаковый объем суспензии и высаживали клетки на чашки Петри. Необлученный контроль высевали в параллель с последней порцией облученных клеток. Через сутки клеткам меняли среду, чтобы избежать негативного влияния погибших клеток на выжившие, а еще через сутки анализировали состав смеси клеток с помощью проточной цитофлуориметрии (см. рисунок 2).

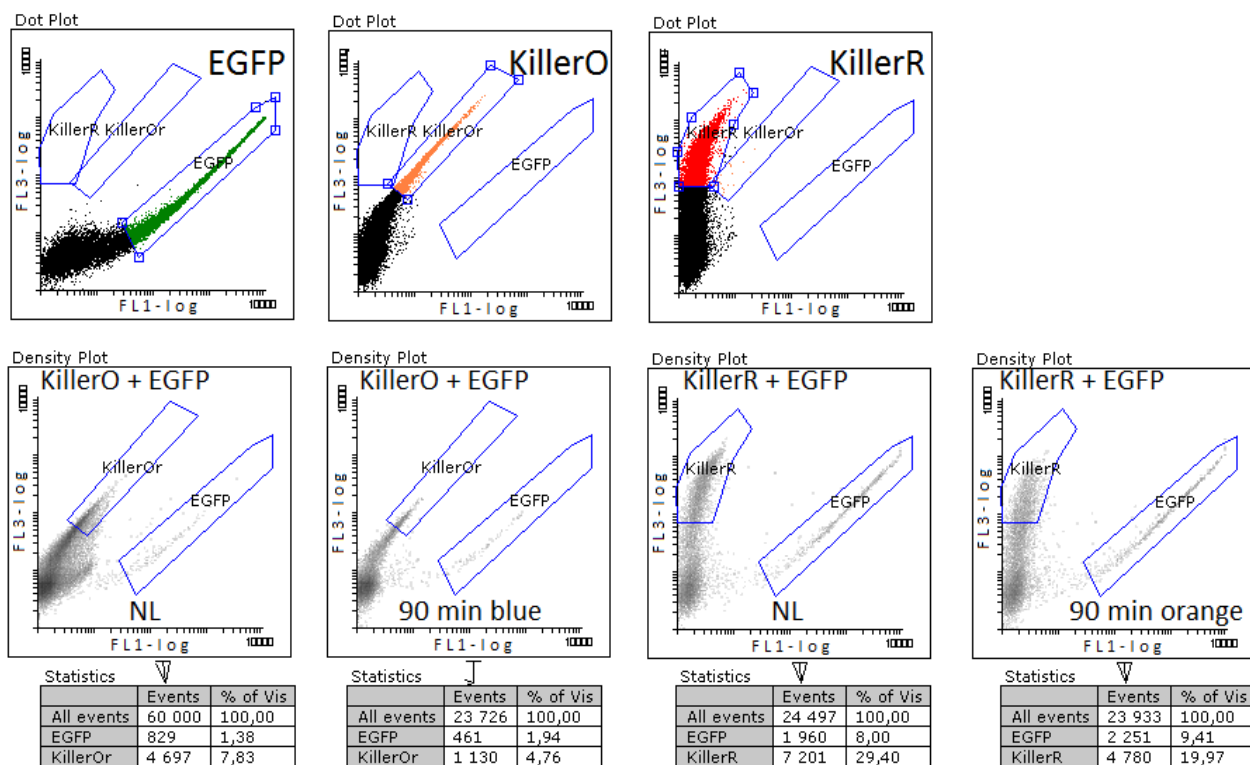


Рисунок 2 – Пример анализа смесей клеток НЕК293 до и после облучения на проточном цитофлуориметре. KillerO = KillerOrange, KillerR = KillerRed; NL = без облучения, 90 min blue/orange = 90 минут облучения синим (447 нм) или оранжевым светом (590 нм).

Динамику гибели клеток рассчитывали, используя отношение клеток, несущих фототоксичные белки, к клеткам, несущим EGFP. Данные для каждого времени облучения (30, 60, 90 минут) нормировали на отношение для необлученных клеток (см. рисунок 3).

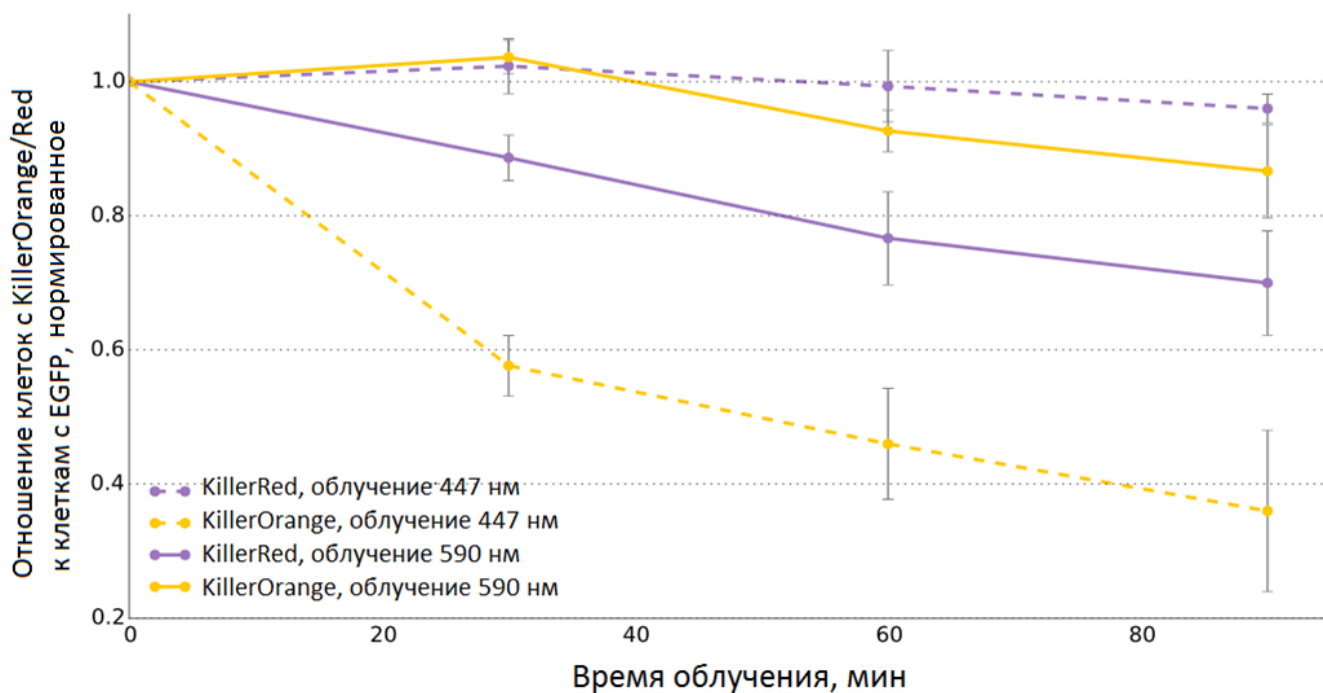


Рисунок 3 – Фототоксичность KillerOrange и KillerRed в клетках млекопитающих (HEK293). KillerOrange, KillerRed и EGFP-несущие клетки были смешаны и облучены светом длиной волны 447 (60 мВт/см^2) или 590 нм (20 мВт/см^2). По оси Y отложены изменения доли KillerOrange (оранжевые линии) или KillerRed (фиолетовые линии). Данные нормализованы на отношения в необлученном образце. Погрешности обозначают стандартное отклонение, $N = 3$.

Уровень фототоксичности фотосенсибилизатора во многом зависит не только от локализации, но и от условий облучения. В частности, в случае проведенных экспериментов плотности облучения синим и оранжевым светом были ограничены допустимым напряжением для светодиодов. Мощность синего света превосходила таковую для оранжевого в три раза. Поэтому количественно сравнивать фототоксический эффект для облучений разным светом невозможно.

Однако в данном случае интересен, скорее качественный эффект при сравнении KillerRed и KillerOrange: несмотря на более низкую мощность оранжевого света, в этих условиях KillerRed проявляет фототоксический эффект, в отличие от KillerOrange. При этом, несмотря на большую плотность синего света (и так достаточно токсичного для клеток) значительной фототоксичностью при облучении синим светом обладает, наоборот, только KillerOrange.

Таким образом, KillerOrange фототоксичен для клеток млекопитающих, причем его можно использовать в качестве ортогонального фотосенсибилизатора KillerRed.

1.2 SuperNova и SuperNova-2: мономерные варианты KillerRed

1.2.1 Введение

KillerOrange обладает некоторыми общими недостатками с исходным белком KillerRed: в частности, в основном он существует в составе димера. Это не является препятствием для обеспечения общей фототоксичности, однако затрудняет его использование для технологии светоиндуцируемой инактивации целевых белков (Chromophore-Assisted Light Inactivation, CALI). В этом случае необходимо, чтобы фототоксичный белок, слитый с целевым, без облучения не нарушал функцию последнего, - что может происходить в случае формирования межмолекулярных димеров фотосенсибилизатора.

Для KillerRed недавно была получена и опубликована мономерная форма, названная "SuperNova". По данным авторов, SuperNova уступает KillerRed по уровню производства супероксид-анион радикала, основной генерируемой форме активного кислорода. В той же статье на небольшой выборке (менее 20 клеток) было показано, что в одинаковых условиях облучения KillerRed эффективнее вызывает клеточную гибель у эукариот, чем SuperNova.

Поскольку мономерная форма фотосенсибилизатора представляет существенный интерес для использования таких технологий, как CALI, возникла необходимость сравнить SuperNova и KillerRed по показателю фототоксичности на значимой выборке и, при необходимости, улучшить мономерный вариант с помощью мутагенеза.

Ранее в нашей лаборатории методом случайного мутагенеза была получена более яркая и быстро созревающая форма SuperNova, названная SuperNova-2. Она отличается от исходной одной заменой: S10R. Различия в скорости созревания особенно заметны при бактериальной экспрессии: SuperNova созревает через двое суток после посева на чашки Петри, в то время как KillerRed и SuperNova-2 – через сутки. Для сравнения, ключевые характеристики всех трех вариантов KillerRed представлены в таблице 1.

Таблица 1. Ключевые характеристики KillerRed, SuperNova и SuperNova-2.

Характеристика	KillerRed	SuperNova	SuperNova-2
Максимум возбуждения, нм	585	579	579
Максимум эмиссии, нм	610	610	609
Коэффициент экстинкции, $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$	45000	33600	70000
Квантовый выход	0.25	0.3	0.35
Мономер/димер	димер	мономер	мономер
Скорость созревания (бактерии на чашках Петри)	1 сутки, 37°C	1 сутки при 37°C + 1 сутки при $t_{\text{комн}}$	1 сутки, 37°C

1.2.2 SuperNova-2 в клетках млекопитающих

В мои задачи входило сравнение фототоксичности в клетках млекопитающих трех “красных” фотосенсибилизаторов: KillerRed, SuperNova и SuperNova-2. Для эукариотической экспрессии SuperNova-2 были выбраны мембранная и митохондриальная локализации с целью дополнительной проверки зависимости фототоксического эффекта от внутриклеточной локализации.

SuperNova и SuperNova-2 были клонированы вместо KillerRed в вектора рKillerRed-dMito и рKillerRed-mem. Правильность последовательности была проверена с помощью секвенирования по Сэнгеру, а корректность внутриклеточной локализации – с помощью флуоресцентной микроскопии. Для KillerRed и SuperNova-2 яркий сигнал флуоресценции наблюдался через сутки после трансфекции, в то время как для SuperNova – через двое суток. Для того, чтобы отделить истинную фототоксичность от неравной скорости созревания, все культуры облучали через двое суток после трансфекции.

Эксперимент был аналогичен таковому с KillerOrange (см. рисунок 4): облучаемая смесь клеток содержала клетки, несущие один из вариантов красного фотосенсибилизатора, и клетки с EGFP. В качестве дополнительного отрицательного контроля также облучали смесь клеток, несущих митохондриально-локализованный нефототоксичный белок mKate2, и клеток с EGFP.

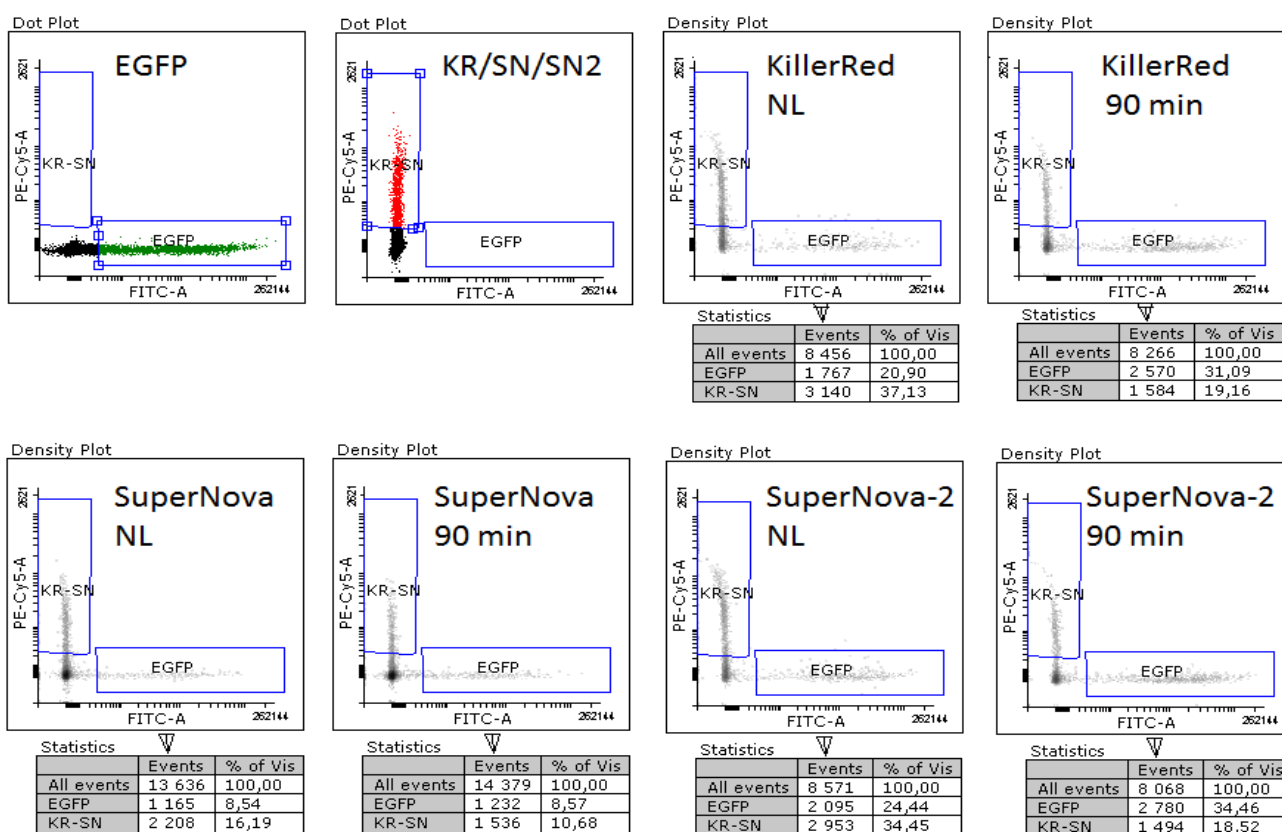


Рисунок 4 – Пример анализа смесей клеток до и после облучения на проточном цитофлуориметре.

Часть смесей оставляли в качестве контроля в темном месте при комнатной температуре вплоть до окончания облучения. Другую часть облучали в прозрачных кюветах на сверхярких светодиодах с длиной волны 590 нм. Для предотвращения нагревания между диодом и кюветой помещали чашку Петри, наполненную водой. Через 30, 60 и 90 минут облучения отбирали одинаковый объем суспензии и высаживали клетки на чашки Петри. Необлученный контроль высевали в параллель с последней порцией облученных клеток. Через сутки клеткам меняли среду, чтобы избежать негативного влияния погибших клеток на выжившие, а еще через сутки анализировали состав смеси клеток с помощью проточной цитофлуориметрии (см. рисунок 4).

Динамику гибели клеток рассчитывали, используя отношение количества клеток, несущих фототоксичные белки, к количеству клеток, несущих EGFP (см. рисунок 5).

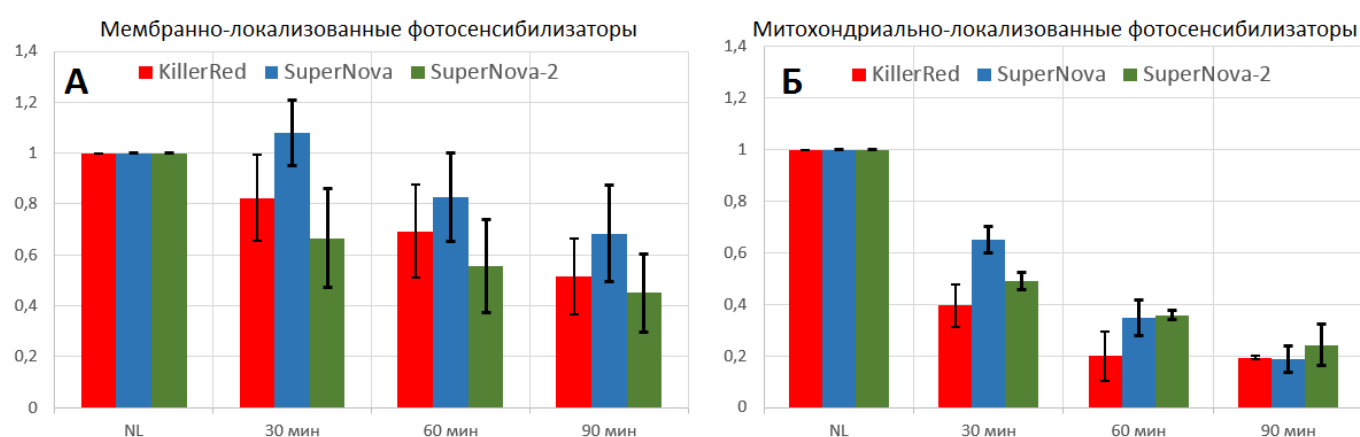


Рисунок 5 – Фототоксичность SuperNova-2, SuperNova и KillerRed в клетках млекопитающих (HEK293). По оси Y отложены значения отношения клеток, несущих фототоксичные белки (KillerRed, SuperNova или SuperNova-2 - красные, синие и зеленые столбцы, соответственно), к клеткам, несущим EGFP. Данные нормированы на отношения в необлученном образце для каждой смеси. Погрешности обозначают стандартное отклонение, $N = 3$.

В экспериментах с мембранной локализацией фотосенсибилизаторов (см. рисунок 5А) белок SuperNova-2 показывал наибольшую фототоксичность относительно других вариантов фотосенсибилизаторов. Особенно ярко преимущество SuperNova-2 было выражено при коротком времени облучения (более предпочтительном для экспериментов), когда белок SuperNova вообще не вызывал заметной гибели клеток.

В митохондриальной локализации (см. рисунок 5Б) при коротком времени облучения фототоксичность KillerRed и SuperNova-2 оказалась выше, чем SuperNova. При увеличении времени облучения доля клеток с фотосенсибилизатором во всех случаях вышла на плато; при этом выжили только клетки с невысоким содержанием фотосенсибилизатора. Это может быть объяснено тем, что при низкой концентрации фотосенсибилизатора в клетке даже длительное

время облучения не приводит к генерированию достаточного для гибели клеток количества АФК. Клетки, несущие нефототоксичный белок mKate2-mito, практически не погибли (за 90 минут облучения их содержание снизилось на 7%).

Митохондриальная локализация для всех фотосенсибилизаторов привела к более сильному фототоксическому эффекту, нежели мембранная. Кроме того, для опытов с мембранной локализацией фотосенсибилизаторов наблюдался больший разброс результатов, чем для митохондриальной. Это позволяет заключить, что для достижения клеточной гибели лучше направлять фотосенсибилизаторы в митохондрии. SuperNova-2 не уступает по фототоксическому эффекту остальным фотосенсибилизаторам, при этом в отличие от KillerRed в растворе ведет себя как мономер, а созревает быстрее, чем SuperNova.

2. Детекция клеточной гибели с помощью флуоресцентных белков

При вызывании клеточной гибели с помощью фотосенсибилизатора необходимо не просто добиться смерти клетки, а вызвать определенный тип клеточной гибели. Это особенно важно для медицинского применения (фотодинамической терапии), где желательно активировать апоптотический путь. Также актуальны и научные исследования процесса апоптоза.

Каспаза-3 – ключевой участник апоптоза, вызванного как внешним, так и внутренним путем активации. Она расщепляет белки, содержащие последовательность аминокислот DEVD (такой же сайт распознавания у каспазы-7; но у каспазы-3 более широкая субстратная специфичность. В значительном количестве клеточных культур апоптоз может нормально протекать в отсутствие каспазы-7, но не каспазы-3. Поэтому далее по тексту будет упоминаться именно каспаза-3). Таким образом, технология, основанная на FRET (Ферстеровском резонансном переносе энергии), подходит для детекции активности данного фермента. При расщеплении каспазой аминокислотного линкера с сайтом узнавания перенос энергии между флуоресцентными белками-донором и акцептором прекращается. Исчезновение FRET можно детектировать различными способами, например, по увеличению интенсивности и времени жизни флуоресценции донора, таким образом выявляя активацию каспазы-3 на уровне единичных живых клеток.

2.1 Выбор белков-доноров и акцептора

Для визуализации клеточных процессов, особенно на уровне целого организма модельных животных, лучше всего подходят сенсоры в дальнекрасной и ближне-инфракрасной областях спектра: такой свет меньше и поглощается тканями, и рассеивается; таким образом, проходящий сигнал будет наиболее корректным.

Из GFP-подобных белков было выбрано несколько вариантов белка-донора:

- mKate2 (улучшенный мономеризованный вариант белка Katushka. Максимум возбуждения 588 нм, максимум эмиссии 635 нм);
- eqFP650 (димерный белок; максимум возбуждения 592 нм, максимум эмиссии 650 нм) – один из самых ярких флуоресцентных белков с максимумом эмиссии с длиной волны более 635 нм;
- eqFP670 (димерный белок; максимум возбуждения 605 нм, максимум эмиссии 670 нм) – обладает высокой фотостабильностью и наиболее длинноволновым максимумом эмиссии флуоресценции среди GFP-подобных белков.

На настоящий момент не известны GFP-подобные белки, обладающие максимумом эмиссии в инфракрасной области спектра. Однако в 2011 году был получен флуоресцентный белок на основе бактериального фитохрома RpVphP2 из фотосинтетической бактерии *Rhodospseudomonas palustris* – с эмиссией, близкой к инфракрасной области спектра. Его флуорофором является молекула линейного тетрапиррола биливердина IX_a, которая ковалентно присоединяется к остатку цистеина полипептидной цепи. Этот белок был назван iRFP (другое название iRFP713). Максимумы поглощения и эмиссии iRFP составляют, соответственно, 690 и 713 нм. Примечательно, что iRFP не требует добавления в среду кофактора биливердина при экспрессии в клетках млекопитающих: он и так присутствует в клетках, поскольку является интермедиатом в метаболизме гема. iRFP обладает повышенной яркостью флуоресценции, внутриклеточной стабильностью и фотостабильностью по сравнению с ранее известными флуоресцентными белками на основе фитохромов. Однако он представляет собой димер, что осложняет конструирование биосенсоров с его использованием. В середине 2016 года были опубликованы мономерные варианты белка iRFP, однако на момент начала нашей работы они не были известны.

Перекрытие спектров эмиссии предполагаемых доноров и поглощения предполагаемого акцептора позволяет предположить, что FRET-сенсор на основе этих белков теоретически обоснован. Соответственно, с целью создания сенсора на активность каспазы-3 было сконструировано и протестировано три варианта FRET-сенсора. Белком-акцептором во всех случаях являлся iRFP, а белок-донор варьировал: mKate2, eqFP650 или eqFP670. В качестве линкера, несущего сайт узнавания каспазы-3, был выбран линкер из известного сенсора на активность каспазы-3 Casper (Евроген) - EFGGSGSDEVVDKLGSGSGT.

2.2 Бактериальная экспрессия сенсоров на активность каспазы-3

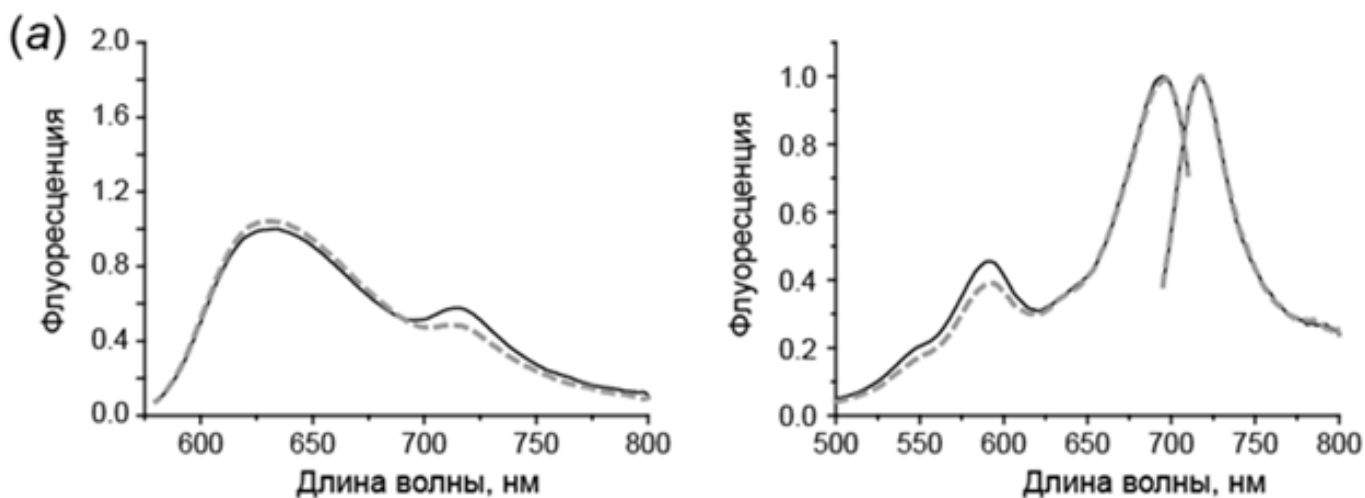
Для экспрессии сенсоров в бактериях *E. coli* были созданы конструкции mKate2-DEVD-iRFP / FP650-DEVD-iRFP / FP670-DEVD-iRFP – в векторе pQE30 (DEVD обозначает линкер, несущий сайт узнавания каспазы-3). В клетках *E. coli* данная плазмида не нуждается в дополнительных компонентах для экспрессии. Плазмида, несущая гем-оксигеназу, необходимую для производства бактериями гема из предшественника (дельта-аминолевулиновой кислоты),

была любезно предоставлена В. Верхушей. Для индукции её экспрессии необходимо экзогенное добавление рамнозы. По этой причине для успешной наработки белков сенсоров в бактериях готовили электрокомпетентные клетки *E.coli* штамма BW25113, которые не усваивают рамнозу. После трансформации клетки, несущие обе плазмиды, растили на чашках Петри при +37°C в течение суток, затем держали еще сутки при +4°C для окончательного созревания белков.

К этому времени колонии, несущие сенсор mKate2-DEVD-iRFP, приобретали сине-зеленую окраску, в то время как колонии с сенсорами FP650-DEVD-iRFP / FP670-DEVD-iRFP оставались практически бесцветными. Колонии флуоресцировали в красной области спектра при анализе с использованием флуоресцентного стереомикроскопа. При этом экспрессия сенсора mKate2-DEVD-iRFP наблюдалась во всех колониях, выросших на соответствующих чашках Петри, в то время как экспрессия FP650-DEVD-iRFP и особенно FP670-DEVD-iRFP была существенно снижена.

Пониженная экспрессия в последних двух случаях относительно первого может быть объяснена димерным состоянием акцептора iRFP в сочетании с димерным состоянием белков-доноров eqFP650 и eqFP670. Возможно, сенсор, состоящий из двух димеризующихся белков, выпадал в осадок/скапливался в клеточных тельцах бактерий и созревал менее успешно, чем сенсор, состоящий из димеризующегося и мономерного белков (mKate2-DEVD-iRFP).

Несмотря на существенную разницу в уровне экспрессии, было проведено выделение каждого из трех сенсоров на смоле TALON (металло-аффинная хроматография) с помощью His-tag, присутствующего на N-конце сенсора. Некоторое количество каждого варианта развели буфером PBS, и для них были измерены спектры эмиссии при возбуждении донора (см. рисунок 6, левые панели) и возбуждения и эмиссии для акцептора (см. рисунок 6, правые панели). Такое же количество белка развели и обработали каспазой-3, после чего измерили те же спектры (см. рисунок 6, пунктирные линии).



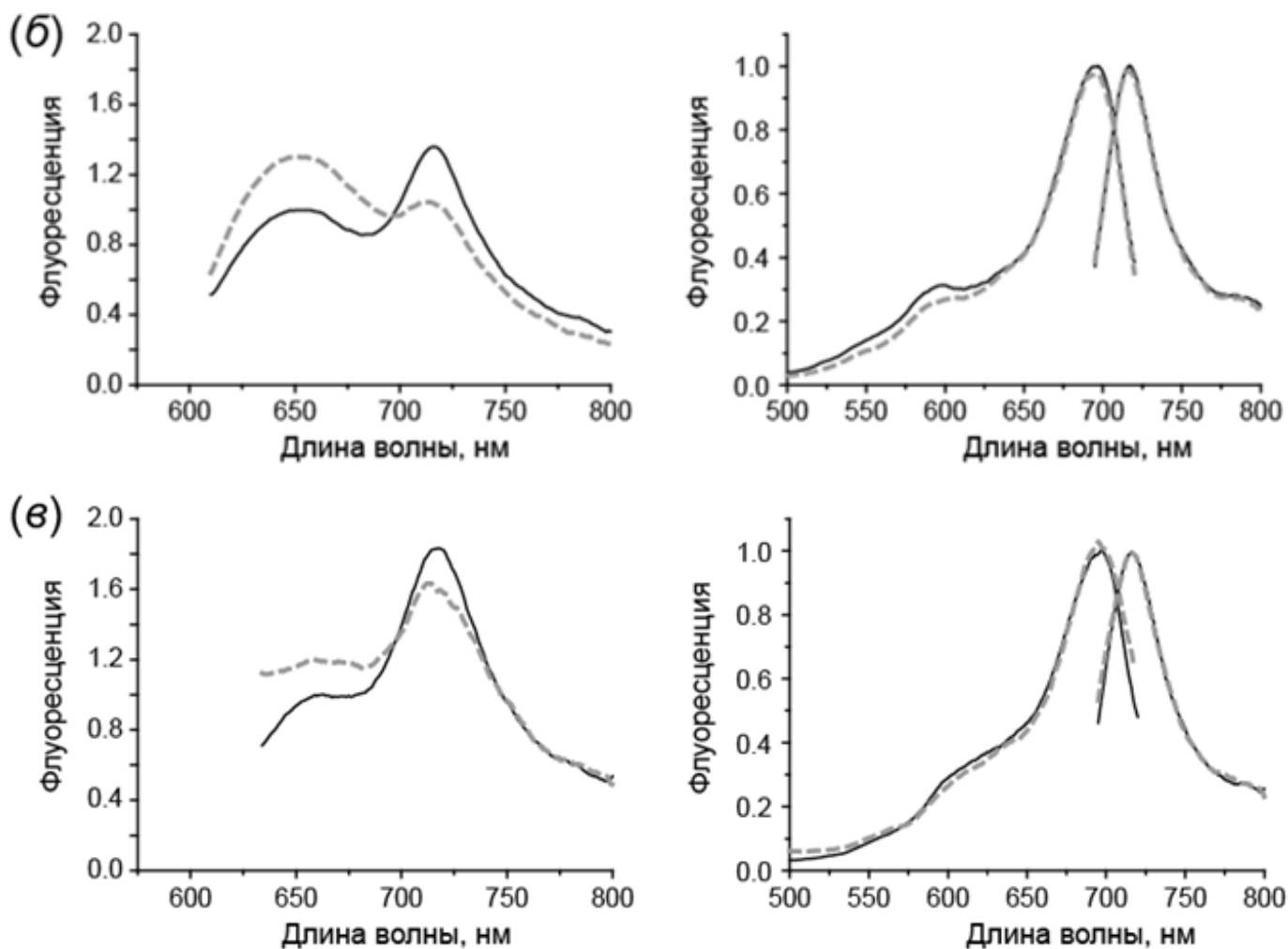


Рисунок 6 – Спектры флуоресценции химерных белков *mKate2-DEVD-iRFP* (а), *FP650-DEVD-iRFP* (б), *FP670-DEVD-iRFP* (в). На каждой панели слева показаны спектры эмиссии при возбуждении донора, справа – спектры возбуждения и эмиссии акцептора. Сплошными линиями показаны спектры образцов до обработки каспазой-3, пунктирными – после обработки.

Все варианты сенсора при обработке каспазой-3 показали разную амплитуду изменений - при общей тенденции изменения сигнала. При возбуждении донорного белка после обработки каспазой интенсивность его эмиссии увеличивалась по сравнению с возбуждением до обработки. При этом интенсивность эмиссии акцепторного белка, соответственно, снижалась; а в спектре возбуждения акцептора наблюдалось уменьшение вклада пика возбуждения донора.

Самое значительное изменение спектров возбуждения и эмиссии наблюдали для сенсора *FP650-DEVD-iRFP* (примерно 30%). Минимальные – для *mKate2-DEVD-iRFP*; однако эта конструкция демонстрировала лучшую эффективность экспрессии в бактериях.

Конструкция *FP670-DEVD-iRFP* демонстрировала самую низкую эффективность экспрессии при сравнительно небольшом изменении спектров после обработки каспазой-3, поэтому от этого варианта сенсора было решено в дальнейшем отказаться.

2.3 Эукариотическая экспрессия сенсоров на активность каспазы-3

Все три варианта полученных в данной работе сенсоров обладают четко выраженным спектральным ответом на обработку каспазой-3, однако динамический диапазон этих изменений заметно уступает таковому для лучших описанных в литературе сенсоров этого класса, например, Casper3-GR. Тем не менее, большая часть используемых в настоящее время FRET-пар белков, подходящих для рациометрической флуоресцентной микроскопии, занимает наиболее популярные каналы для флуоресцентной микроскопии (синий, зеленый, желтый). То есть, с помощью них не всегда возможно осуществить мультиканальное одновременное наблюдение за несколькими процессами. Кроме того, важная причина необходимости сдвига в дальневолновую область спектра – пониженное поглощение и рассеяния света тканями животных.

Таким образом, в связи с актуальностью сенсоров в дальнекрасной области спектра было решено проверить в эукариотической экспрессии два варианта из трех: mKate2-DEVD-iRFP и FP650-DEVD-iRFP. Для этого было проведено клонирование конструкций для временной экспрессии (в N1-вектор), а также конструкций для создания лентивирусных частиц (вектор pLVT1), чтобы достичь постоянной экспрессии сенсоров в стабильной клеточной линии.

В отличие от бактерий, в клетках млекопитающих биливердин, необходимый для созревания iRFP, присутствует в качестве промежуточного соединения в метаболизме гема; поэтому внесение плазмиды для его дополнительной наработки не является необходимым.

2.3.1 Распределение сенсоров по цитоплазме в зависимости от условий инкубации

Сенсоры mKate2-DEVD-iRFP и FP650-DEVD-iRFP были успешно экспрессированы в клетках эукариот: временно – в человеческих культурах HeLa Kyoto и HEK293 и постоянно – в мышинных клетках CT26. Особый интерес вызвало то, что сенсоры по-разному распределяются в цитоплазме в зависимости от клеточной культуры и условий инкубации. mKate2-DEVD-iRFP равномерно распределяется по цитоплазме во всех протестированных культурах клеток. FP650-DEVD-iRFP в клетках HeLa Kyoto также распределен равномерно, а в CT26 и HEK293 может дополнительно формировать яркие «фокусы» (см. рисунок 7), распределенные по цитоплазме. Если клетка находится в оптимальной питательной среде и условиях, то они возникают крайне редко (не более 0.5% клеток). «Фокусы» появляются при обрабатывании клеток стауроспорином или смене среды на раствор, обедненный питательными веществами, а также на раствор с pH, отличающимся от физиологического значения (как в меньшую, так и большую сторону). В последних двух случаях «фокусы» исчезают и сенсор вновь распределяется равномерно по цитоплазме через несколько минут после возвращения клеток в питательную среду с pH 7.4.

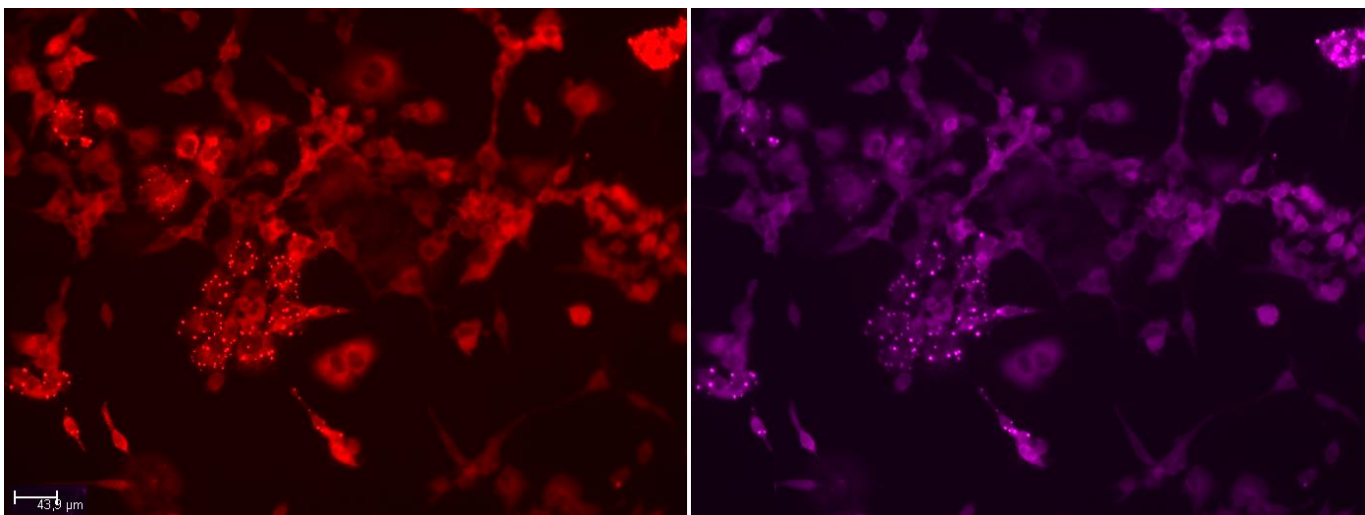


Рисунок 7 – Клетки линии CT26, стабильно экспрессирующие сенсор FP650-DEVD-iRFP, уравновешены до pH 6.0. Красным псевдоцветом окрашен канал TX2 (красный), фиолетовым – Y5 (ближне-инфракрасный).

В клетках HEK293 апоптоз стауроспорином вызвать не удалось. Тестировали как обычную (5 мкг/мл), так и пониженную до 1 мкг/мл, и повышенную до 10 мкг/мл концентрации. В первых двух случаях клетки формировали фокусы, однако не умирали в течение 15 часов; в последнем – через 1-2 часа погибали путем некроза.

Природа формирования «фокусов» до конца не ясна; мы предполагаем, что это агрегаты сенсора, поскольку оба белка (и донор, и акцептор) в составе химерного являются димерными. Возможно, в случае некомфортных условий для клетки её ионный состав цитоплазмы меняется таким образом, что способствует усилению агрегации данных белков. Теоретически, данное свойство FP650-DEVD-iRFP можно было бы использовать для детекции клеточного стресса у некоторых культур; однако необходимо дополнительное исследование причин, вызывающих данное явление.

2.3.2 Развитие сигнала сенсора при индукции апоптоза

Основные эксперименты по индукции апоптоза проводили с помощью стауроспорина – антибиотика, выделенного из бактерии *Streptomyces staurosporeus*. Он является ингибитором различных киназ, конкурируя с АТФ за взаимодействие с АТФ-связывающим сайтом. Он не обладает выраженной специфичностью, из-за чего не может быть применен в медицинских целях, однако подходит для научных исследований. До недавнего времени считалось, что стауроспорин активирует апоптоз через митохондриальный (внутренний) путь.

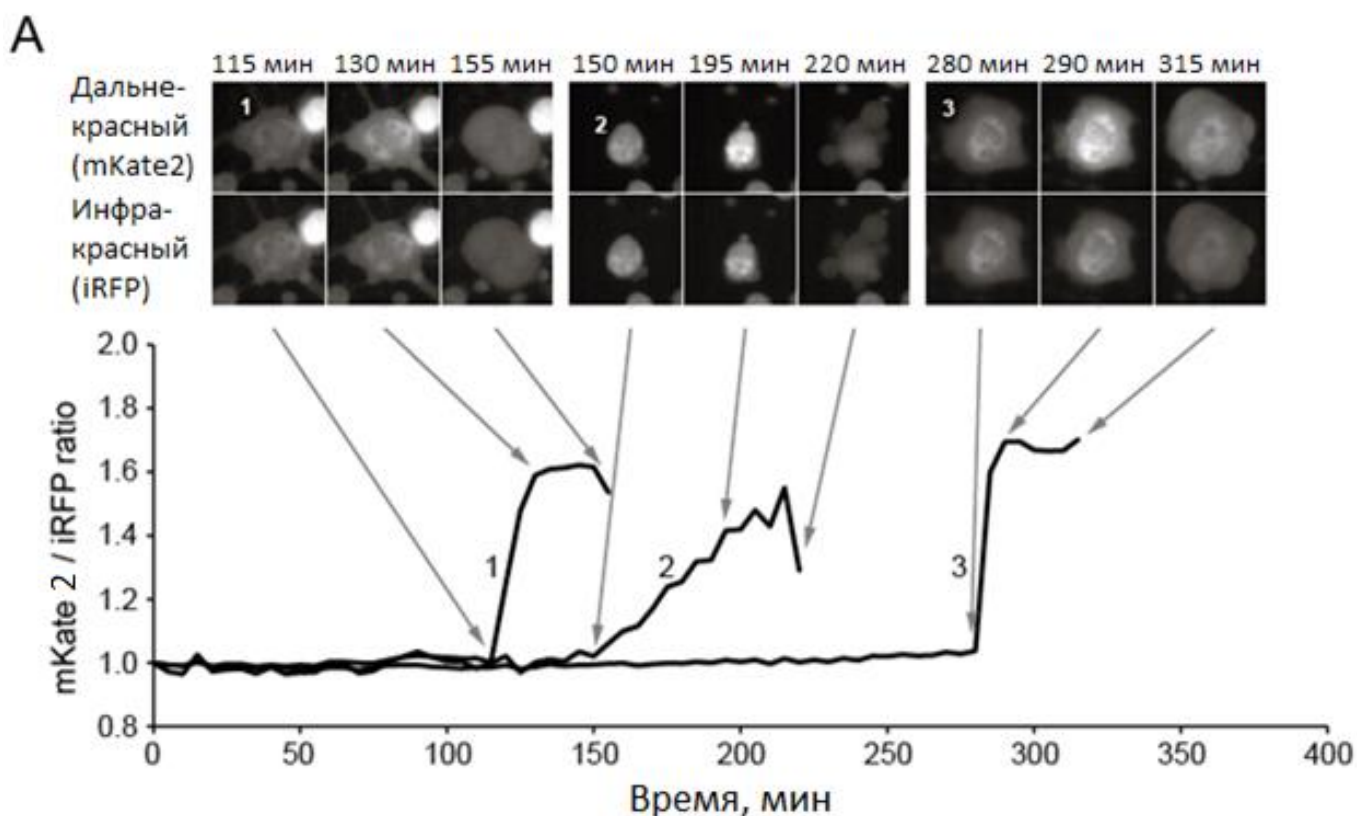
В первую очередь, mKate2-DEVD-iRFP и FP650-DEVD-iRFP тестировали при временной экспрессии в клетках HeLa Kyoto; затем были получены клеточные линии CT26, постоянно экспрессирующие данные сенсоры. Для исследования использовали термостатируемую камеру с температурой +37°C. Апоптоз вызывали добавлением стауроспорина до конечной концентрации 5 мкг/мл; при этом в среднем клеточная гибель начиналась через 3-4 часа после добавления агента.

Для того, чтобы метод был рациометричным, сигнал от донора (в красном канале, после вычитания фоновой флуоресценции) нормировали на сигнал акцептора (в инфракрасном канале, также после вычитания фоновой флуоресценции). Таким образом изменение сигнала от донора было обусловлено только изменением FRET между ним и акцептором, а не изменением формы клетки.

При этом каждый белок возбуждали соответствующим светом: донор – зеленым, активирующий именно донор, акцептор – красным, активирующим только акцептор. Отсутствие засвечивания донора в инфракрасный канал было проверено с помощью временной трансфекции плазмиды, кодирующей только белок-донор: mKate2 или eqFP650.

На обеих клеточных культурах наблюдалось примерно одинаковое увеличение сигнала донора после активации апоптоза, - на 40-60% по сравнению с исходным (см. рисунок 8). Для вычисления среднего значения было обчислено около 70 клеток для каждого сенсора.

Для клеточных культур, временно трансфицированных контрольными плазмидами (в них последовательность DEVD заменена на DEVG), развитие сигнала сенсора при индукции апоптоза отсутствовало. Это позволило заключить, что увеличение флуоресценции донора отражает момент активации каспазы-3 и прекращение FRET, как показано для аналогичных сенсоров на каспазу-3.



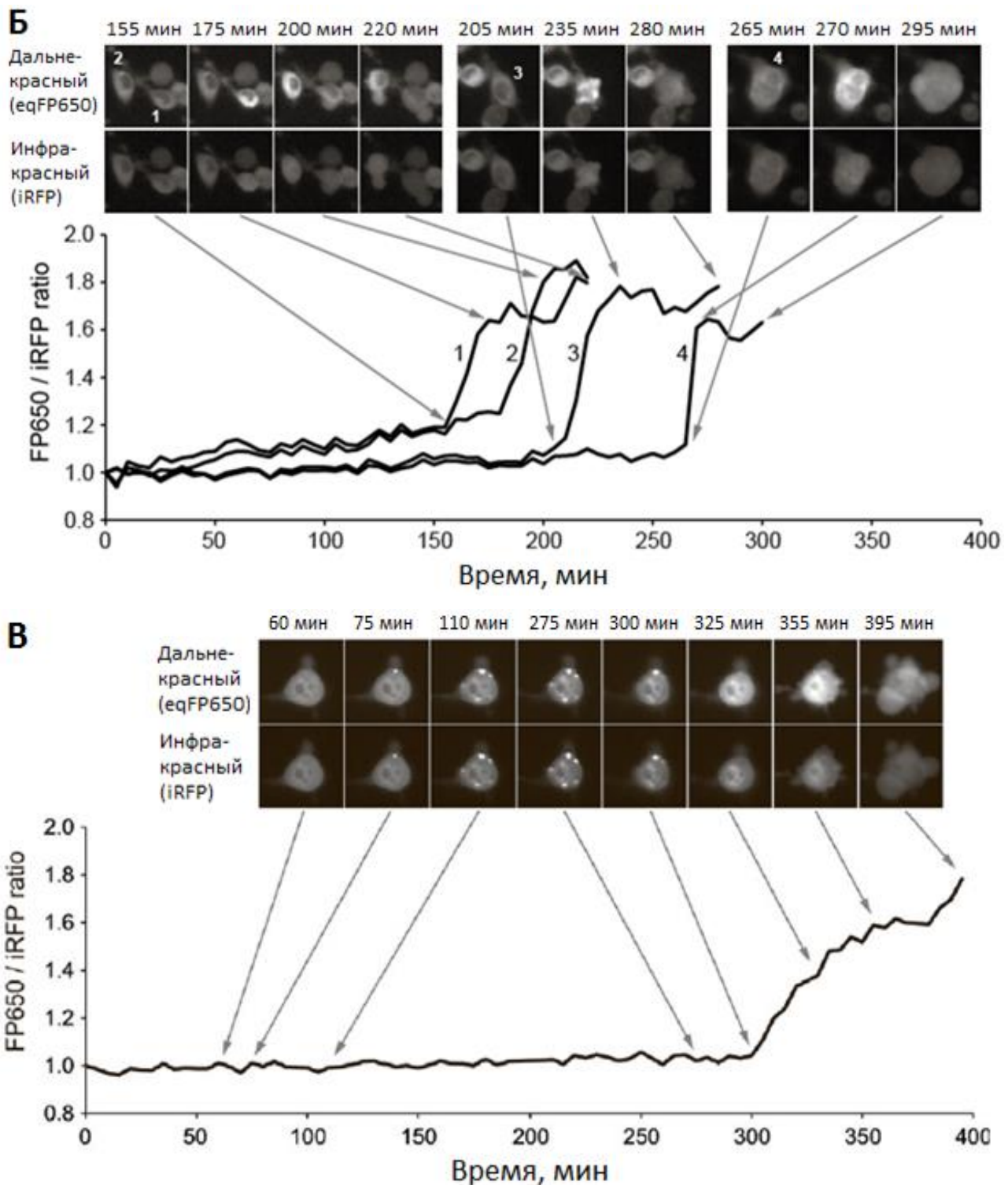


Рисунок 8 – Пример развития апоптоза и активации сенсора для клетки, экспрессирующей А: сенсор *mKate2-DEVD-iRFP* и Б, В: сенсор *FP650-DEVD-iRFP*. На графике В представлен пример клетки, формирующей “фокусы” после добавления стауроспорина в среду.

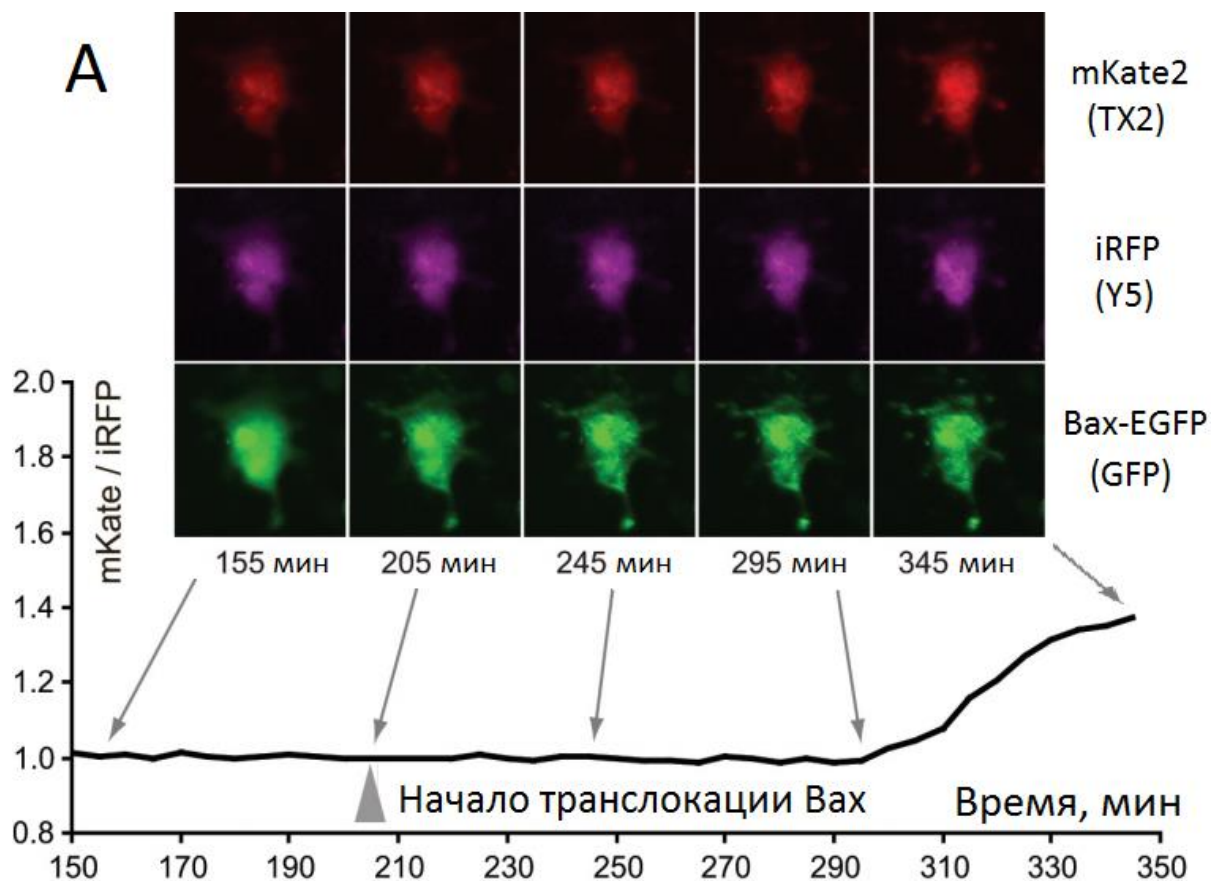
Увеличение сигнала доноров при экспрессии в эукариотических клетках превосходит изменения, происходящие в спектре сенсоров при обработке последних каспазой-3 *in vitro*. Мы предполагаем, что причиной таких различий может быть: а) неполное разрезание каспазой белка *in vitro* и/или б) неполное созревание акцептора (iRFP) при бактериальной экспрессии.

2.3.3 Одновременная детекция активности каспазы-3 и транслокации Вах в процессе апоптоза

Одним из важных преимуществ красного-дальнекрасного сенсора на активность каспазы-3 является освобождение популярных (синего, зеленого, желтого) каналов для одновременной детекции нескольких клеточных процессов. Следующим этапом проверки работы сенсора, соответственно, стало мультиканальное наблюдение за развитием апоптоза.

Белок Вах является важным участником митохондриального пути активации каспаз. При развитии апоптоза по внутреннему пути, Вах, свободно плавающий в цитоплазме, встраивается в митохондриальную мембрану, тетрамеризуется и формирует особую пору, через которую цитохром С вытекает из митохондрии в цитоплазму. Следствием этого является активация регуляторной каспазы-9, которая в свою очередь активирует эффекторные каспазы (в частности, каспазу-3). Таким образом, ожидаемая хронология событий при индукции апоптоза стауроспорином была следующей: сначала Вах, слитый с EGFP, должен быть равномерно распределенным в цитоплазматической локализации; затем транслоцироваться в митохондрии, а через некоторое время должна активироваться каспаза-3, о чем станет известно благодаря сенсору.

К нашему удивлению, описанный выше порядок развития событий наблюдался крайне редко (не более 10% случаев, 4 клетки) – см. рисунок 9А. Преимущественно сначала происходила активация каспазы-3, а затем – перераспределение Вах-EGFP между цитоплазмой и митохондриями (более 90%, 54 клетки) – см. рисунок 9Б.



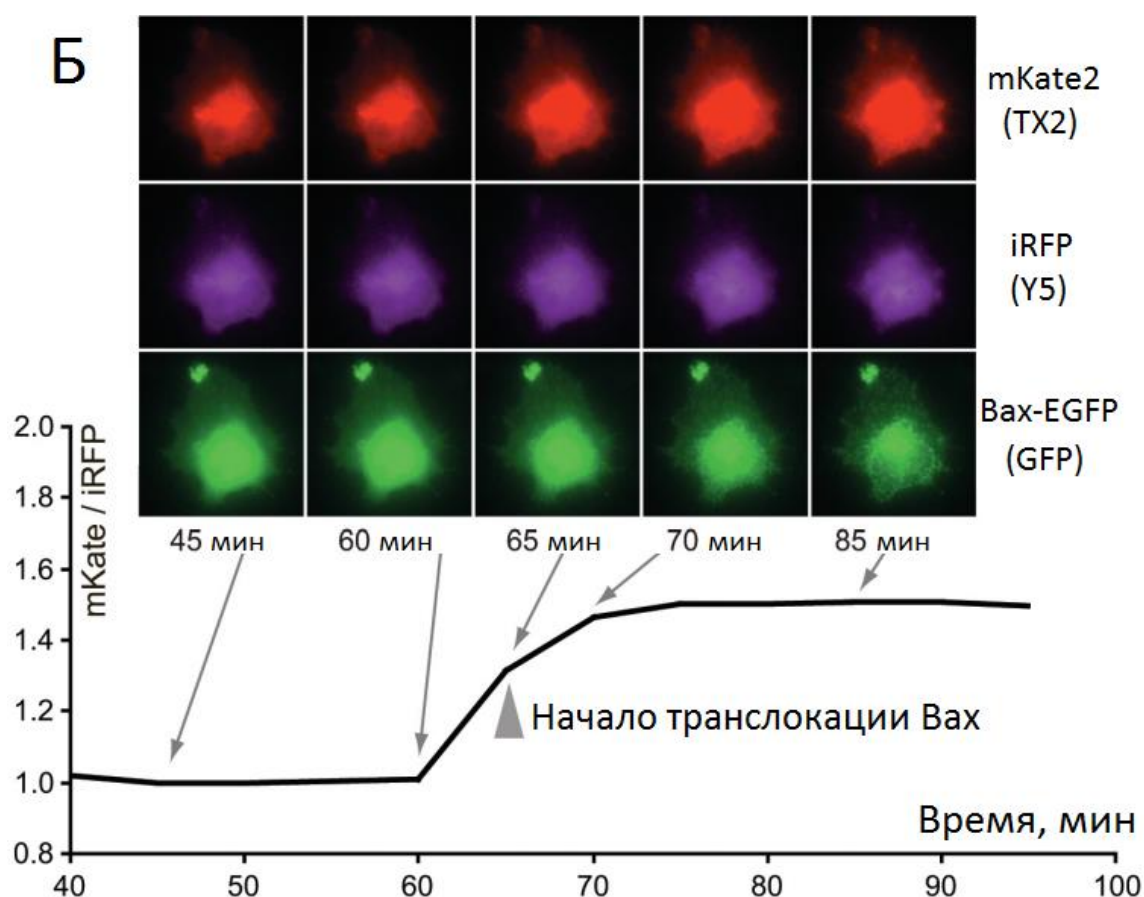


Рисунок 9 – Порядок развития событий в процессе апоптоза у клеток СТ26, постоянно экспрессирующих ген сенсора на активность каспазы-3 и временно – EGFP-Вах: красный и инфракрасный каналы – детекция активности каспазы-3, зеленый – перераспределение Вах-EGFP из цитоплазмы в митохондрии. А: пример ожидаемой хронологии (была менее чем в 10% случаев); Б: пример обратной хронологии (более 90% случаев).

Полученные данные согласуются с результатами, недавно полученными другой группой ученых. Используя различные блокаторы митохондриального пути активации апоптоза (гиперэкспрессия антиапоптотических белков Bcl2 и Bcl-x_L; нокаут адаптерного белка Араf-1, необходимого для формирования апоптосомы и активации каспазы-9), а также внешнего пути через рецепторы смерти (нокаут FADD или каспазы-8), они показали, что стауроспорин помимо обычного митохондриального пути инициирует путь, не связанный с цитохромом с и апоптосомой. В нем, по-видимому, напрямую активируется регуляторная каспаза-9, которая в свою очередь активирует каспазу-3.

Поскольку в данной работе блокаторы каких-либо путей не были использовали, оба процесса протекали параллельно. Прямая активация каспазы-9 может быть более быстрым процессом, чем митохондриальный путь с большим количеством посредников; поэтому логично ожидать более раннего развития сигнала сенсора на каспазу-3, чем перераспределения Вах. Отдельные клетки, у которых наблюдалась обратная картина, могут отличаться от основной культуры по уровню экспрессии тех или иных ключевых проапоптотических белков, что определило эффективность митохондриального развития апоптоза.

2.3.4 Одновременная детекция активности каспазы-3 и изменения рН в цитоплазме в процессе апоптоза

Внутриклеточный рН играет важную роль в поддержании нормального функционирования клетки, и данный параметр обычно распределен в сравнительно узком диапазоне. Известно, что при различных событиях в клетке происходит изменение рН цитоплазмы (например, корректировка рН необходима для активации некоторых ферментов). Процесс апоптоза в ряде случаев характеризуется закислением цитоплазмы; существует предположение, что в зависимости от пути активации снижение рН может быть каспаз-зависимым (в случае внешнего пути) или каспаз-независимым (при внутреннем пути). При использовании стауроспорина для достижения апоптоза было показано, что закисление происходит до активации каспаз, и была даже выдвинута гипотеза о том, что понижение рН является ранним событием в митохондриальном пути активации каспаз.

Для одновременной детекции активности каспазы-3 и изменения рН в цитоплазме в процессе апоптоза мы использовали сенсоры mKate2-DEVD-iRFP и SypHer. SypHer - генетически кодируемый радиометрический рН-индикатор, полученный из сенсора HyPer. В его состав входит флуоресцентный белок cpYFP и OxyR-RD. Сигнал для этого сенсора необходимо регистрировать в двух каналах, возбуждая ультрафиолетовым и синим светом, поскольку при изменении рН меняется соотношение пиков возбуждения (420 и 500 нм).

Оптимально было бы использовать один регистрирующий флуоресценцию канал, с возбуждением разной длиной волны; однако, поскольку соответствующего фильтра в нашем распоряжении не имелось, мы использовали регистрацию флуоресценции в циановом (CFP, фильтр возбуждения - BP 436/20 нм, флуоресценции - BP 480/40) и зеленом (GFP, фильтр возбуждения - BP 470/40 нм, флуоресценции - BP 525/50) каналах. Изменение соотношения цианового к зеленому сигналов (т.е. вклада возбуждения ультрафиолетовым и синим светом) дает представление об изменении концентрации ионов водорода (увеличение этого соотношения показывает закисление цитоплазмы, а уменьшение - защелачивание).

Была получена клеточная линия, стабильно экспрессирующая ген сенсора на каспазу-3 и SypHer. Для этого уже имеющуюся линию с сенсором mKate2-DEVD-iRFP трансдуцировали лентивирусом, несущим SypHer (плазмида любезно предоставлена д.б.н. В.В. Белоусовым). Для визуализации клеточных процессов использовали четыре канала: красный и инфракрасный (для отслеживания mKate2-DEVD-iRFP) и циановый и зеленый (для SypHer).

Активация апоптоза с помощью стауроспорина

Сразу после добавления стауроспорина в среду к клеткам наблюдалось постепенное значительное увеличение отношения цианового к зеленому сигналу SypHer, демонстрирующее закисление цитоплазмы (см. рисунок 10). В процессе развития клеточной гибели резкое падение отношения цианового к зеленому сигналу свидетельствовало о повреждении наружной мембраны.



Рисунок 10 – Типичный пример изменения отношения цианового к зеленому сигналу SypHer в клетке, погибшей путем апоптоза после добавления стауроспорина. Отношение нормировано на значение в нулевой точке (сразу после добавления стауроспорина в среду к клеткам). На первом этапе происходит закисление цитоплазмы, затем защелачивание, соответствующее повреждению наружной мембраны.

В ряде случаев за 5-10 минут до начала увеличения сигнала от сенсора mKate2-DEVD-iRFP наблюдалось дополнительное небольшое закисление (см. рисунки 10, 11), что подтверждает данные литературы о возможной корреляции этих событий. Однако, эффект не характеризуется высокой амплитудой, поэтому необходимо дальнейшее исследование данного явления на увеличенной выборке.

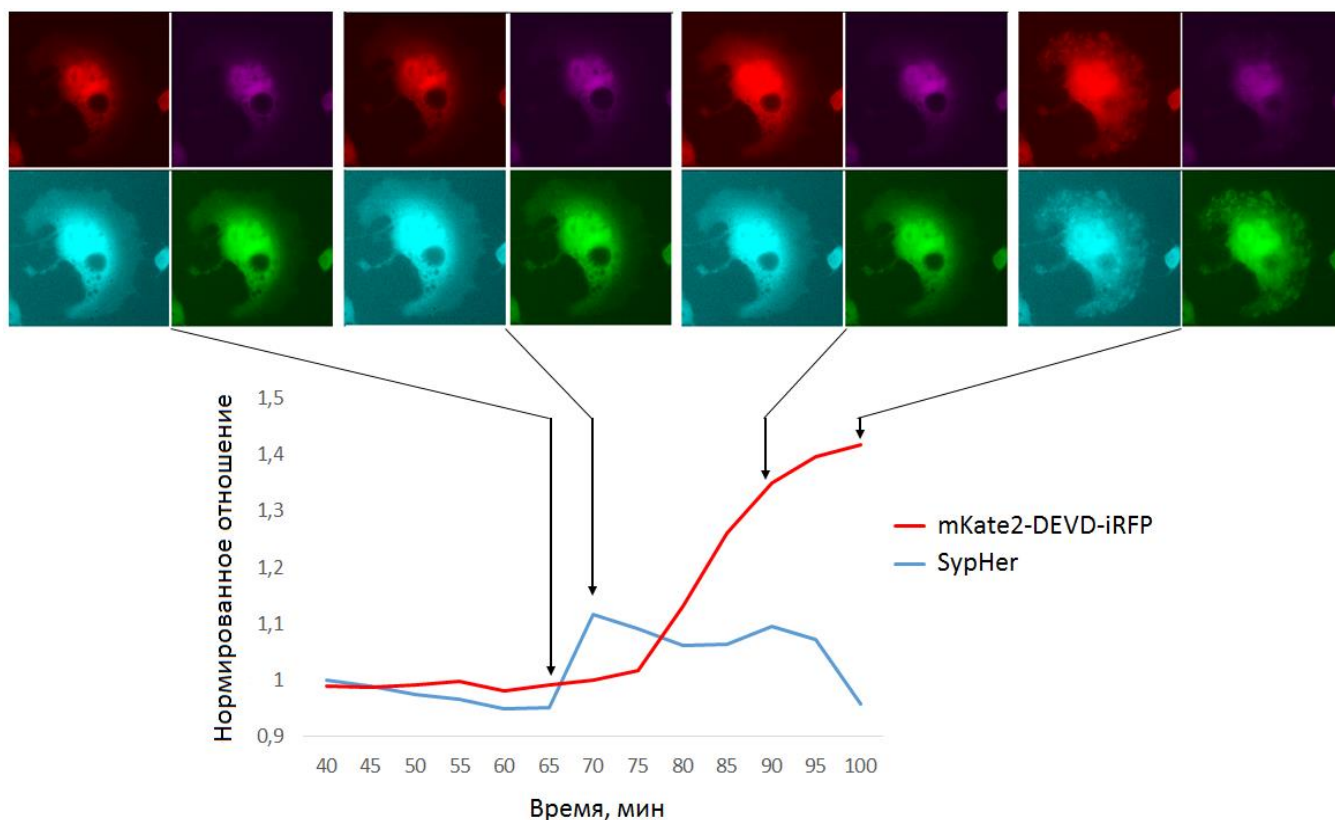


Рисунок 11 – Порядок развития событий в процессе апоптоза: красный и инфракрасный каналы – детекция активности каспазы-3, голубой и зеленый – закисление цитоплазмы.

Активация апоптоза с помощью цисплатина

В качестве альтернативного препарата для активации апоптоза был выбран цисплатин - цитотоксическое вещество, широко применяющееся в медицине как противоопухолевое средство. Повреждающий эффект основан на образовании координационных связей между атомом платины, входящей в состав лекарства, с двумя основаниями ДНК (чаще всего гуаниновыми). Образующиеся внутри- и межнитевые сшивки препятствуют репликации ДНК, что ведет к остановке клеточного цикла и апоптозу.

Добавление цисплатина до конечной концентрации 2.2 мкМ приводило к гибели клеток путем апоптоза через 2-9 часов. В отличие от стауроспорина, до начала клеточной гибели цисплатин вызывал менее значительный эффект закисления цитоплазмы (см. рисунок 12). При этом клетки реагировали более неоднородно, чем при добавлении стауроспорина: у значительной части (11 против 9 клеток) существенного закисления цитоплазмы до активации каспазы-3 не наблюдалось (разница в сигнале SypHer по сравнению с первоначальным составила не более 10%).

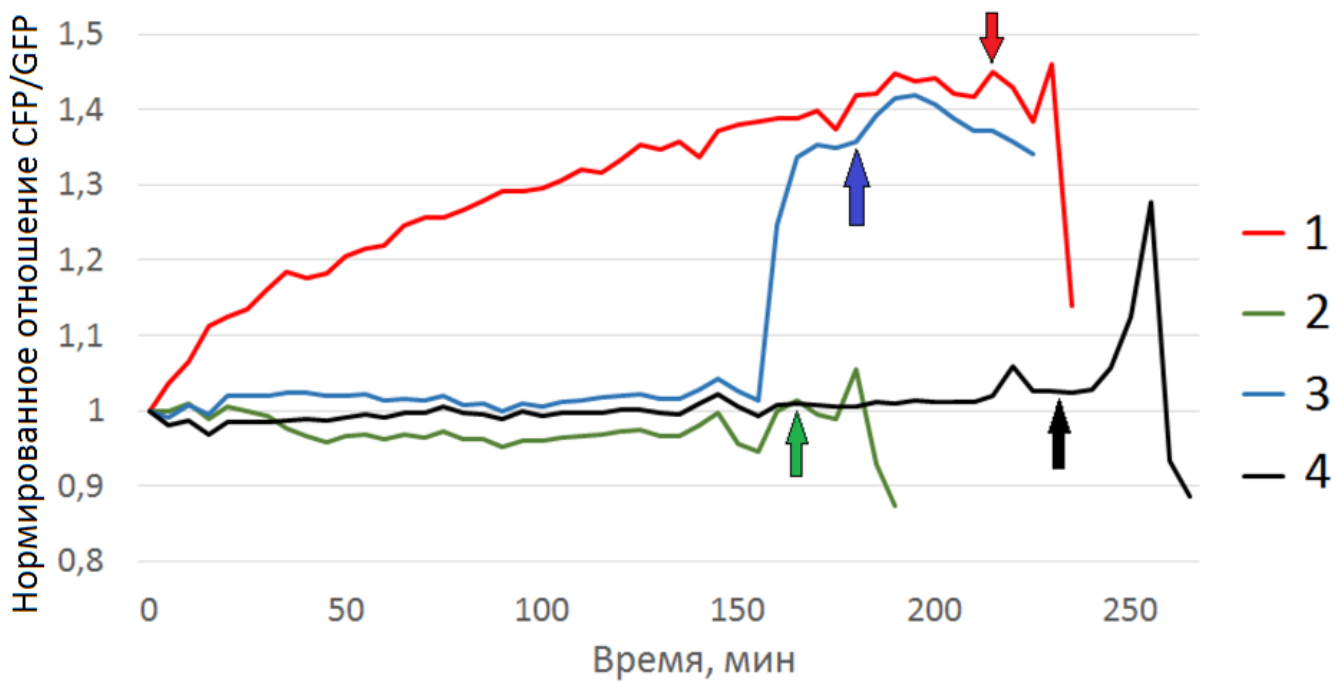


Рисунок 12 – Изменение соотношения цианового к зеленому сигналу *SypHer* после добавления цисплатина к клеткам, впоследствии погибшим путем апоптоза, нормированное на нулевую точку. Клетка №1 - пример постепенного закисления цитоплазмы без резкого изменения во время активации каспазы-3; клетка №2 - пример отсутствия закисления цитоплазмы, несмотря на гибель путем апоптоза; Клетка №3 - пример закисления цитоплазмы незадолго до активации каспазы-3; клетка №4 - пример закисления цитоплазмы после активации каспазы-3. Стрелками отмечено время начала активации каспазы-3.

Неоднородность реакции клеток при обрабатывании цисплатином проявилась и в процессе апоптоза. У 50% клеток произошло резкое падение pH на финальной стадии гибели. Однако даже в данном случае не было однозначной корреляции этого события с активацией каспазы-3: закисление могло произойти как до, так и после активации (см. рисунок 13).

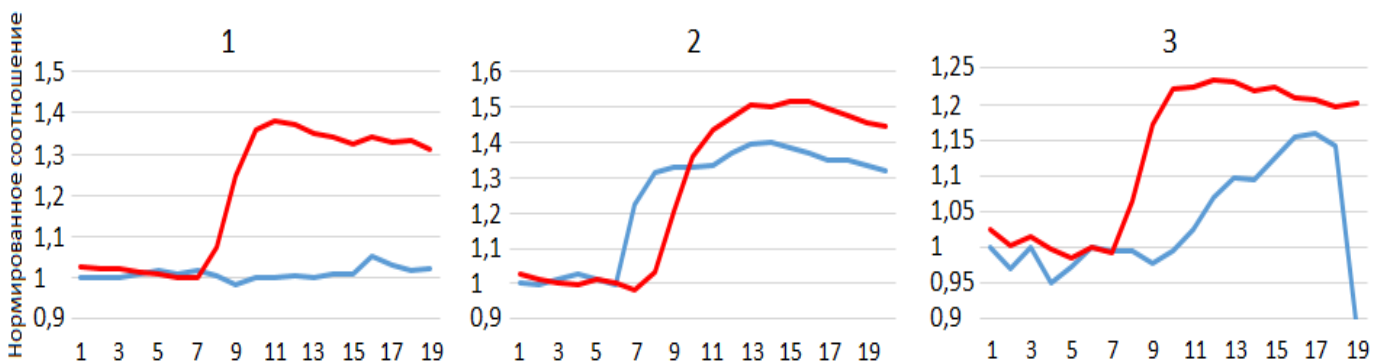


Рисунок 13 – Порядок развития событий в процессе апоптоза: красная линия – нормированный на начало развития сигнал сенсора *mKate2-DEVD-iRFP*, синяя линия – сигнал сенсора *SypHer*, нормированный на уровень за 25 минут до начала развития сигнала на активность каспазы-3. Съемка с промежутком 5 минут. 1 - пример клетки без значительного (разница сигнала *SypHer* < 10%) закисления цитоплазмы в период активации каспазы-3 (50% клеток), 2 - пример клетки с закислением цитоплазмы, предшествующим активации каспазы-3 (25% случаев), 3 - пример клетки с закислением цитоплазмы после активации каспазы-3 (25% случаев).

Отсутствие однозначной корреляции между закислением цитоплазмы и активацией каспазы-3 при достижении апоптоза с помощью цисплатина позволяет предположить, что данные явления не связаны прямой причинно-следственной связью. Механизм апоптоза, вызываемый цисплатином, возможно, протекает через несколько параллельных путей, и сильно отличается от такового для стауроспорина:

- во-первых, закисление цитоплазмы при использовании цисплатина не столь значительно;
- во-вторых, активация каспазы-3 в случае цисплатин-опосредованной гибели происходит ближе по времени к началу фрагментации клетки (за 5-10 минут до этого события, в то время как для стауроспорин-индуцируемого апоптоза проходит 20-30 минут от начала активации каспаз до появления мембранных пузырьков).

Полученные результаты экспериментов (коэкспрессия сенсора mKate2-DEVD-iRFP с Вах и SypHer, а также параллельное отслеживание изменения цитоплазматического рН с помощью сенсора SypHer при вызывании апоптоза разными стимулами) позволяют утверждать, что созданный сенсор на активность каспазы-3 – перспективный инструмент для исследования механизмов апоптоза. Данный сенсор был также успешно использован для детекции апоптоза, вызванного лизосомально локализованным фотосенсибилизатором; кроме того, он был успешно применен в технологии FLIM (см. раздел “опубликованные статьи”).

Выводы

1. Флуоресцентный белок KillerOrange проявляет высокую фототоксичность в клетках млекопитающих (локализация в матриксе митохондрий) при облучении синим, но не оранжевым светом. KillerOrange может быть использован совместно с белком KillerRed, который проявляет фототоксичность при облучении оранжевым, но не синим светом.
2. Мономерный флуоресцентный белок SuperNova-2 в клетках млекопитающих (локализация в матриксе митохондрий) обладает фототоксичностью, сходной с таковой димерного белка KillerRed и превосходящей фототоксичность белка SuperNova для малых времен облучения.
3. Продемонстрирована возможность использования ближнеинфракрасного флуоресцентного белка iRFP на основе бактериофитохрома в качестве акцептора для ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET) с дальнекрасных флуоресцентных белков mKate2, eqFP650 и eqFP670.
4. На основе FRET-пары mKate2- iRFP создан дальнекрасный генетически кодируемый сенсор активности каспазы-3. Показана его применимость для многоцветной флуоресцентной микроскопии с одновременной визуализацией активации каспазы-3 и таких процессов как транслокация проапоптотического белка Вах или изменение кислотности среды в ходе клеточной гибели.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи

1. Sergeeva TF, Shirmanova MV, **Zlobovskaya OA**, Gavrina AI, Dudenkova VV, Lukina MM, Lukyanov KA, Zagaynova EV (2017) Relationship between intracellular pH, metabolic co-factors and caspase-3 activation in cancer cells during apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1864(3):604-611.
2. Ryumina AP, Serebrovskaya EO, Staroverov DB, **Zlobovskaya OA**, Shcheglov AS, Lukyanov SA, Lukyanov KA (2016) Lysosome-associated miniSOG as a photosensitizer for mammalian cells. *Biotechniques* 61(2):92-4.
3. **Zlobovskaya OA**, Sergeeva TF, Shirmanova MV, Dudenkova VV, Sharonov GV, Zagaynova EV, Lukyanov KA (2016) Genetically encoded far-red fluorescent sensors for caspase-3 activity. *Biotechniques* 60(2):62-8.
4. Sarkisyan KS, **Zlobovskaya OA**, Gorbachev DA, Bozhanova NG, Sharonov GV, Staroverov DB, Egorov ES, Ryabova AV, Solntsev KM, Mishin AS, Lukyanov KA (2015) KillerOrange, a Genetically Encoded Photosensitizer Activated by Blue and Green Light. *PLoS One* 10(12):e0145287.
5. **Злобовская ОА**, Саркисян КС, Лукьянов КА (2015) Инфракрасный флуоресцентный белок iRFP как акцептор для резонансного переноса энергии возбуждения. *Биоорганическая Химия*, том 41, № 3, с. 299–304

Патенты

Патент РФ № 2535981. Лукьянов Константин Анатольевич, **Злобовская Ольга Анатольевна**. Нуклеиновая кислота, кодирующая основанный на FRET дальне-красный биосенсор для измерения активности каспазы-3 внутри клеток.

Тезисы докладов на конференциях

1. **Злобовская О.А.**, Саркисян К.С., Горбачев Д.А., Мишин А.С., Лукьянов С.А., Лукьянов К.А. Светозависимая активация и детекция клеточной гибели с помощью флуоресцентных белков. XXIX Зимняя молодежная научная школа ИБХ РАН, 2017, Москва.
2. **Zlobovskaya O.A.**, Sarkisyan K.S., Gorbachev D.A., Mishin A.S., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A. Optogenetic approaches to induce and monitor cell death. *Biomembranes 2016: Mechanisms of Aging and Age-Related Diseases*, 2016, Dolgoprudny, Russia.
3. Т.Ф.Сергеева, **О.А. Злобовская**, М.В. Ширманова, В.В. Дуденкова, А.И. Гаврина, Г.С. Перельман, К.А. Лукьянов, Е.В. Загайнова. Анализ внутриклеточного pH и метаболизма в опухолевых клетках при апоптозе на основе FLIM-FRET имиджинга. *ADFLIM*, 2016, Сочи, Россия.
4. T.F. Sergeeva, M.V. Shirmanova, V.M. Dudenkova, **O.A. Zlobovskaya**, E.V. Zagaynova and K.A. Analysis of dynamics of a caspase-3 activity in cancer cells during apoptosis using FLIM/FRET technique. *Saratov Fall Meeting*, 2015, Saratov, Russia.

Подписано в печать 03.07.2017 г.

Формат А4/2

Бумага офсетная. Печать цифровая.

Тираж 70 экз.

Заказ № 0000-0-00

Типография "МДМпринт"

119146, г. Москва, Комсомольский пр-т, д.28

Тел. 8 (495) 256-10-00