

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
чл.-корр. РАН, д.б.н. Лукьянов К.А.

Москва – 2017

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРЫ И КЛЕТОЧНАЯ ГИБЕЛЬ.....	7
1.1.1 Фотосенсибилизаторы и механизмы образования АФК.....	7
1.1.2 Возможные молекулярные механизмы клеточной гибели при воздействии ФС.....	14
1.1.3 Генетически кодируемые фотосенсибилизаторы. Семейство <i>KillerRed</i>	21
1.2 АПОПТОЗ И СЕНСОРЫ ДЛЯ ЕГО ДЕТЕКЦИИ	36
1.2.1 Введение	36
1.2.2 Механизмы развития апоптоза.....	37
1.2.3 Каспазы	40
1.2.4 Каспаза-3	42
1.2.5 Апоптоз, некроз и медицинская терапия	45
1.2.6 Сенсоры для детекции апоптоза	46
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	59
2.1 МАТЕРИАЛЫ.....	59
2.2 МЕТОДЫ	62
2.2.1 Получение генетических конструкций.....	62
2.2.2 Работа по выделению белка	66
2.2.3 Работа с клеточными культурами.....	68
2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	74
3.1 СВЕТОИНДУЦИРУЕМАЯ ГИБЕЛЬ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ С ПОМОЩЬЮ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ.....	74
3.1.1 <i>KillerOrange</i> : первый генетически кодируемый фотосенсибилизатор в оранжевой области спектра.....	75
3.1.2 <i>SuperNova</i> и <i>SuperNova-2</i> : мономерные варианты <i>KillerRed</i>	79
3.2 ДЕТЕКЦИЯ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ.....	84
3.2.1 Выбор белков-доноров и акцептора.....	84

3.2.2 Бактериальная экспрессия сенсоров на активность каспазы-3.....	86
3.2.3 Эукариотическая экспрессия сенсоров на активность каспазы-3.....	89
ВЫВОДЫ	104
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	105
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	107
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	109
ПРИЛОЖЕНИЕ	122

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы исследования. Флуоресцентные белки, относящиеся к семейству GFP (Green Fluorescent Protein), широко используются для различных молекулярно-биологических целей [Chudakov et al., 2005]. 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.

Цели и задачи. Целью данной работы являлось применение флуоресцентных белков 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 значимость 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 мультисканальной 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*.

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

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

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.

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.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Фотосенсибилизаторы и клеточная гибель

1.1.1 Фотосенсибилизаторы и механизмы образования АФК

В среднем, в клетке млекопитающих происходит около 10^4 окислительных событий в день [Swanson et al., 1999]. Активные формы кислорода (АФК) образуются при митохондриальном дыхании, в процессе метаболизма различных веществ, при хроническом воспалении, сокращении мышц и многих других процессах [Kulkarni & Wilson, 2008]. Поэтому клетки выработали различные системы защиты от АФК, образующихся в «нормальных» концентрациях.

Однако при поглощении света эндогенными или экзогенными *фотосенсибилизаторами* в присутствии кислорода в живых организмах образуется значительно большее количество АФК. Они вызывают различные химические и биологические эффекты, в основном, повреждающие [Миронов, 1996]. *Фотосенсибилизаторами* (ФС) называют молекулы, которые после поглощения света способны вступать в химические реакции, невозможные в его отсутствие. В процессе реакции фотосенсибилизаторы могут подвергаться химическим модификациям, но это не является обязательным условием.

В фотохимических реакциях принимают участие различные короткоживущие активные формы кислорода, такие как синглетный кислород, супероксид-анион радикал, пероксид водорода и другие. На рисунке 1 представлены процессы поглощения света и переноса энергии, происходящие при фотодинамическом взаимодействии.

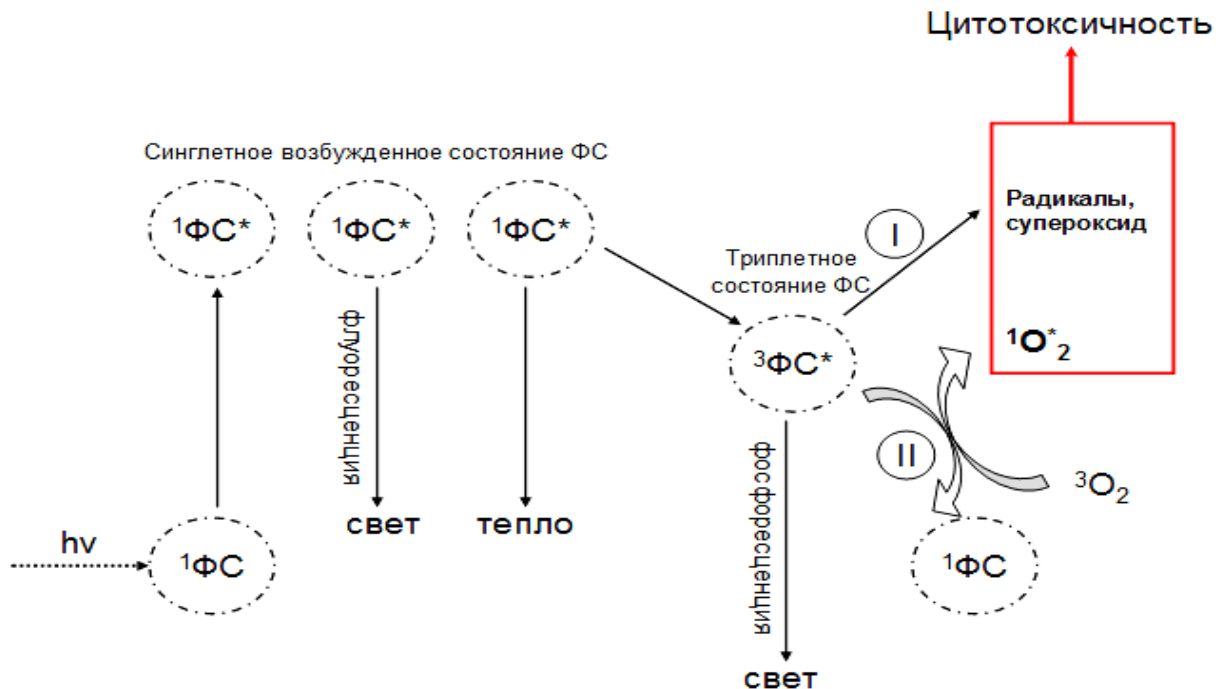


Рисунок 1 – Фотофизические и фотохимические процессы, протекающие при возбуждении фотосенсибилизатора (по [Castano et al., 2004]).

В невозбужденном состоянии низшая молекулярная орбиталь фотосенсибилизатора заселена двумя электронами с противоположными спинами (синглетное состояние). После поглощения фотона один из этих электронов переходит на следующий энергетический уровень с сохранением спина (первое возбужденное синглетное состояние). Время жизни этого состояния составляет порядка наносекунд, из которого ФС может вернуться в основное энергетическое состояние путем перехода энергии в тепло или свет (флуоресценция). Если же возбужденный электрон изменит свой спин на противоположный, то из первого короткоживущего синглетного возбужденного состояния ФС может перейти в относительно долгоживущее триплетное возбужденное состояние.

Фотосенсибилизатор, находящийся в возбужденном триплетном состоянии, может принимать участие в двух типах реакций, причем оба типа могут протекать одновременно (см. рисунок 2). Соотношение между ними зависит от типа фотосенсибилизатора, концентраций кислорода и субстрата.

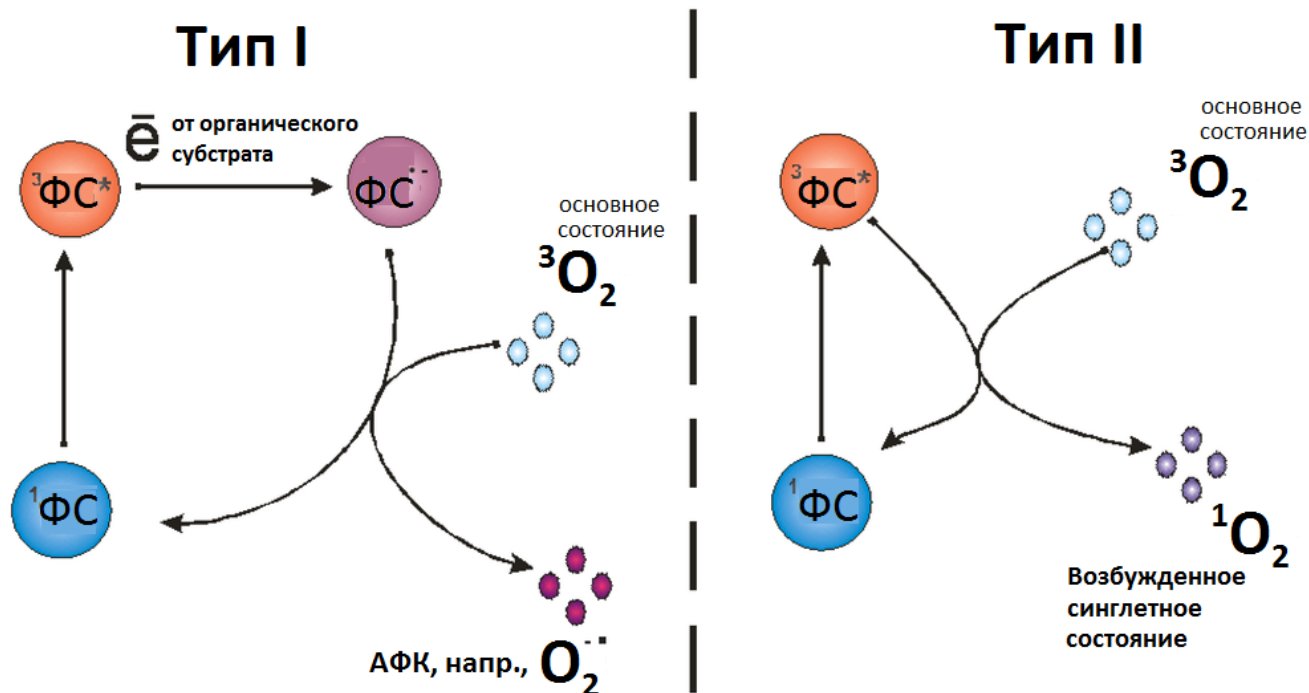


Рисунок 2 – Различия между первым и вторым типом реакций фотосенсибилизаторов (по [Mroz et al., 2011]).

Реакции первого типа

В реакциях первого типа (Тип I на рисунке 2) фотосенсибилизатор взаимодействует непосредственно с субстратом, например, клеточной мембраной, в реакции одноэлектронного переноса. Хотя электронный перенос может происходить в обоих направлениях, обычно субстрат отдает электрон фотосенсибилизатору. Таким образом, образуется радикал-катион субстрата и радикал-анион фотосенсибилизатора. Этот продукт затем может реагировать с кислородом, образуя активные формы кислорода. Молекулярный кислород в своем стандартном, триплетном состоянии обладает двумя неспаренными электронами с одинаковыми спинами. Это затрудняет окисление молекул нерадикальной природы, но при этом облегчает процесс одноэлектронной передачи от радикалов с образованием различных активных форм кислорода [Ziegelhoffer & Donohue, 2009] (см. рисунок 3).

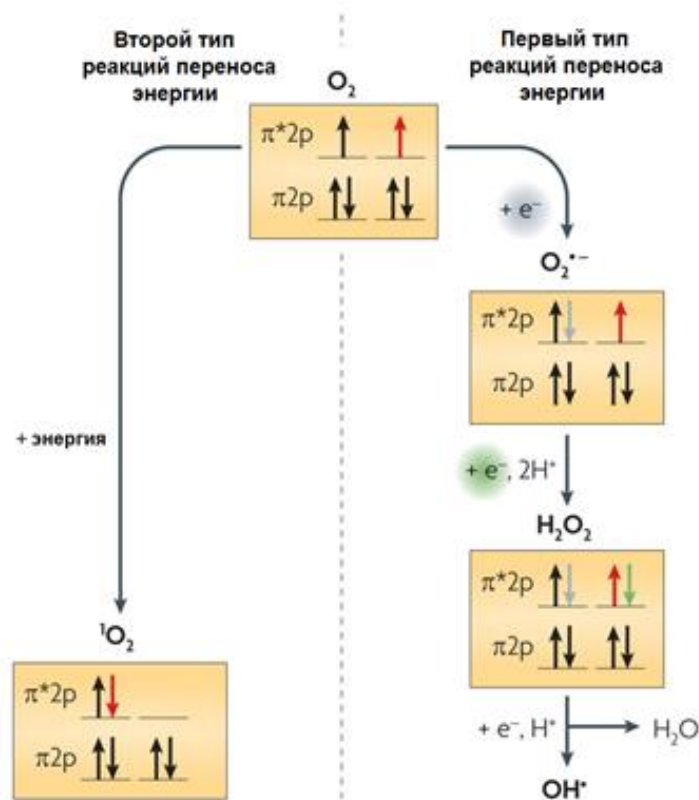


Рисунок 3 – Виды активных форм кислорода (по [Ziegelhoffer & Donohue, 2009]).

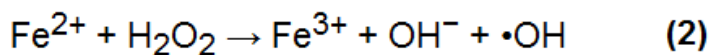
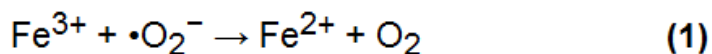
При переносе электрона на молекулярный кислород образуется **супероксид анион радикал** ($O_2^{\bullet-}$, см. рисунок 3). Данный вид АФК не очень реакционноспособен, однако может в дальнейшем подвергаться различным преобразованиям - например, процессу дисмутации с образованием пероксида водорода и кислорода, протонированию с образованием гидропероксильного радикала, или участвовать в образовании гидроксильного радикала и др.

Пероксид водорода (H_2O_2), в отличие от супероксид анион радикала, благодаря отсутствию заряда и меньшей реакционной способности может проникать сквозь клеточную мембрану. Сам по себе он не инициирует перекисное окисление липидов, но служит источником образования гидроксильного радикала. Пероксид водорода может инактивировать некоторые ферменты, окисляя их тиоловые группы, например, Cu/Zn-супероксиддисмутазу и Fe-супероксиддисмутазу [Ермакова, 2005].

Гидропероксильный радикал (HO_2^{\bullet}) – более сильный окислитель, чем супероксид анион радикал. Он возникает при протонировании последнего в кислой среде или при взаимодействии пероксида водорода с органическими радикалами или супероксид анион радикалом [Владимиров, Арчаков, 1972; Мерзляк, 1999]. Данный радикал способен свободно диффундировать между

компартаментами клетки и реагировать с ненасыщенными жирными кислотами и некоторыми аминокислотами, такими как гистидин, метионин и триптофан [Dat et al., 2000].

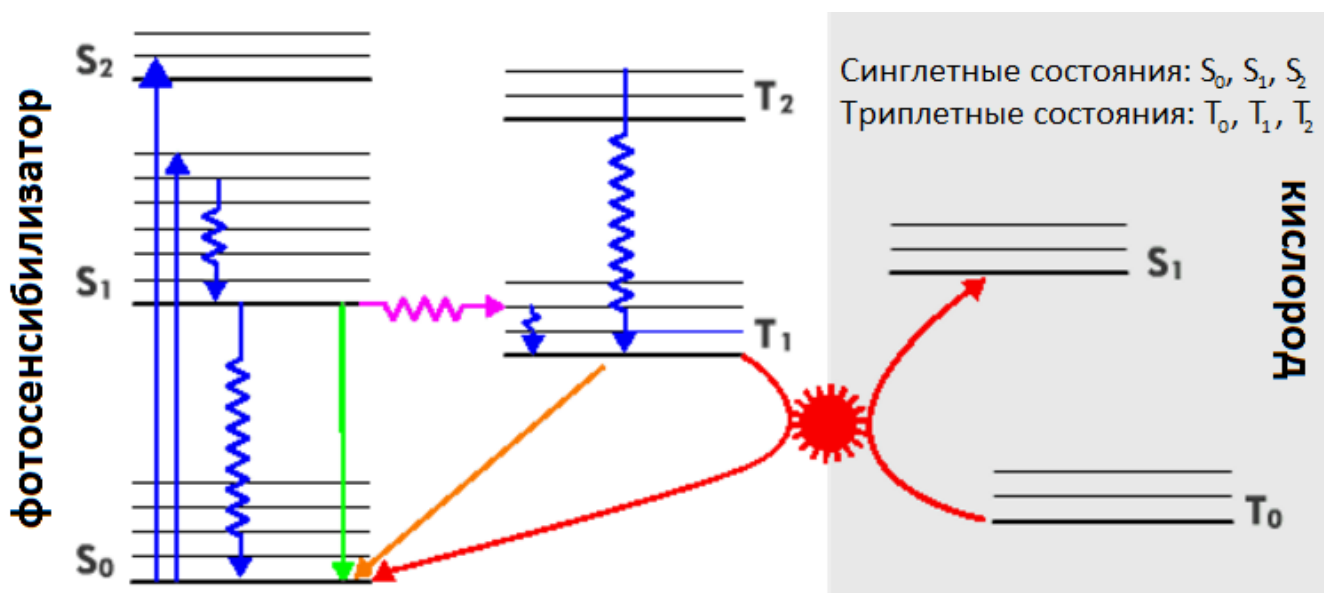
Гидроксильный радикал (HO•) – самая реакционноспособная форма кислорода, обладающая, как следствие, коротким временем жизни (наносекунды) и очень небольшим радиусом действия. В процессе ее образования супероксид анион радикал играет роль восстановителя, поскольку отдает электрон иону металла (например, Fe³⁺ или Cu²⁺ - см. реакцию 1). Тот, в свою очередь, инициирует превращение пероксида водорода в гидроксильный радикал (реакция 2). Это так называемая реакция Фентона, открытая более ста лет назад.



Поскольку все клетки содержат определенное количество меди, железа и других металлов, способных катализировать эту реакцию, эта реакция крайне актуальна в биологических системах. Гидроксильный радикал отбирает электрон у органических соединений и инициирует в клетке различные повреждающие реакции с клеточными субстратами, например, жирными кислотами. При этом образуются гидроксильные соединения, которые, в свою очередь, также являются радикалами. Поскольку окисленные субстраты являются радикалами, то они сами могут дальше окислять другие молекулы, – что приводит к цепным реакциям. Это объясняет, почему гидроксильный радикал производит гораздо больше повреждений, чем можно было бы ожидать.

Реакции второго типа

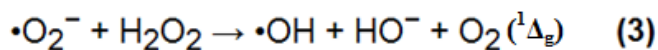
В реакции второго типа (см. рисунок 4) возбужденный фотосенсибилизатор реагирует непосредственно с молекулярным кислородом, что приводит к образованию **синглетного кислорода** (¹O₂). Примером подобной реакции может служить облучение таких органических красителей как бенгальский розовый, метиленовый синий или порфирины в присутствии кислорода.



<http://photobiology.info/Oleinick.html>

Рисунок 4 – Диаграмма Яблонского, описывающая электронные переходы при поглощении света фотосенсибилизатором и перенос энергии на молекулу кислорода. Синие прямые стрелки - поглощение энергии света фотосенсибилизатором; синие волнистые стрелки - внутренняя конверсия (переход между электронными состояниями с одинаковым спином электрона); зеленая прямая стрелка - флуоресценция; лиловая волнистая стрелка - интеркомбинационная конверсия (переход между синглетным и триплетным состоянием); рыжая прямая стрелка - фосфоресценция; красные стрелки и “шестеренка” - перенос энергии между фотосенсибилизатором и молекулой кислорода в основном триплетном состоянии, который приводит к образованию синглетного кислорода.

Помимо реакции триплетного кислорода с фотосенсибилизатором, синглетный кислород образуется, например, в реакции супероксид анион радикала с пероксидом водорода (см. реакцию 3).



По сравнению с триплетной формой, синглетный кислород – химически более активное соединение. В зависимости от среды, его время жизни составляет от наносекунд (в средах с высоким содержанием С-Н связей) до секунд (в случае их отсутствия). Таким образом, в клетке, относящейся к первому случаю, он обладает очень небольшим радиусом действия – около 20 нм [Moan & Berg, 1991]. Синглетный кислород окисляет различные органические молекулы, включая липиды, белки, аминокислоты, нуклеотиды, углеводы, тиолы, фенолы и др., реагируя по двойной связи с образованием различных гидроперекисей; чаще всего именно он является действующим соединением при фотодинамической терапии.

Активные формы кислорода являются окислителями, способными взаимодействовать со многими биологическими молекулами (см. рисунок 5):

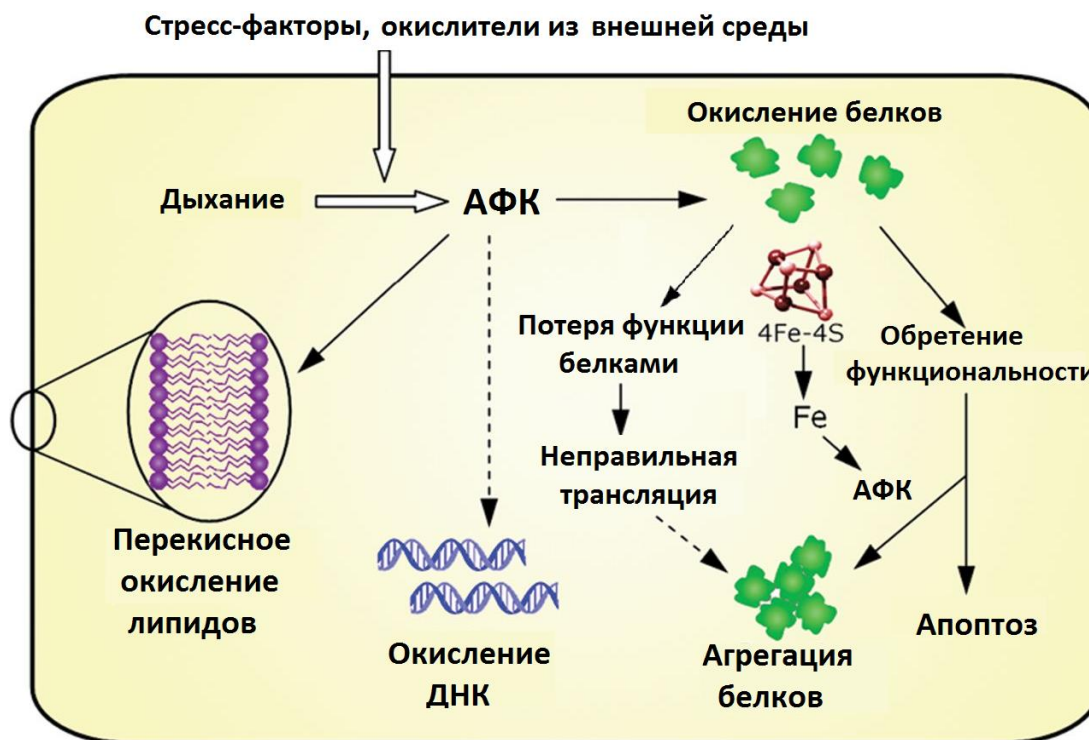


Рисунок 5 – АФК могут изменять или повреждать различные мишени в клетке (по [Avery, 2011]).

- у белков главными мишенями для окислителей являются остатки цистеина, метионина, тирозина, гистидина и триптофана [Midden & Dahl, 1992; Grune et al., 2001]. Цистеин и метионин окисляются преимущественно до сульфоксидов, гистидин – до нестабильного эндопероксида, триптофан участвует в сложной цепочке превращений с образованием формилкинурина.

- в остатках полиненасыщенных жирных кислот АФК вызывает цепные реакции с образованием липидных радикалов (L^*), пероксидов (LOO^*), гидропероксидов ($LOOH$) и алкоксидов (LO^*) [Vachowski et al., 1991; Vachowski et al., 1994].

- в ДНК окислению могут подвергаться как азотистые основания, так и сахара, что может привести к образованию ДНК-белковых связей. Этот вид повреждения ДНК наиболее тяжело поддается репарации. Из азотистых оснований в наибольшей степени подвержен окислительному повреждению, вызываемому синглетным кислородом, гуанин, который превращается в 8-оксогуанин [Buchko et al., 1995].

Хотя все клетки способны восстанавливаться после некоторой степени окислительного повреждения, начиная с определенного уровня оно вызывает необратимые последствия и гибель клетки.

1.1.2 Возможные молекулярные механизмы клеточной гибели при воздействии ФС

Уровень фотоповреждения и цитотоксичности, вызываемый фотосенсибилизаторами, зависит от многих факторов: от типа фотосенсибилизатора и в особенности от его клеточной локализации, от времени и интенсивности облучения, от времени между поглощением клеткой фотосенсибилизатора и его облучением, от типа клеток и уровня их оксигенации [Henderson & Dougherty, 1992; Dougherty et al., 1998; Oleinick et al., 2002; Dolmans et al., 2003] и др. Эти факторы определяют и механизм клеточной гибели при фотодинамическом воздействии.

Фотосенсибилизаторы используют для достижения клеточной гибели не только в научных целях, но и медицинских, для которых обеспечить «правильный» тип клеточной смерти особенно важно. Фотодинамическая терапия (ФДТ) – это клиническая практика, при которой облучают ткани, содержащие фотосенсибилизаторы (как правило, химического происхождения) с целью генерирования АФК в клетке-мишени (например, опухолевой клетке). Это приводит к гибели области, ограниченной площадью облучения (см. рисунок 6).

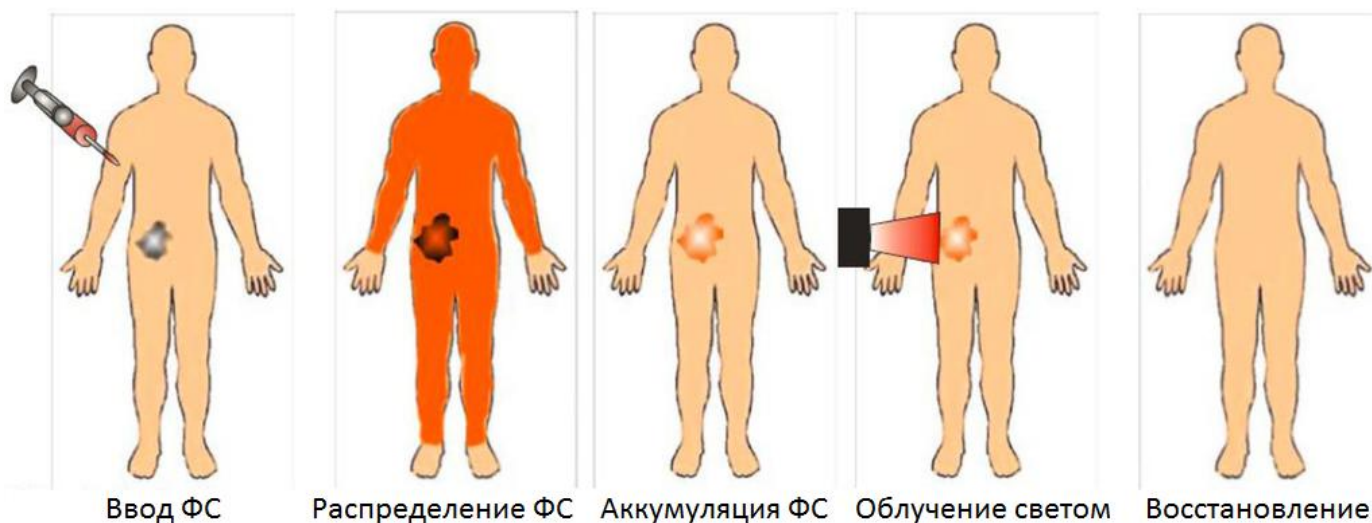


Рисунок 6 – Фотодинамическая терапия (по [Mroz et al., 2011]).

ФДТ уже одобрена различными мировыми клиниками для лечения ряда опухолей, включая рак кожи, пищевода, легких, головы и шеи. В настоящее время проводятся клинические испытания для расширения области ФДТ, например, для локализованных микробных инфекций [Brown et al., 2004; Agostinis et al., 2011]. Таким образом, исследования токсичности фотосенсибилизаторов для клеток часто проводят именно в связи с фотодинамической терапией.

Апоптоз, автофагия и некроз являются клеточными программами, играющими центральную роль в нормальном развитии, гомеостазе тканей и в удалении ненормальных или поврежденных клеток [Lockshin & Zakeri, 2004; Edinger & Thompson, 2004]. Все эти типы клеточной смерти возможны при фотодинамической терапии (но не все желательны).

Изначально они были охарактеризованы по характерным фенотипическим изменениям (см. рисунок 7). При апоптозе происходят разрезание хромосомной ДНК на межнуклеосомные фрагменты, конденсация ядра, сжатие всей клетки и «блеббинг» – клетка распадается на тельца, окруженные мембраной (подробнее – см. в разделе «Апоптоз и сенсоры для его детекции»). В случае некроза клетка набухает и «лопается» благодаря быстрому повышению проницаемости плазматической мембраны. Для автофагии характерна лизосомная деградация клетки с наличием автофагосом [Schweichel & Merker, 1973]. В настоящее время открыты и другие пути клеточной гибели, но их описание не является целью данного обзора.

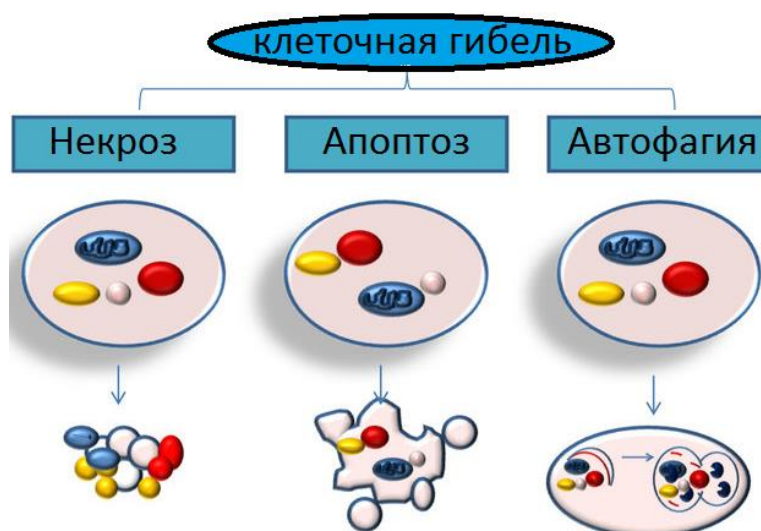
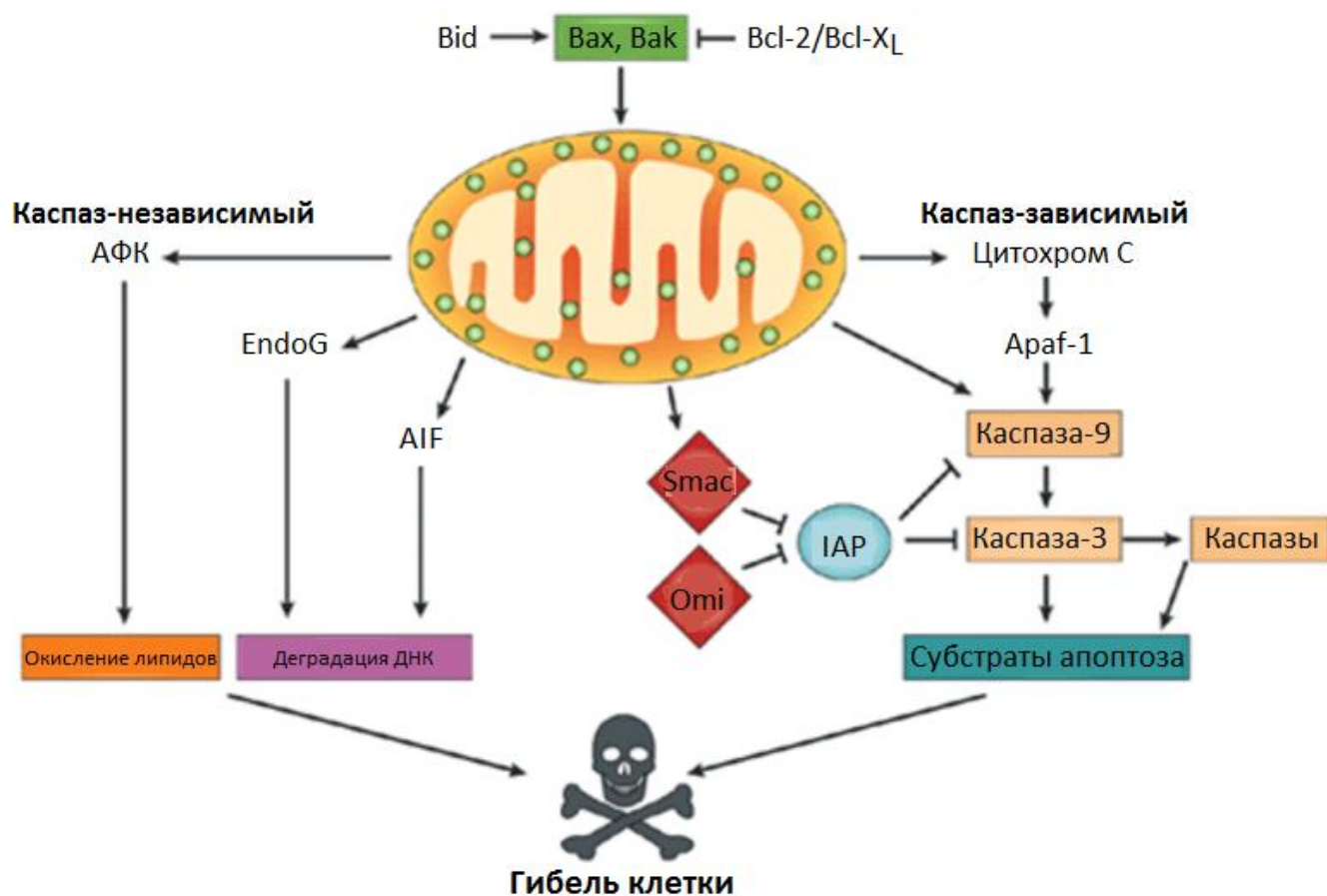


Рисунок 7 – Схематичное изображение трех механизмов клеточной гибели. Некроз (вакуоляризация цитоплазмы, набухание клетки и разрушение плазматической мембраны); апоптоз (конденсация ядра, сжатие клетки и образование мембранных пузырьков с клеточным содержимым); автофагия (лизосомная деградация) (по [Zarravigna et al., 2013]).

1.1.2.1 Апоптоз

Для инициации апоптоза предпочтительна локализация фотосенсибилизаторов в митохондриях (апоптоз развивается за счет высвобождения из митохондрии апоптоз-индуцирующих факторов, например, цитохрома С [Varnes et al., 1999]) или в эндоплазматическом ретикулуме [Buytaert et al., 2007].

Существуют несколько путей активации апоптоза (см. рисунок 8), из которых наиболее изучены каспаз-зависимый и каспаз-независимый; чаще реализуется первый путь.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Рисунок 8 – Белок Bax активирует каспаз-зависимый и каспаз-независимый пути клеточной гибели в клетках млекопитающих. Расшифровка сокращений: Omi - митохондриальная сериновая протеаза. AIF - *apoptosis-inducing factor*. Apaf-1 - *apoptotic protease-activating factor-1*. Bak - *Bcl-2 homologous antagonist/killer*. Bax - *Bcl-2-associated X-protein*; Bcl-2 - *B-cell lymphoma-2*. Bcl-XL - *Bcl-2-like*. Bid - *BH3-interacting-domain death agonist*. EndoG - *endonuclease G*. IAP, *inhibitor of apoptosis*. Smac - *second mitochondria-derived activator of caspase* (no [Jin & Reed, 2002]).

1.1.2.1.1 Каспаз-зависимый апоптоз

Каспазы – высоко консервативное семейство цистеин-зависимых аспаргат-специфичных протеиназ. Существует два пути активации каспаз – внешний (с участием рецепторов «лигандов смерти» на мембране клетки), и внутренний – митохондриальный (подробнее см. раздел «Механизмы развития апоптоза»).

Показано, что после фотодинамической терапии запускается в основном митохондриальный путь активации каспаз [Oleinick & Evans, 1998]. Это в особенности относится к фотосенсибилизаторам с преимущественной митохондриальной локализацией (например, порфириновым сенсибилизаторам и производным фталоцианина), поскольку они быстро инициируют пермеабиллизацию митохондриальных мембран [Oleinick et al., 2002; Almeida et al., 2004]. Механизм разрушения митохондрий еще не до конца не установлен, в частности, неизвестно, за счет нарушения внутренней или внешней мембраны происходит пермеабиллизация митохондрий (важный вопрос для применения фотодинамической терапии) [Rasola & Bernardi, 2007]. Некоторые фотосенсибилизаторы обладают высокой аффинностью к основным компонентам поры (например, фотофрин IX [Dougherty et al., 1998; Kessel et al., 2001; Furre et al., 2005], и это считается непосредственной причиной пермеабиллизации митохондриальных мембран при ФДТ в культуре клеток.

При индукции апоптоза фотосенсибилизаторами, обладающими более низким сродством к митохондриям, роль поры, повышающей пермеабиллизацию митохондриальных мембран, остается неясной. Примером таких сенсибилизаторов могут служить форскан (мета-тетрагидроксибензилхлорин) или гиперидин, преимущественно локализующиеся в эндоплазматическом ретикулуме [Chaloupka et al., 1999; Buytaert et al., 2006-a]. В ряде исследований облучение различных типов раковых клеток с использованием данных фотосенсибилизаторов активировало внешний путь апоптоза [Oleinick et al., 2002; Agostinis et al., 2004; Almeida et al., 2004], в частности, повышая экспрессию «рецепторов и лигандов смерти» – Fas and FasL *in vitro* и *in vivo* [Yokota et al., 2000; Chen et al., 2002].

1.1.2.1.2 Каспаз-независимый апоптоз

Для возникновения апоптотической морфологии активация каспаз является основным, но не единственным определяющим фактором. В клетках, подвергающихся фотодинамической терапии, ингибирование каспаз редко оказывает значимый эффект на ход апоптоза, чаще лишь временно отсрочивая гибель [Oleinick et al., 2002]. Это объясняется тем, что апоптоз может протекать, хотя и

медленнее, независимо от каспазной активности, если пермеабиллизация мембраны митохондрии уже произошла. Примером индукторов каспаз-независимых путей апоптоза являются флавопротеины АИФ и эндонуклеаза G, которые высвобождаются в цитозоль при пермеабиллизации мембраны митохондрии, и, транслоцируясь в ядро, участвуют в конденсации хроматина и фрагментации ДНК вне зависимости от активности каспаз [Buytaert et al., 2007].

1.1.2.2 Некроз

Для индукции некроза предпочтительна локализация фотосенсибилизаторов в клеточной мембране или, при выполнении ряда условий, в лизосомах [Kessel et al., 1997], однако на практике задача вызвать данный тип гибели стоит реже, чем вызвать апоптоз. Процесс некроза морфологически характеризуется вакуоляризацией цитоплазмы, набуханием клетки и разрушением плазматической мембраны (см. рисунок 9). В результате некроза в организме начинается воспалительная реакция в связи с высвобождением клеточного содержимого [Edinger & Thompson, 2004].

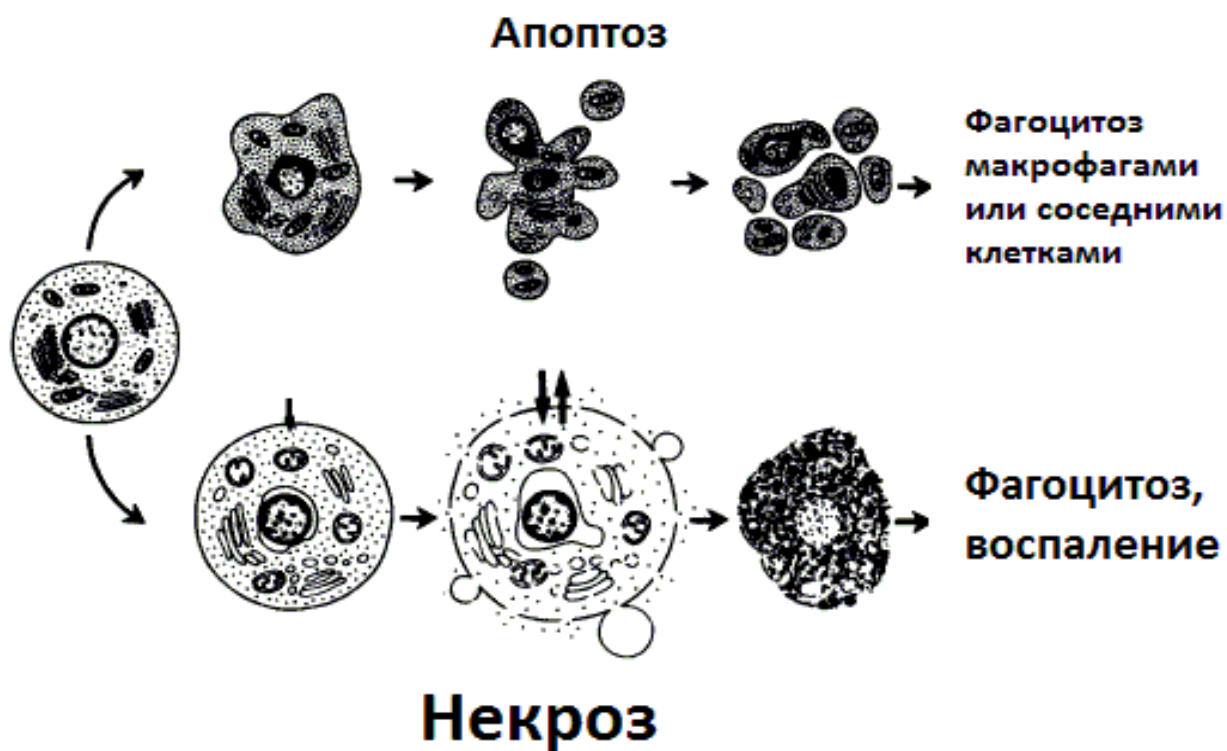


Рисунок 9 – Апоптоз в сравнении с некрозом (по [Majno & Joris, 1995]).

Несмотря на то, что в течение долгого времени некроз считался пассивным, не организованным механизмом клеточной гибели, недавние исследования показали, что некроз также может быть активным завершением сигнального каскада [Holler et al., 2000; Vanden Berghe et al., 2003].

Развитие некроза при использовании фотосенсибилизаторов, локализующихся на плазматической мембране, по всей видимости, связано с быстрой потерей целостности клеточной мембраны [Almeida et al., 2004; Moog, 2000]. Это приводит к невозможности корректного поддержания потоков ионов через клеточную мембрану и быстрому истощению внутриклеточных запасов АТФ (было показано, например, с использованием фотосенсибилизаторов Фотофрина® и фталоцианина цинка) [Fabris et al., 2001].

Фотосенсибилизаторы, накапливающиеся в лизосомах, могут вызывать как апоптоз, так и некроз [Fickweiler et al., 1999; Kessel et al., 2000]. Такое переключение может быть связано с различными концентрациями важных энергетических молекул, например, АТФ. Было продемонстрировано [Kirveliene et al., 2003], что в условиях, неблагоприятных для гликолиза, фотодинамическая терапия фотосенсибилизатором, обычно вызывающим апоптоз, приводила в основном к некротической клеточной гибели.

Один и тот же фотосенсибилизатор при разной преимущественной локализации в момент облучения может вызывать различные типы гибели: например, облучение клеток, содержащих РрIX в митохондриальной локализации, приводит к апоптозу, а при его локализации в других клеточных компартментах – к некрозу [Kriska et al., 2005].

В некоторых случаях фотосенсибилизаторы, обычно вызывающие апоптоз, могут приводить к некрозу в той же клеточной локализации. Чаще всего такого переключения механизмов можно добиться, увеличив интенсивность терапии (подняв концентрацию фотосенсибилизатора или дозы облучения). Значительное увеличение содержания активных форм кислорода приводит к быстрой биоэнергетической катастрофе, значительному падению уровня АТФ и общему ингибированию метаболизма. Показано, например, что в клетках HeLa, нагруженных фотосенсибилизатором Mitotracker Red, интенсивное облучение вызывало фотогенерацию как синглетного кислорода $^1\text{O}_2$, так и супероксид-анион радикала $\text{O}_2^{\bullet-}$, что приводило к гибели клетки путем некроза [Chernyak et al., 2006].

К факторам, также вызывающим предпочтительно некротическую гибель, относится повышенный внутриклеточный уровень кальция [Uzdensky et al., 2007]. Важен и тип активных форм кислорода, генерируемых в одной и той же локализации: с использованием специфических тушителей активных форм кислорода было показано, что генерация синглетного кислорода на мембранах комплекса Гольджи и эндоплазматического ретикулума (ЭПР) вызывает некроз, в то время как другие активные формы кислорода приводят к индукции апоптоза [Matroule et al., 2001].

1.1.2.3 Автофагия

Запуск автофагии редко является целью при фотодинамической терапии. В клетках данный механизм обычно используется для выживания, - с помощью него клетка удаляет поврежденные органеллы, токсичные метаболиты или внутриклеточные патогены (см. рисунок 10).

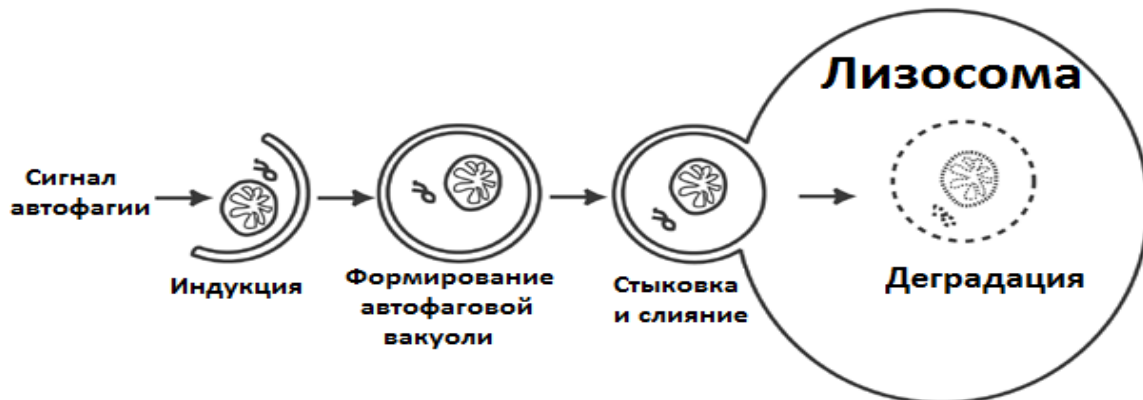


Рисунок 10 – Схема процесса автофагии (по [Baehrecke, 2003]).

Однако автофагия может также приводить к клеточной смерти – при избыточном самопереваривании и деградации ключевых клеточных органелл. Продолжительное поддержание процесса автофагии приводит к метаболическому и энергетическому коллапсу, следствием чего является клеточная гибель [Buytaert et al., 2006-b]. В случае если быстро справиться с проблемой повышенного фотоповреждения не удалось ввиду высоких концентрации и реакционной способности фотогенерируемых активных форм кислорода, клетка погибает, фактически, из-за выбранного метода борьбы с АФК [Buytaert et al., 2006-a; Buytaert et al., 2006-b; Kessel et al., 2006].

На данный момент существуют несколько независимых свидетельства об индукции автофагии при ФДТ. Например, в клетках $Bax^{-/-}$ $Bak^{-/-}$ MEF, неспособных к апоптозу, при обработке гиперицином и облучении светом развивается именно такой тип клеточной гибели [Buytaert et al., 2006-a]. В некоторых исследованиях показано, что автофагия и апоптоз могут развиваться параллельно в случае использования фотосенсибилизаторов, локализующихся в эндоплазматическом ретикулуме [Buytaert et al., 2006-a; Kessel et al., 2006].

Механизмы переключения клеточной гибели между некрозом и апоптозом, а также связи этих путей с автофагией сложны и не до конца изучены. Однако нет сомнений, что отслеживание этих процессов совершенно необходимо для разработки эффективных и максимально безопасных средств для фотодинамической терапии; при этом необходимо учитывать, что в опухолевых клетках один или несколько из этих путей могут быть нарушены.

1.1.3 Генетически кодируемые фотосенсибилизаторы. Семейство KillerRed

В настоящий момент распространены как химически синтезированные, так и генетически кодируемые фотосенсибилизаторы для локального вызывания клеточной гибели. Основным недостатком химически синтезированных фотосенсибилизаторов является недостаточная селективность их накопления, которая может приводить к значительному повреждению нецелевых клеток. Кроме того, на эффективность фотоповреждения существенное влияние оказывает субклеточная локализация фотосенсибилизатора, обусловленная его химическими свойствами; однако химические фотосенсибилизаторы редко локализуются только в одном компартменте клетки.

Белки – генетически кодируемые соединения – «решают» проблему локализации с помощью специальных сигналов: определенных последовательностей аминокислот, благодаря которым белок однозначно оказывается в определенном клеточном компартменте. Использование специальных промоторов при генно-инженерном конструировании или наличие таргетной доставки (например, специфическими антителами) обеспечивает экспрессию соответствующих генов именно в той ткани, где это необходимо.

При доставке фотосенсибилизатора в клетку (или обеспечения его синтеза в ней, в случае генетически кодируемой молекулы) крайне актуальна проблема его визуализации, - например, для уверенности, что фотосенсибилизатор присутствует в каждой клетке ткани или культуры. Таким образом, необходимо, чтобы сигнал сенсбилизатора был достаточно ярким и минимально рассеивался и поглощался тканями.

Наиболее популярными генетически кодируемыми метками в последнее время стали флуоресцентные белки, как правило, принадлежащие семейству GFP-подобных белков (Green Fluorescent Protein) [Chudakov et al., 2005]. Большинство современных применений флуоресцентных белков подразумевают их химическую инертность. При использовании соответствующих промоторов и флуоресцентных белков возможно отслеживать специфические популяции клеток в составе многоклеточного организма. С помощью флуоресцентных белков, несущих сигналы различной внутриклеточной локализации, помечают клеточные органеллы. Флуоресцентные белки присоединяют генно-инженерными методами к целевым белкам для изучения их локализации, передвижения и оборота, а также для визуализации белок-белковых взаимодействий в живых клетках. На основе флуоресцентных белков создают генетически кодируемые сенсоры различных молекул или внутриклеточных сигналов.

В настоящее время появилась еще одна область применения флуоресцентных белков – в качестве партнеров для фотоиндуцируемых внутриклеточных реакций. Первым примером химически активного GFP-подобного белка является фототоксический флуоресцентный белок KillerRed (см. рисунок 11), который образует активные формы кислорода в ответ на облучение.

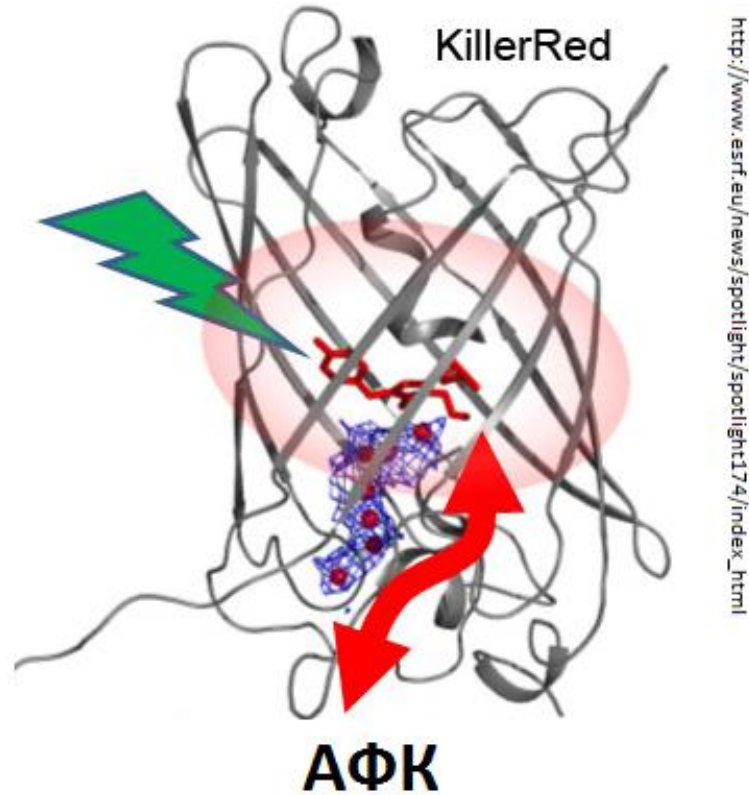


Рисунок 11 – KillerRed, первый фототоксический флуоресцентный белок. При облучении зеленым светом (“молния” на рисунке) генерирует АФК. Красная структура – хромофор, синией сеткой изображен канал внутри молекулы, в котором красными шариками изображены молекулы воды (изображение из статьи “The dark side of KillerRed”, ESRF, 19-12-2012).

KillerRed (AY969116 в GeneBank) – фототоксичный красный флуоресцентный мутант хромобелка *anm2CP* из гидроидной медузы. Это димерный белок (238 аминокислот) с максимумами возбуждения и эмиссии при 585 и 610 нм, коэффициентом экстинкции при максимуме возбуждения $45000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и квантовым выходом флуоресценции 0.25.

Для улучшения фототоксических свойств и усиления яркости свечения было произведено 20 точечных мутаций белка. Предположительно, наиболее важными заменами, обуславливающими повышенные фототоксические свойства KillerRed, являются находящиеся рядом с хромофором аминокислоты Glu68 и Ser119 [Pletnev et al., 2009], а также Asn145 и Ala161 [Bulina et al., 2006-a].

Роль хромофора (Gln65-Tyr66-Gly67) в определении фототоксических свойств была установлена с помощью теста на фототоксичность для бактерий, в котором было показано (см. рисунок 12), что облучение синим светом практически не приводит к гибели клеток, в отличие от облучения зеленым светом (в последнем случае погибают 96% бактерий *E. coli* после десятиминутного облучения и практически все клетки после 20 минут облучения белым светом мощностью 1 Вт/см²). Эти результаты соответствуют спектру поглощения/возбуждения [Vulina et al., 2006-a].

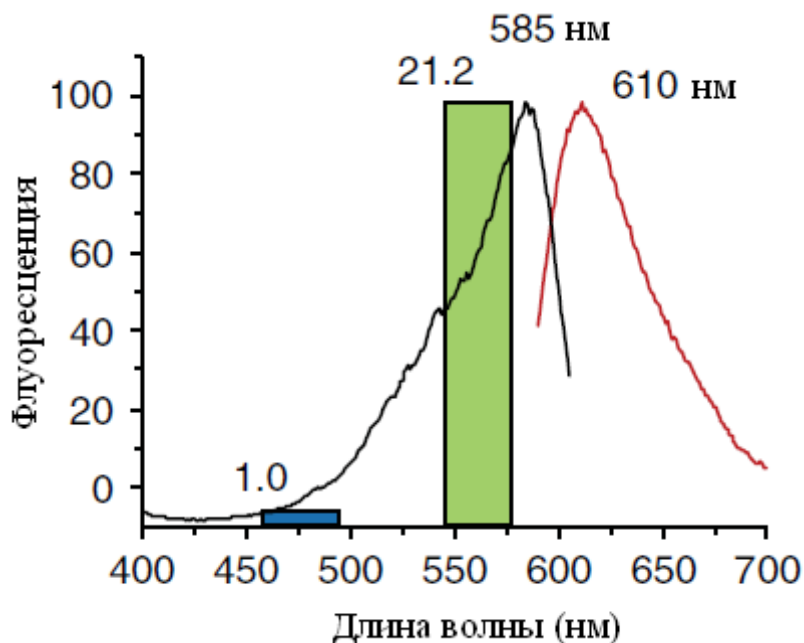
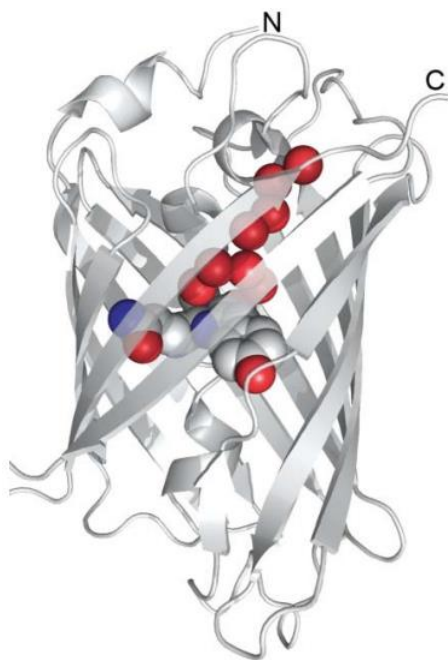


Рисунок 12 – Спектры возбуждения (черная линия) и эмиссии (красная линия) белка KillerRed. Синий и зеленый прямоугольники показывают относительный фототоксический эффект при облучении синим (460-490 нм) и зеленым (540-580 нм) светом мощностью 35 мВт/см² соответственно. Данные над прямоугольниками показывают количество раз, в которое уменьшилось число живых клеток *E. coli* после 30 минутного облучения (по [Vulina et al., 2006-a]).

Среди красных флуоресцентных белков KillerRed – наиболее фототоксический (показано, в частности, в тесте на бактериях, экспрессирующих различные варианты генов – KillerRed, DsRed2, mCherry и mRFP [Waldeck et al., 2012]. Причина повышения фототоксических свойств KillerRed по сравнению с другими GFP-подобными белками еще не до конца изучена, но есть предположения, связанные со структурой белка KillerRed [Pletnev et al., 2009, Carpentier et al., 2009]. Полученные изображения высокого разрешения выявляет уникальный канал, соединяющий DsRed-подобный хромофор с внешней средой, в который помещается восемь молекул воды (см. рисунок 13).



С *Рисунок 13 – Изображение пространственной структуры мономера KillerRed. Пептидный остов отмечен серым цветом. Хромофор (Gln65-Tyr66-Gly67) и 8 молекул воды в углублении, формирующем канал, показаны в объемном виде (по [Lukyanov et al., 2010]).*

Исходя из данных анализа структуры, можно выдвинуть гипотезу о реакции кислорода с возбужденным хромофором, приводящей к образованию супероксид-анион-радикала [Serebrovskaya et al., 2009; Lukyanov et al., 2010]. Образование $O_2^{\bullet-}$ может быть объяснено реакцией переноса электрона от хромофора к кислороду, оставляющей хромофор в состоянии радикала [Hoogenboom et al., 2005; Zondervan et al., 2009]. Эта гипотеза подтверждается недавним открытием того факта, что флуоресцентные белки являются светоиндуцируемыми донорами электронов [Bogdanov et al., 2009].

Недавнее исследование, в котором сравнили три красных флуоресцентных белка (KillerRed, mRFP и DsRed) с помощью оптической спектроскопии с временным разрешением, показало, что именно фоторедукция хромофора ответственна за фототоксичность и его обесцвечивание [Vegh et al., 2014]. В совокупности с отсутствием детектируемого синглетного кислорода [Pletnev et al., 2009; Vegh et al., 2011; Shu et al., 2011] и фактом подавления фототоксического эффекта при гиперэкспрессии супероксиддисмутазы [Williams et al., 2013] это позволяет предположить, что KillerRed является фотосенсибилизатором первого типа. Впрочем, механизм фототоксичности данного белка все еще является предметом изучения (например, [de Rosny & Carpentier, 2012]). В одной из работ, посвященных достижению ФДТ, была выдвинута гипотеза о том, что в генерировании KillerRed-ом АФК задействованы в том числе и нефлуоресцентные промежуточные соединения на его основе – в частности, дианионный радикал хромофора, образующийся при его фоторедукции [Kuznetsova et al., 2015].

Эффективный фотосенсибилизатор должен защищать себя от АФК-опосредованного повреждения. Удивительная особенность KillerRed заключается в большом количестве серусодержащих остатков (6 цистеинов и 10 метионинов), разбросанных по β -цилиндру. Возможно, эти остатки играют роль в защите от фотоиндуцированного окисления [Carpentier et al., 2009].

1.1.3.1 Области применения KillerRed

Генетически кодируемые фотосенсибилизаторы изначально использовали для фототоксического эффекта, в частности, для индукции гибели клеток. Например, оригинальное использование KillerRed заключается в создании бактериальных экспрессионных векторов, основанных на рекомбинации при вставке в них интересующих последовательностей. Если вставка не произошла, то в таких бактериях KillerRed синтезируется и при облучении они погибают, - остаются только клоны, в которых разрушена рамка считывания KillerRed [Liu et al., 2011].

Однако при уменьшении дозы облучения или изменения других факторов можно достичь сублетального уровня генерации АФК, который обеспечивает менее грубый, сигнальный эффект [Wojtovich & Foster, 2014]. Учитывая, что генетически кодируемые сенсибилизаторы можно дополнительно использовать в составе химерных конструкций, таким образом, контролируя место генерации АФК, - спектр задач, решаемых с помощью данных инструментов, значительно шире, чем при использовании химически синтезированных сенсибилизаторов (см. рисунок 14).

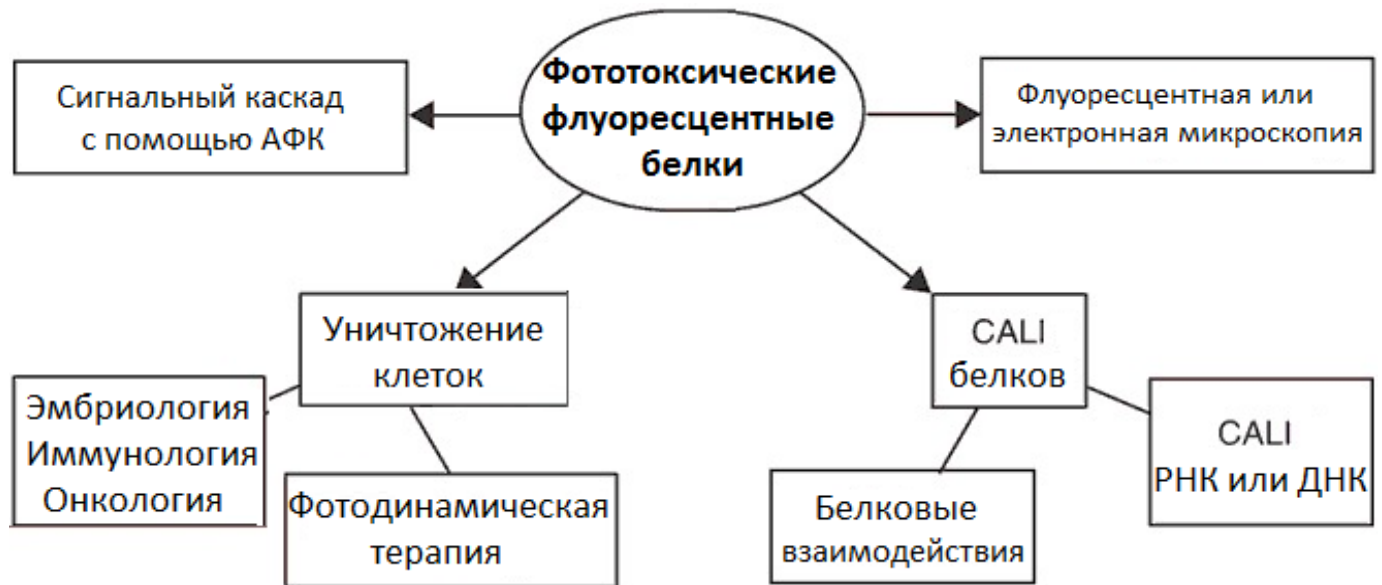


Рисунок 14 – Области применения фототоксических флуоресцентных белков (по [Boulina et al., 2006-b]).

1.1.3.1.1 KillerRed: применение *in cellulo* в различных локализациях

Оптогенетика – биотехнология, в которой используют свет для влияния на клетки в тканях или культурах (исторически применялась для нейронов, но спектр задач с тех пор существенно расширился). KillerRed является перспективным оптогенетическим инструментом, и он применяется в различных исследованиях – как гибели, так и других клеточных механизмов, зависящих от активных форм кислорода.

Как и для других фотосенсибилизаторов, уровень фототоксичности белка KillerRed и механизм вызванной клеточной гибели зависят от внутриклеточной локализации и дозы облучения. В первом исследовании его цитотоксичности, при облучении в цитоплазматической локализации KillerRed обеспечил гибель 40-60% клеток (100x объектив, фильтр возбуждения 535–575 нм, 5.8 Вт/см², 10 минут). В более щадящих условиях (40x объектив, фильтр возбуждения 535–575 нм, 3.3 Вт/см², 15 минут), но с KillerRed в митохондриальной локализации, погибли практически все клетки. С использованием панкаспазного блокатора апоптоза zVAD-fmk было показано, что в данной локализации KillerRed вызывал именно апоптоз [Bulina et al., 2006-a]. Слитый с сигналом миристилирования, т.е. локализованный на плазматической мембране (см. рисунок 15), KillerRed приводил, в основном, к более быстрой клеточной гибели путем некроза [Bulina et al., 2006-a; Bulina et al, 2006-б].

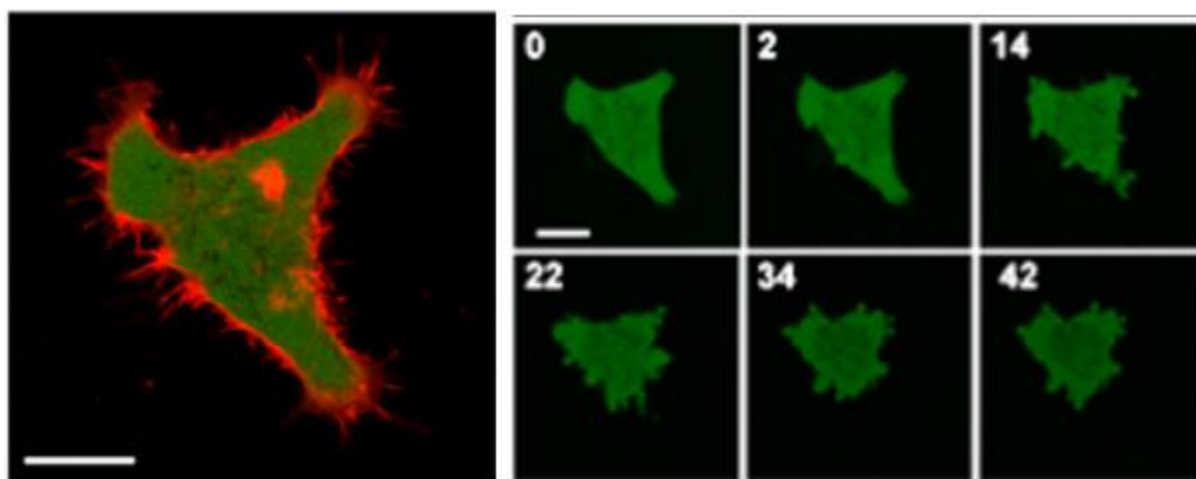


Рисунок 15 – Облучение KillerRed зеленым светом в мембранной локализации в течение 10 мин (63x объектив, ртутная лампа, фильтр возбуждения 515-560 нм, мощность света 7 Вт/см²) приводит к гибели клетки через 20 мин (изображение с сайта evrogen.com). Цифры в левом верхнем углу обозначают количество минут, прошедшее с момента облучения. Для визуализации клетки использован зеленый флуоресцентный белок в цитоплазматической локализации.

KillerRed был использован и в пероксисомальной локализации – для выяснения, можно ли с помощью генерируемых в ней АФК вызвать превращение пероксисом в автофагосомы [Nordgren et al., 2012]. Впоследствии было показано, что облучение KillerRed в пероксисомальной локализации может приводить к гибели клетки митохондрией-опосредованным путем; таким образом, с помощью данного инструмента была исследована роль пероксисом в окислительном стрессе [Wang et al., 2013].

Было продемонстрировано, что KillerRed в митохондриальной локализации в культурах клеток человека HEK293T и HeLa вызывает деполяризацию митохондриальной мембраны и гибель клеток как по каспаз-зависимому, так и по каспаз-независимому пути [Shibuya & Tsujimoto, 2012]. В нервных клетках та же локализация KillerRed с меньшей дозой облучения была использована для изучения механизма долгосрочной депрессии дендритов [Ertürk et al., 2014]. Сублетальная доза облучения KillerRed в митохондриальной локализации у клеток HeLa приводит к PARK2-зависимой митофагии; при этом было показано, что цитозольная или пероксисомальная локализация не приводит к привлечению PARK2 в митохондрии [Wang et al., 2012].

Лизосомальная локализация KillerRed (достигнута с помощью образования химерного белка с Rab7, лизосомальной ГТФ-азой) была использована для изучения влияния концентрации АФК в лизосомах на механизм клеточной гибели. Было показано, что при высокой интенсивности света клетки погибали путем некроза, а при более низкой – путем апоптоза; таким образом, KillerRed (в составе химерного белка с Rab7) может быть оптогенетическим инструментом для направления гибели клеточных популяций по одному или другому пути [Serebrovskaya et al., 2014].

Для достижения ядерной локализации KillerRed использовали в составе химерного белков. Один из примеров - блокирование клеточного деления при слиянии KillerRed (в виде тандема) с коровым гистоном H2B [Serebrovskaya et al., 2011; Petrova et al., 2016]. Облучение клеток, несущих данный химерный белок, вызывает перераспределение фактора XRCC1, о котором известно, что он немедленно привлекается к местам повреждения ДНК [Mortusewicz & Leonhardt, 2007]. Другой пример – слияние KillerRed с Tet-репрессором или TA-активатором в качестве нацеливающего домена. Целью этого исследования было сравнение влияния структуры хроматина на механизм BER (Base excision repair, - эксцизионную репарацию оснований) [Lan et al., 2014]. Недавние исследования с использованием KillerRed для индукции повреждения ДНК показали защитную роль белка Nek7 для теломераз [Tan et al., 2017a].

1.1.3.1.2 KillerRed: хромофор-опосредованная инактивация белков

АФК, генерируемые фотосенсибилизаторами, могут реагировать со слитыми с ними белками. Таким образом может достигаться CALI-эффект (chromophore-assisted light inactivation) на короткой дистанции [Vulina et al, 2006-б] (см. рисунок 16).

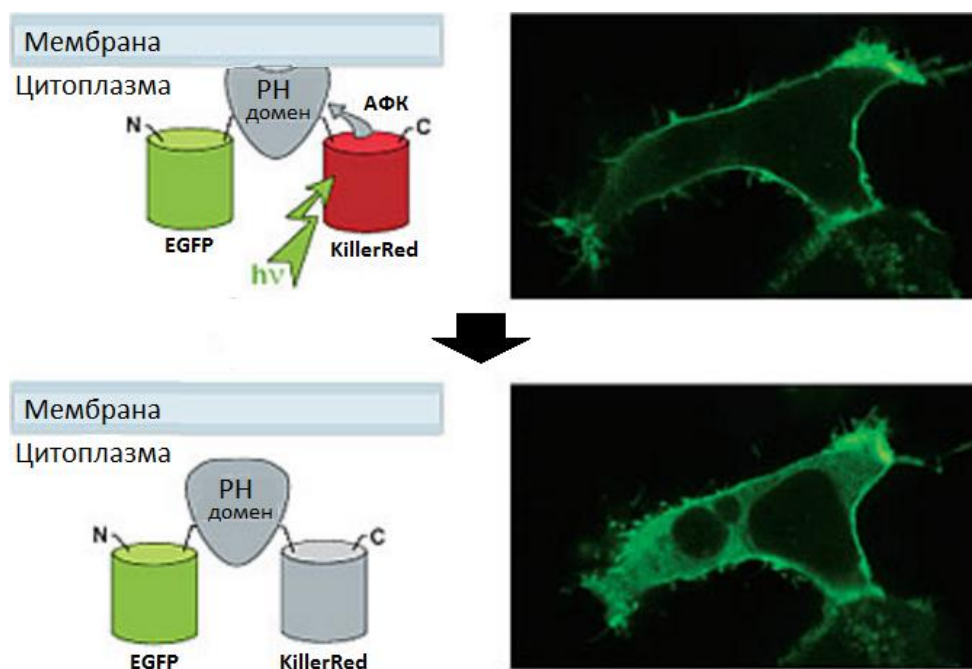


Рисунок 16 – Использование KillerRed для CALI домена плейкстриновой гомологии (PH-домен).
Изображение с сайта evrogen.com.

Технология инактивации интересующих белков с помощью слитых фотосенсибилизаторов особенно перспективна, поскольку обеспечивает временную инактивацию: до и через некоторое время после облучения в клетке присутствуют работоспособные исследуемые белки. Кроме того, данная технология позволяет контролировать время и место инактивации. С помощью CALI и KillerRed были изучены, например, некоторые функции динамина [Destaing et al., 2013].

Несмотря на то, что первой мишенью для производимых АФК является белок, слитый с фотосенсибилизатором, облако активных форм кислорода может влиять и на компоненты, с которыми взаимодействует этот белок. Таким образом можно исследовать белок-белковые или белок-ДНК взаимодействия (выше приведен пример индукции повреждения ДНК при использовании H2B-tKillerRed). Преимуществом данного подхода является возможность изучить взаимодействие мишеней, находящихся на большем расстоянии, чем позволяет широко применяемая для этой цели технология FRET (Förster resonance energy transfer, см. раздел «FRET-сенсоры каспазной активности»).

1.1.3.1.3 KillerRed: применение *in vivo*

KillerRed применяется для изучения различных функциональных систем и на уровне целых организмов. Ряд исследований был проведен на черве *Caenorhabditis elegans*: например, отслеживание патологических процессов, вызванных АФК в митохондриальной локализации мышечных клеток [Shibuya & Tsujimoto, 2012]. Несколько работ были проведены на нейронах (см. рисунок 17). Например, в зависимости от локализации фотосенсибилизатора, облучение приводило либо к фрагментации органелл (в случае митохондриальной локализации), либо к клеточной гибели (в случае мембранной) [Williams et al., 2013]. Примерно в это же время был разработан метод селективного разрушения нейронов с помощью KillerRed [Kobayashi et al., 2013]. Более того, было сконструировано специальное оборудование для удобства облучения, культивирования и исследования трансгенных червей, несущих KillerRed [Lee et al., 2014].

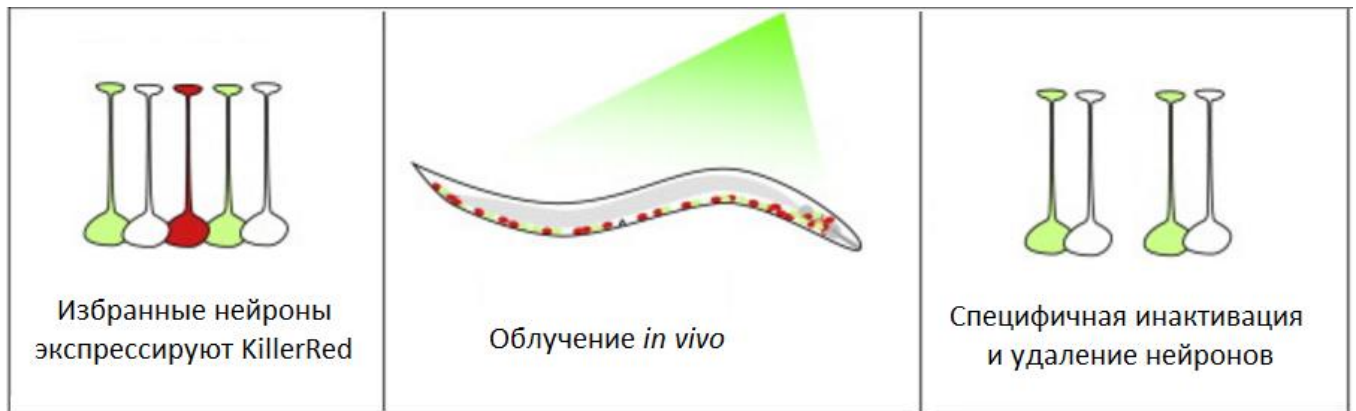


Рисунок 17 – Специфичная инактивация нейронов *C. elegans in vivo* (no [Williams et al., 2013]).

У рыб *Danio rerio* с помощью KillerRed изучали нейронные цепи (в частности, роль ножки шишковидного тела эпиталамуса [Lee et al., 2010]) и сердечно-сосудистую систему. Для последней было показано, что различная доза облучения сердечной мышцы, экспрессирующей ген KillerRed, приводит к разным эффектам: при меньшей дозе возникает перикардиальный отек, а при бОльшей дополнительно развивается апоптоз [Teh et al., 2010].

При высоких дозах облучения KillerRed используют для моделирования хронической сердечной недостаточности [Tan et al., 2017b]. Эти работы показали, что облучение можно варьировать для моделирования физиологического ответа, а не достижения непосредственно клеточной гибели. Например, при дозе облучения, получаемой в ходе стандартной конфокальной микроскопии, KillerRed не оказывает значимой фототоксичности; таким образом, его можно также

использовать для многоцветного мечения, а при необходимости, повышая дозу облучения, - в качестве оптогенетического инструмента. Это было продемонстрировано в работе на том же виде, Данио, а в качестве второго цвета использовали зеленый флуоресцентный белок [Korzh et al., 2011].

В трансгенных эмбрионах лягушки (*Xenopus laevis*), экспрессирующих H2B-tKillerRed под контролем тканеспецифичных промоторов, облучение вызывало торможение развития соответствующих тканей. Таким образом, были продемонстрированы возможности KillerRed в качестве оптогенетического инструмента для изучения развития и регенерации [Serebrovskaya et al., 2011]. В том же организме мембранно-локализованный KillerRed, доставленный в клетки с помощью микроинъекции мРНК, был использован для изучения развития и регенерации глаза и пронефроса эмбрионов [Jewhurst et al., 2014].

KillerRed использовали и при исследовании млекопитающих, в частности, мышей (как правило, *Mus musculus*): селективно разрушали клетки Мюллеровской глии в сетчатке глаза и отслеживали происходящие в связи с этим структурные и функциональные изменения (см. рисунок 18) [Byrne et al., 2013]. На мышях же обрабатывали условия для ФДТ с помощью KillerRed (см. далее).

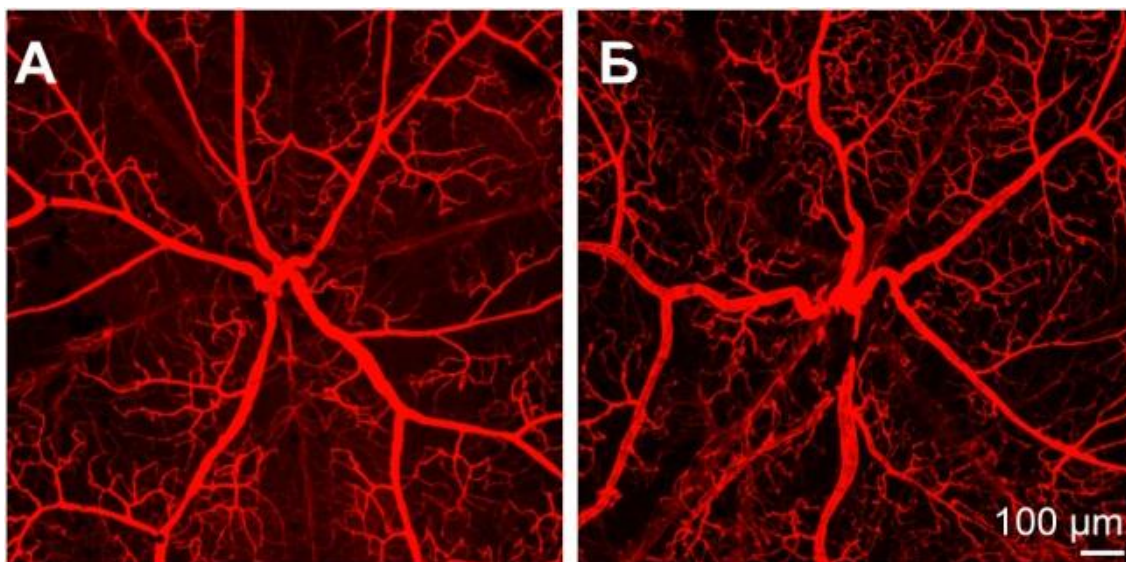


Рисунок 18 – сравнение сетчатки глаза, инъецированного GFP (А), с сетчаткой глаза, инъецированного KillerRed (Б), через 5 месяцев после облучения. В случае (Б) наблюдается дезорганизация и повышенная извилистость сосудистой системы. Окраска липофильным флуоресцентным красителем DiI, имеющим сродство к эндотелиальным клеткам (по [Byrne et al., 2013]).

1.1.3.1.4 KillerRed и фотодинамическая терапия

Одно из возможных применений фотосенсибилизатора – фотодинамическая терапия, и KillerRed уже тестировали на лабораторных мышах в ряде экспериментов с этой целью (см. рисунок 19). В отличие от многих химических фотосенсибилизаторов, он, во-первых, обладает достаточной растворимостью в клетках. Во-вторых, как все белки, KillerRed обладает свойством «биоразложения» - постепенной деградации в клетках. Использование временной трансфекции для его доставки в организм позволяет избежать такой проблемы как повышенная фототоксическая реакция в коже, которая характерна для фотосенсибилизаторов, доставляемых экзогенно. KillerRed обладает флуоресценцией в красной области спектра, что предпочтительно для экспериментов *in vivo* в виду более высокой проницаемости тканей для длинноволнового излучения.

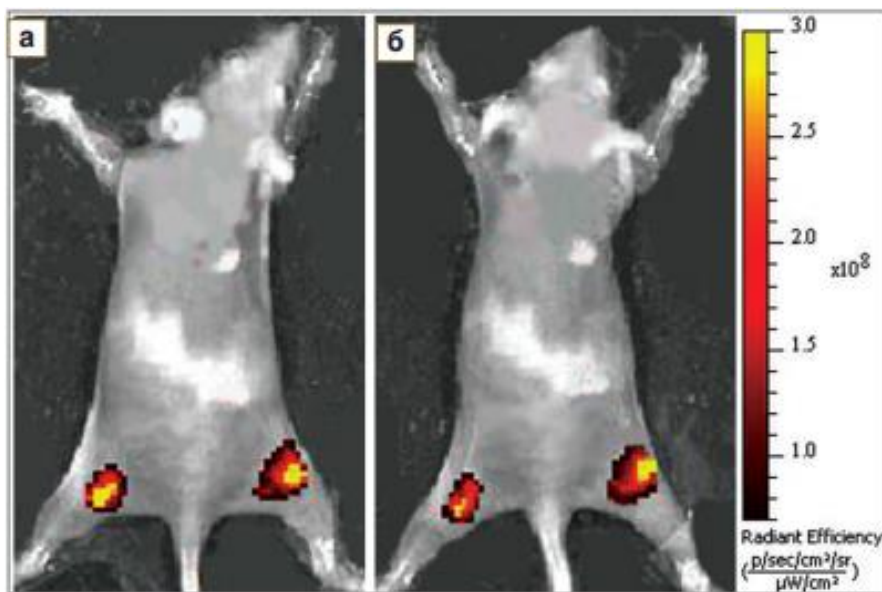


Рисунок 19 – Флуоресцентные изображения *in vivo* мыши *nude* с опухолями, экспрессирующими H2B-tKillerRed: а — до облучения; б — сразу после облучения (593 нм, 150 мВт/см², 20 мин). (по [Шурманова и др., 2013])

Некоторые фотосенсибилизаторы могут обеспечивать отсроченную клеточную гибель или прекращение роста опухоли. С использованием митохондриальной локализации KillerRed было показано, что он способен обеспечить клеточную гибель за счет долгосрочных механизмов [Vulina et al., 2006-a]; а эффективное временное блокирование пролиферации без значительной гибели клеток достигается при облучении зеленым светом клеток, экспрессирующих ген химерного белка H2B-tKillerRed (корового гистона, слитого с тандемной версией белка KillerRed [Serebrovskaya et al., 2011]).

Для каждого фотосенсибилизатора необходимо подбирать условия ФДТ: продолжительность, мощность и метод облучения, совместное использование с другими противоопухолевыми средствами, способ доставки фотосенсибилизатора в клетки и др.; ряд исследований был посвящен такому подбору для KillerRed. Например, в нескольких работах сравнивали эффективность режимов лазерного облучения (постоянный и прерывистый) для достижения клеточной гибели [Kuznetsova et al., 2015; Shirmanova et al., 2015]. Для усиления токсического эффекта применение KillerRed сочетали с другими факторами; в частности, экспрессировали в опухоли совместно с известным антионкогеном p53 [Tseng et al., 2015] или комбинировали с терапией цисплатином [Serebrovskaya et al., 2009].

Для активации KillerRed необходим зеленый или оранжевый свет, который значительно рассеивается и поглощается тканями животных, что накладывает ограничения для применения KillerRed *in vivo*. Одним из вариантов решения этой проблемы является использование KillerRed в гибриде с наночастицами, которые способны трансформировать глубоко проникающий в ткани инфракрасный свет в зеленый, который возбуждает фотосенсибилизатор. Данное сочетание позволило увеличить эффективность фотодинамической терапии на глубине 1 см с 7% до 70% [Liang et al., 2017].

Одним из лимитирующих факторов для фотодинамической терапии является выбор способа доставки фотосенсибилизатора в опухоль. KillerRed в мембранной локализации тестировали с доставкой с помощью хитозана и поли(γ -глутаминовой) кислоты [Liao et al., 2014]. Ранее был разработан и “биологический” способ доставки KillerRed в опухоль – с помощью фрагмента опухолеспецифичного антитела 4D5scFv [Serebrovskaya et al., 2009]. Ряд исследователей использует KillerRed в сочетании с виротерапией [Takehara et al., 2016; Tseng et al., 2016]. В первой из перечисленных работ KillerRed применили под контролем аденовирусного промотора hTERT, таким образом, усиливая действие онколитического вируса. Во второй статье также использовали аденовирус, в чей геном встроен KillerRed, но дополнительно «сшили» его с железными наночастицами – для более быстрой таргетированной доставки вируса, вколотого в кровь, до опухоли.

KillerRed использовали для ФДТ, в том числе, не доставляя его непосредственно в опухолевые клетки, а используя анаэробные бактерии, несущие данный белок: их подсаживали к опухолям в мышах. При облучении авторы наблюдали диффузию АФК от данных бактерий к опухолевым клеткам; в течение дня после облучения оранжевым светом опухоли погибали путем некроза и через несколько дней их невозможно было детектировать [Yan et al., 2015]. Облучение

KillerRed в митохондриальной локализации или в составе химерного белка с гистоном H2B непосредственно в опухолевых клетках приводили, напротив, к апоптозу – менее вредному для организма механизму удаления опухолевых клеток; однако, доля погибших клеток была ниже, чем в случае в случае использования бактерий [Shirmanova et al., 2013].

KillerRed является не только фотосенсибилизатором, но и сильным иммуногенным фактором. Это было показано на линии рака кишечника CT26 у мышей. Опухоли, несущие KillerRed, развивались медленнее контрольных, и при этом легочные метастазы и повторно подсаживаемые опухоли у мышей, для которых хирургически удаляли первую опухоль, не развивались [Yuzhakova DV et al., 2015].

Интересным примером применения ФДТ с участием KillerRed стала репарация ишемического повреждения. Для этого в организм вносили плюрипотентные клетки, несущие KillerRed. После залечивания ими повреждения, KillerRed использовали как белок самоуничтожения, облучая несущие его клетки. Таким образом удалось предотвратить формирование тератомы из плюрипотентных клеток [Cho et al., 2015]. Возможно, одной из перспективных областей применения KillerRed является использование его в качестве механизма контроля для экзогенно привнесенных в организм клеток.

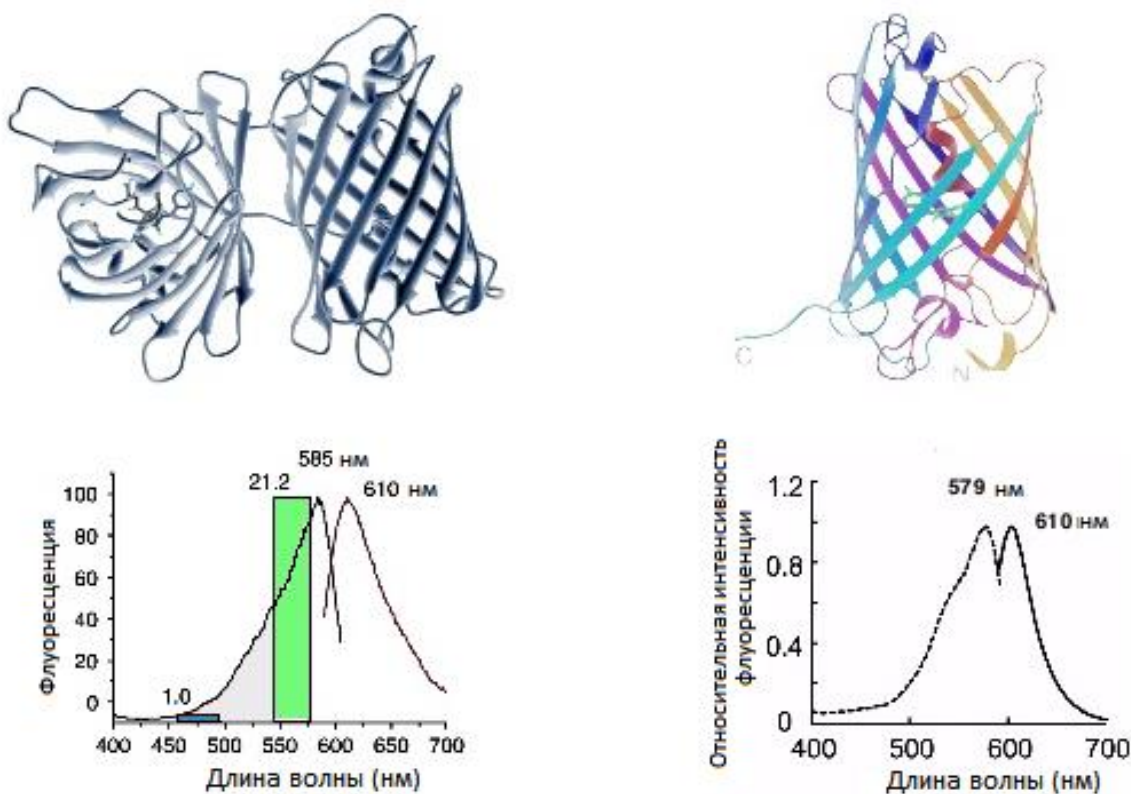
1.1.3.2 Мономеризация KillerRed: SuperNova

Как уже было сказано ранее, KillerRed – димеризующийся белок; поэтому слияние с другими белками может приводить к потере их функциональности. Так, например, экспрессия химерного гена H2A-KillerRed даже без облучения приводит к утрате способности клеток делиться [Waldeck et al., 2009]. Использование тандемной версии KillerRed (две копии белка, соединенных гибким линкером) позволяет избежать этой ситуации. Для других димерных белков было показано, что в составе тандемной конструкции они формируют внутримолекулярные димеры, свойства которых в составе химерных конструкций во многих случаях соответствуют свойствам мономерных белков [Shaner et al., 2004], что подтвердилось и в данном случае – на примере H2B-tKillerRed [Serebrovskaya et al., 2011]. Однако тандемная версия обладает большим размером, что может негативно сказаться на свойствах целевого белка, особенно если он меньшего размера. Таким образом, лучше все-таки использовать изначально мономерные белки.

Методами направленной эволюции и случайного мутагенеза из KillerRed был получен мономерный вариант, который назвали SuperNova [Takemoto et al., 2013]. Он отличается от исходного варианта шестью заменами: G3V, N145S, L160T, F162T, L172K, M204T.

Максимум возбуждения нового варианта слегка сдвинут относительно исходного: 579 против 585 нм, но максимум эмиссии остался неизменным: 610 нм (см. рисунок 20). Коэффициент экстинкции при максимуме возбуждения составил $33,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, а квантовый выход – 0.3. С помощью гель-фильтрации было показано отсутствие димерной фракции. По данным авторов, этот белок обладает более высокой скоростью созревания, чем KillerRed, но меньшей фотостабильностью. Было показано что SuperNova в составе белков слияния с виментином, актином и гистоном H2B не нарушает внутриклеточную локализацию перечисленных белков.

KILLER RED VS SUPER NOVA



Takemoto et al, 2013. Bulina et al, 2006

<http://www.slideshare.net/nisalgadoc/supernova-for-cali-technique>

Рисунок 20 – Сравнение KillerRed и SuperNova по спектрам возбуждения и флуоресценции. Слева представлены данные для KillerRed (димер), справа - для SuperNova (мономер).

Данные о фототоксичности нового варианта KillerRed, однако, нуждаются в уточнении, поскольку они частично противоречат предыдущим публикациям. В отличие от работ других исследователей, в данной работе получены результаты о продукции синглетного кислорода как у SuperNova, так и у KillerRed. Причем непосредственно в эксперименте, который с KillerRed уже проводили до этого другие группы (гашение ADPA) – с противоположным результатом, то есть, в их исследованиях образования синглетного кислорода не детектировалось [Vegh et al., 2011; Shu et al., 2011]. Таким образом, механизм фототоксичности SuperNova нуждается в дополнительном изучении.

Эксперименты по продукции SuperNova пероксида водорода продемонстрировали, что он должен оказаться менее фототоксичным, чем KillerRed, поскольку производит меньше данных АФК (на 10%). Это соответствовало практическим результатам, - теми же авторами было показано и на бактериях, и на клетках млекопитающих, что SuperNova чуть менее эффективно приводит клетки к гибели, чем KillerRed. Однако, продемонстрированная разница на клетках млекопитающих нуждается в подтверждении, в частности, поскольку выборка была невелика (двадцать клеток, что объясняется выбранным методом облучения – с помощью лампы микроскопа).

KillerRed и SuperNova – перспективные молекулярно-биологические инструменты, которые нуждаются в дальнейшем изучении и модификациях для повышения яркости, увеличения фототоксичности и улучшения других параметров с целью расширения диапазона их применения.

1.2 Апоптоз и сенсоры для его детекции

1.2.1 Введение

Морфологически разделяют три типа клеточной гибели: апоптоз, автофагию и некроз (подробнее – см. выше, раздел «Возможные молекулярные механизмы клеточной гибели при воздействии ФС»). Данная глава посвящена апоптозу (см. рисунок 21).

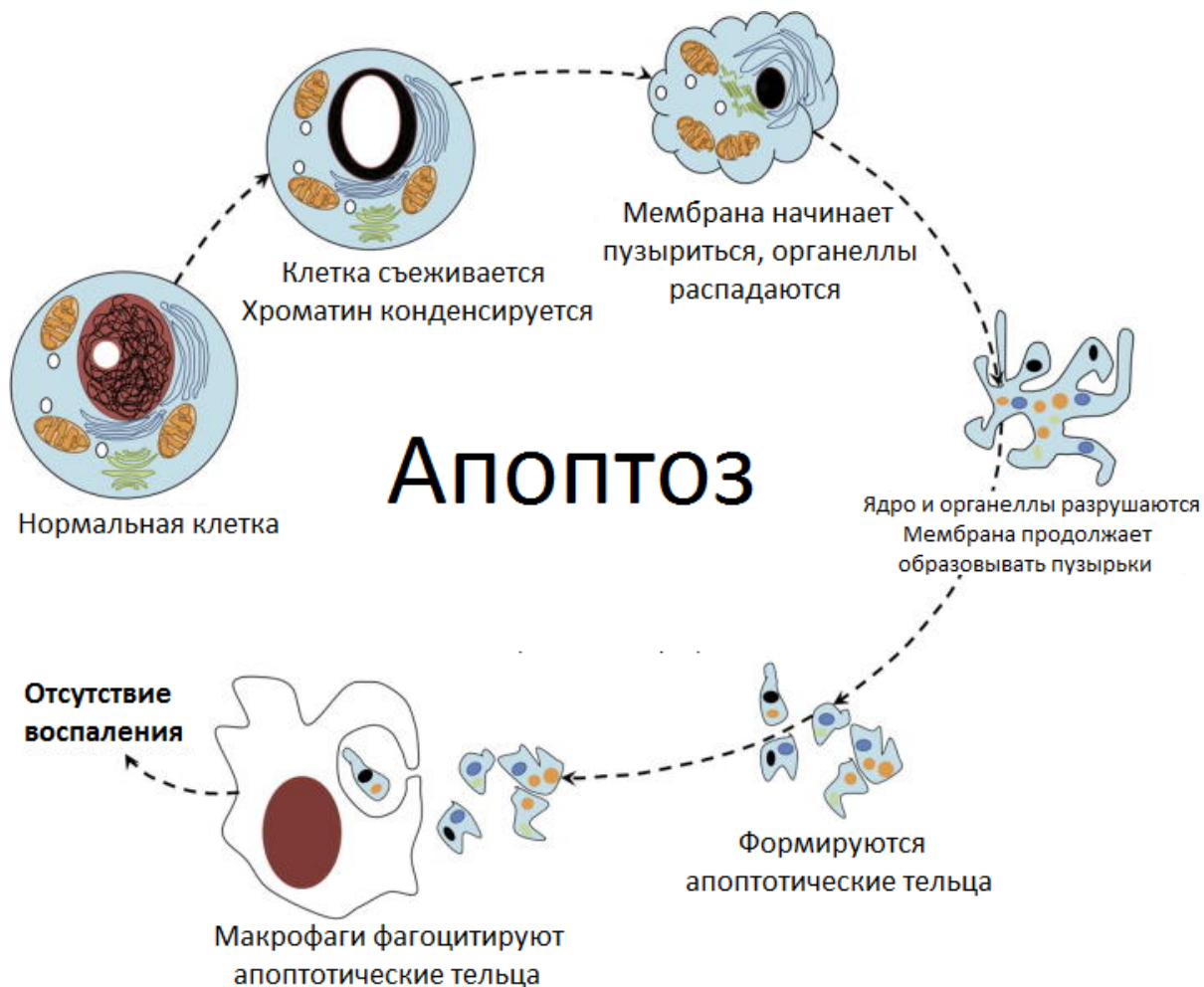


Рисунок 21 – Схема стадий апоптоза на клеточном уровне (по [Abou-Ghali & Stiban, 2015]).

В многоклеточных организмах апоптоз задействован в процессах дифференциации и морфогенеза, в поддержании клеточного гомеостаза, в обеспечении важных аспектов развития и функционирования иммунной системы [Ярилин, 2003].

Апоптоз необходим для уничтожения дефектных (инфицированных, повреждённых или мутантных) клеток. При успешном (для больного) ходе болезни инфицированные клетки погибают в результате активации рецептор-зависимого апоптоза, дабы предотвратить распространение

вируса. Поэтому некоторые вирусы выработали способность нарушать нормальную регуляцию механизма программируемой клеточной гибели, или даже активно предотвращать апоптоз.

При нарушении апоптотической системы негативные последствия могут быть весьма разнообразными, учитывая количество функций апоптоза в организме. Например, нарушение Т-клеточного апоптоза, необходимого для программы негативной селекции Т-лимфоцитов, позволяет выжить аутореактивным клонам. В конечном итоге это приводит к иммунной реакции против собственных клеток и тканей организма, то есть, аутоиммунной патологии.

Сбои в механизме апоптоза приводят и к возникновению злокачественных опухолей. Опухолевые клетки, несмотря на накопленные критические мутации, не уходят в апоптоз; они перестают реагировать на сигналы иммунной системы, продолжая расти и пролиферировать.

С другой стороны, потеря контроля над данным видом клеточной гибели (т.е. избыточный апоптоз) может привести к нейродегенеративным или гематологическим заболеваниям и повреждениям тканей. Болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз, болезнь Паркинсона связаны именно с патологией апоптоза [Schwartz & Milligan, 1996].

Развитие ВИЧ также напрямую связано с избыточным, нерегулируемым апоптозом. У здорового человека количество CD4+ лимфоцитов поддерживается примерно на одном и том же уровне – благодаря постепенному обмену погибающих клеток на новые, развивающимися в костном мозге. У пациентов с ВИЧ этот баланс потерян, поскольку костный мозг не в состоянии производить новые CD4+ клетки, а уже имеющиеся ускоренно погибают от неконтролируемого апоптоза [Trinité et al., 2015].

1.2.2 Механизмы развития апоптоза

Апоптоз может начинаться несколькими способами, наиболее распространенными из которых являются «внешний» (рецептор-зависимый) и «внутренний» (митохондриальный) сигнальные пути. В ходе данных путей активируются каскады особых протеаз, называемых каспазами. Апоптоз может реализовываться и без их участия (каспаз-независимый апоптоз). Он запускается, в частности, при деструкции митохондрии и высвобождении фактора, индуцирующего апоптоз [Daugas et al., 2000]. Данный вид апоптоза реализуется реже и не является предметом рассмотрения этой работы; далее приведена информация о рецептор-зависимом и митохондриальном путях активации (см. рисунок 22).

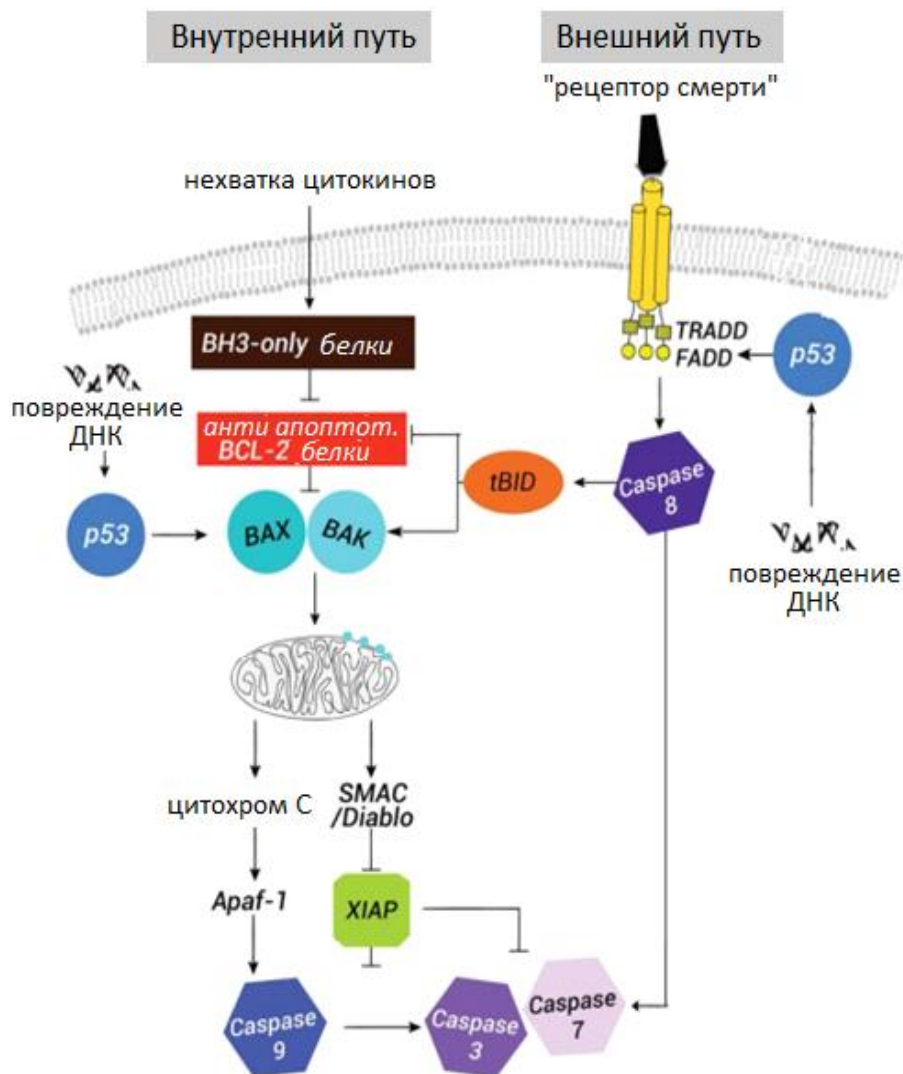
Рисунок 22 – Внешний и внутренний пути апоптоза позвоночных (по [Juraver-Geslin & Durand, 2015]).

Внутренний путь: в нормальных условиях проапоптотические белки Вах и Вак репрессированы антиапоптотическими белками Bcl2, Mcl1 и BclXL. Проапоптотические стимулы, такие как недостаток цитокинов или стресс эндоплазматического ретикулума, вызывают индукцию BH3-only белков, которые снимают эффект Bcl2 и Bcl-XL. Это приводит к освобождению Вах и Вак, которые затем встраиваются во внешнюю мембрану митохондрий и формируют поры. Ключевым событием индукции апоптоза является высвобождение через поры цитохрома С и SMAC/Diablo (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases или Direct IAP binding protein with low pI) из митохондриального пространства в цитоплазму. SMAC/Diablo ингибирует IAP-белки (inhibitors of apoptosis), а цитохром С привлекает АРАF-1 (Apoptotic protease activating factor 1) для формирования апоптосомы. Апоптосома активирует каспазу-9, что приводит к активации каспаз 3 и 7 и необратимой клеточной гибели.

Внешний путь: стимуляция «рецепторов смерти» приводит к привлечению адаптерных белков, таких как TRADD и FADD, через их «домен смерти». Это привлекает к мембране каспазу-8, которая димеризуется и может напрямую активировать каспазу-3 и каспазу-7.

Пересечение между внешним и внутренним путями на уровне выше эффекторных каспаз может быть реализовано при расщеплении каспазой 8 агониста BH3-only белков – BID (BH3 interacting-domain death agonist). Продукт этого расщепления t-BID (truncated BID) ингибирует Bcl2, Mcl1 и Bcl-XL и вызывает аккумуляцию Вах и Вак. Оба пути, внешний и внутренний, могут быть активированы при стимулировании белка p53 из-за сильного повреждения ДНК.

Оба пути, внешний и внутренний, могут быть активированы при стимулировании белка p53 из-за сильного повреждения ДНК.



1.2.2.1 Рецептор-зависимый сигнальный путь

В случае рецептор-зависимого («внешнего») сигнального пути апоптоз начинается с взаимодействия специфических внеклеточных лигандов с рецепторами клеточной гибели, находящимися на поверхности клеточной мембраны (правая часть схемы на рисунке 22). Внеклеточные участки рецепторов связывают тримеры лигандов и в свою очередь тримеризуются. Затем рецепторы передают сигнал внутрь клетки через особый домен, названный доменом смерти («death domain»).

Наиболее изучены два пути инициации «внешнего» апоптотического механизма у млекопитающих: через рецептор TNFR1 (Tumour Necrosis Factor receptor 1, или CD120a) и через рецептор Fas (First apoptosis signal, или CD95). Оба рецептора принадлежат семейству TNF, как и их лиганды: фактор некроза опухоли (TNF) и Fas-лиганд (FasL) соответственно.

Активированные рецепторы взаимодействуют с соответствующими внутриклеточными адаптерами. Это инициирует путь, который приводит к активации каспаз с помощью мембранных белков-посредников. Для рецептора TNFR1 адаптером является TRADD (TNFR1-associated Death Domain-protein — «белок, взаимодействующий с доменом смерти TNFR1-рецептора»). Адаптер рецептора Fas аналогично назван FADD (Fas-associated Death Domain-protein) [Peter et al., 1997].

После образования комплекса лиганд-рецептор-адаптер, последний вступает во взаимодействие с эффекторами — прокаспазами (неактивными предшественниками протеаз из семейства иницирующих каспаз). Таким образом формируются агрегаты, в которых происходит активация каспаз, — апоптосомы или сигнальные комплексы, индуцирующие смерть (DISC — death-inducing signaling complex). Например, DISC, который содержит FasL-Fas-FADD, активирует каспазу 8 [Peter et al., 1997].

В некоторых типах клеток активированная каспаза-8 может напрямую активировать другие белки-каспазы, что приводит к началу апоптоза. В других типах клеток комплекс Fas-DISC в начале вызывает обратную петлю, запуская увеличение выброса проапоптотических факторов из митохондрии и усиленную активацию каспазы 8 [Chang et al., 1998]. Активированные иницирующие каспазы (-2, -8, -9, -10, -11, -12) далее участвуют в активации эффекторных каспаз (-3, -6, -7).

1.2.2.2 Митохондриальный сигнальный путь

Второй широко распространенный путь реализации апоптоза – митохондриальный, то есть, вызванный «внутренними» причинами (левая часть схемы на рисунке 22). Без нормально функционирующих митохондрий клетка довольно быстро умирает, поэтому митохондрии часто становятся мишенью для инициации апоптоза. Апоптогенные белки либо формируют поры в митохондриальной мембране, либо увеличивают ее проницаемость за счет открытия каналов. В результате этого апоптотические эффекторы высвобождаются в цитоплазму клетки [Mohan et al., 2010].

Некоторые белки, которые выходят в цитоплазму, являются косвенными активаторами каспаз: они связывают белки-ингибиторы каспаз, не позволяя им предотвратить апоптоз [Fesik & Shi, 2001]. Цитохром С, который тоже высвобождается через формирующиеся каналы [Laurent et al., 2006], связывается с апоптотическим фактором активации протеаз (Apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1), АТФ и прокаспазой-9, формируя апоптосому. Апоптосома разрезает прокаспазу-9, превращая ее в функционирующую каспазу-9 [Pop et al., 2006], которая затем активирует эффекторную каспазу-3.

Таким образом, ключевым событием митохондриального пути апоптоза является повышение проницаемости наружной мембраны митохондрий. Существенную роль в этом играют апоптотические белки семейства Bcl-2 (**B-cell lymphoma 2**) — Bax и Bak. В нормальных условиях Bax равномерно распределен по цитозолю, однако в начале апоптоза он претерпевает конформационное изменение, встраивается в наружную мембрану митохондрий и олигомеризуется вместе с белком Bak, что приводит к формированию поры [Buytaert et al., 2006-b]. По другим данным, Bax взаимодействует с потенциал-зависимым каналом, что приводит к его открытию [Shi et al., 2003] и последующей активации каспаз.

В любом случае, оба пути (и от рецепторов смерти, и митохондриальный) приводят к активации эффекторных каспаз и, в частности, каспазы-3 – ключевого апоптотического фермента.

1.2.3 Каспазы

Каспазы (англ. caspase - **c**ysteine-**d**ependent **a**spartate-**d**irected **p**rotease) – это семейство цистеиновых протеаз, которые играют важную роль не только в апоптозе, но и в других процессах, в частности, при некрозе и воспалении [Alnemri et al., 1996].

Работа каспаз регулируется на пост-трансляционном уровне, что обеспечивает возможность их быстрой активации. Сперва они синтезируются в виде неактивных предшественников – прокаспаз, которые состоят из продомена (временно деактивирующего фермент), малой и большой субъединиц.

В зависимости от способности инициировать тот или иной тип клеточной смерти, каспазы делят

на: воспалительные, инициирующие пироптоз (каспазы-1, -4, -5, -11, -12; 15 [Lamkanfi & Dixit, 2014]), и невоспалительные, участвующие в апоптозе (каспазы-2, -3, -6 -7, -8, -9, -10 [Nuñez et al., 1998]).

Каспазы, которые участвуют в апоптозе, разделяют на инициаторные (-2, -8, -9, -10) и эффекторные (-3, -6, -7). У инициаторных каспаз деактивирующий продомен больше, чем у эффекторных, и может включать такие домены как CARD (**c**aspase **r**ecruitment **d**omain, например, у каспазы-2 и каспазы-9 [Wang et al., 2006]) или DED (**d**eath **e**ffector **d**omain, например, у каспазы 8 и 10 [Alcivar et al., 2003]), которые позволяют прокаспазам взаимодействовать с их активаторами. При наличии стимула инициаторные каспазы собираются в кластеры, что позволяет активироваться им самим – и активировать эффекторные каспазы; для этого также необходимо расщепить неактивные предшественники. Эффекторные каспазы в свою очередь разрезают другие белковые мишени и непосредственно участвуют в апоптотической трансформации клетки (см. рисунок 23).

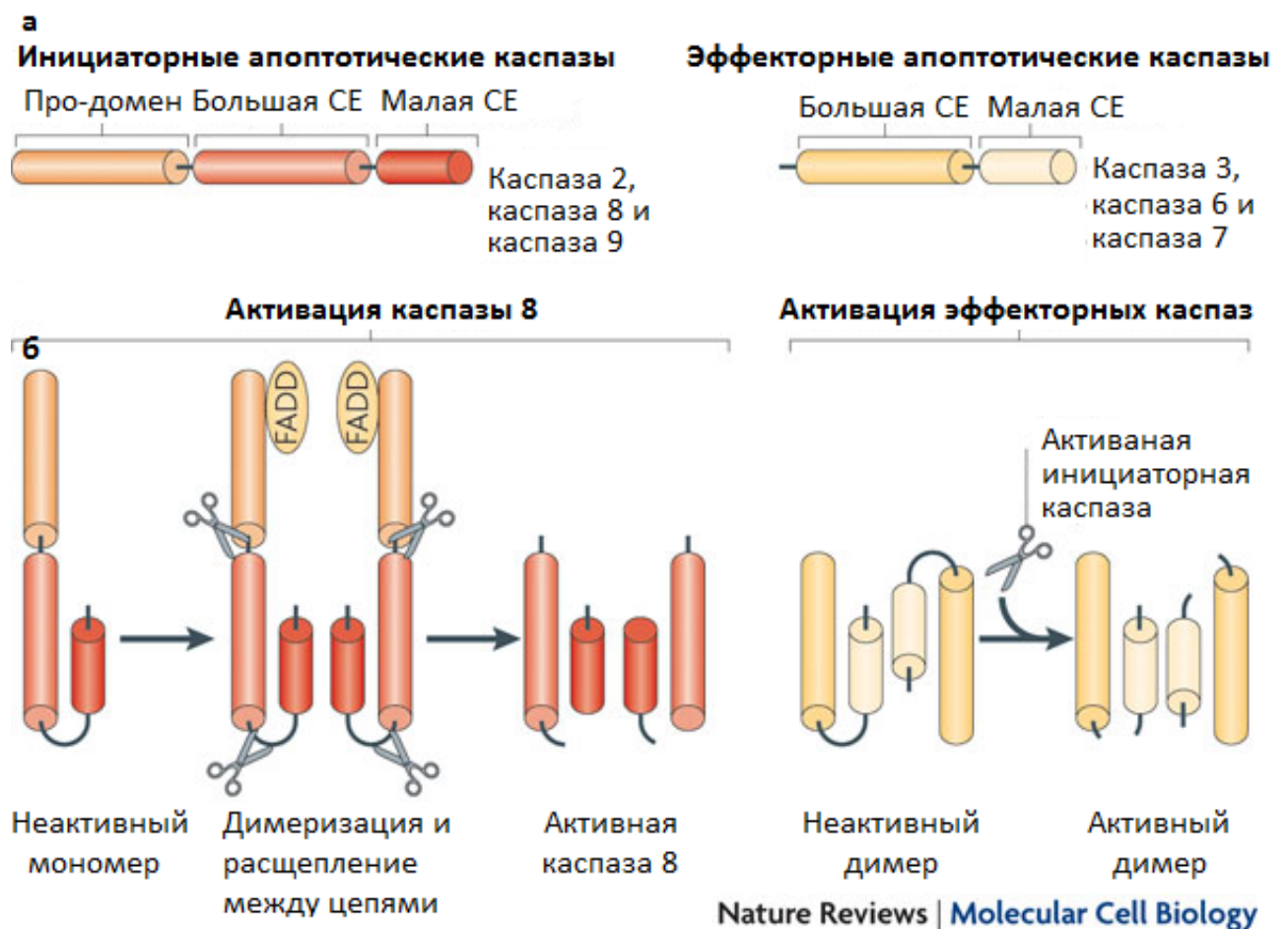


Рисунок 23 – А: строение неактивных инициаторных и эффекторных каспаз; Б - активация инициаторной каспазы на примере каспазы-8 и активация эффекторных каспаз (по [Tait & Green, 2010]).

Каспазные каскады могут быть активированы разными стимулами:

- гранзимом Б (оружие цитотоксических Т-лимфоцитов и НК-клеток), он – может напрямую активировать эффекторные каспазы-3 и -7 [Li et al., 2014];
- «рецепторами смерти» (например, Fas, TRAIL-рецепторами или рецепторами TNF), что приводит к активации инициаторных каспаз-8 и -10;
- апоптосомой митохондриального происхождения (регулируется цитохромом С и семейством Bcl-2 белков), которая активирует инициаторную каспазу-9.

Каким бы ни был исходный стимул, в результате все пути апоптоза пересекаются на эффекторных каспазах, ключевой из которых является каспаза-3.

1.2.4 Каспаза-3

Каспаза-3 – цитозольный фермент. Как и другие эффекторные каспазы, каспаза-3 сначала находится в неактивном состоянии, для выхода из которого необходимо протеолитическое расщепление по определенным остаткам аспарататов (это осуществляют каспазы-8, -9 и -10 [Engels et al., 2005; Zhao et al., 2014]). Образующиеся две субъединицы, большая и малая, димеризуются (см. рисунок 24) и образуют активный фермент, расщепляющий 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 [Slee et al., 2001; Walsh et al., 2008]).

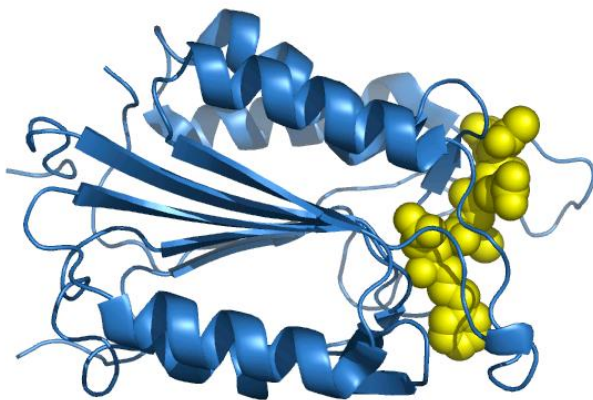


Рисунок 24 – Димер каспазы 3 (показан синим цветом), связанный с фенил-пропил-кетонным ингибитором (показан желтым). Изображение получено из базы PDB (ID: 1RHK).

Большая часть субстратов каспазы могут быть разделены на две категории: 1) регуляторы апоптоза, которые активируются или инактивируются при разрезании и 2) «белки домашнего хозяйства» или структурные белки, чье расщепление необходимо для контролируемой деградации клетки.

1) *Влияние каспазы-3 на регуляторы апоптоза* (по [Мартынова, 2003]):

- при инициации апоптоза каспаза-3 блокирует передачу сигнала ростовых факторов (осуществляя протеолиз G4-Gd1-белка из семейства Rho-ГТФаз). Она же расщепляет протеинкиназу-С (изоформу δ , ξ или ϵ – в зависимости от типа клеток и апоптотического сигнала), что также блокирует определенные сигнальные пути;
- при рецептор-зависимом апоптозе каспаза-3 расщепляет факторы транскрипции, например, ингибиторную субъединицу I κ B α фактора транскрипции NF- κ B. Это прерывает сигналы выживания, связанные с активацией NF- κ B при распознавании рецепторов TNF;
- благодаря каспазе-3 повышается активность белков-ингибиторов клеточного цикла p21^{WAF1} и p27^{KIP1} и происходит дефосфорилирование Rb-белка (белок гена ретинобластомы), что приводит к остановке клеточного цикла;
- опухолевый супрессор p53 активирует каспазу-3, а та гидролизует его негативный регулятор MDM2, обеспечивая таким образом положительную обратную связь;
- каспаза 3 может дополнительно активировать каспазы-6, -7 и -9.

2) *Влияние на белки «домашнего хозяйства»:*

- расщепляя фактор инициации трансляции eIF4G (отвечает за связывание рибосомы с мРНК), каспаза-3 осуществляет ингибирование трансляции [Мартынова, 2003];
- расщепление поли(АДФ-рибоза)-полимеразы и ингибитора нуклеазы DFF40/CAD - DFF45/ICAD (**DNA-Fragmenting Factor / Inhibitor of Caspase Activated DNase**) приводит к фрагментации клеточной ДНК [Wall & McCormick, 2014];
- при повышении лимита диффузии высокомолекулярных белков через ядерные поры каспаза-3 входит в ядро и расщепляет ядерные белки LAP2 и нуклеопорин Nup153; совместно с ядерной активностью каспазы-6 это приводит к дезорганизации хроматина, сморщиванию ядра и его фрагментации [Мартынова, 2003].
- структурные белки цитоскелета актин и фодрин тоже являются субстратами каспазы-3 [Chen et al., 2015]. Кроме того, она может дестабилизировать адгезивные контакты, ингибируя ассоциацию β -катенина с E-кадгеринном [Juraver-Geslin & Durand, 2015].

Помимо функций, связанных с активацией апоптоза, у каспазы-3 есть функции, которые влияют на другие клеточные процессы помимо апоптоза. Это, например, регуляция деления нейроэпителиальных клеток. Организмы, лишенные каспазы-3, не в состоянии нормально сформировать мозг.

Каспаза-3 тормозит клеточное деление, влияя на сигнальный Wnt-каскад. Ее отсутствие приводит к повышенному уровню циклина D1, являющегося важным компонентом контрольной точки, в которой клетка решает, поделиться ей – или перейти в состояние покоя. Таким образом, было выдвинуто предположение, что каспаза-3 продлевает G1-фазу клеточного цикла [Juraver-Geslin & Durand, 2015].

В недавних исследованиях показано, что лимитированная активность каспазы-3 необходима для корректной работы синапсов нейронов [Guliaeva, 2004; Li et al., 2010]; при повышенной же концентрации клетки уходят в апоптоз. Более того, стало ясно, что корректная работа каспазы-3 необходима для обучения и памяти у различных животных: например, птиц [Huesmann & Clayton, 2006] и крыс [Dash et al., 2000; Stepanichev et al., 2005].

Функции каспазы-3 не ограничиваются пределами клетки, в которой она была синтезирована. Активация каспазы-3 в апоптотических клетках может оказывать противоположный, стимулирующий пролиферацию эффект на соседние, неапоптотические клетки. Высказано предположение, что процесс регенерации окружающей ткани зависит от работы каспазы-3 в умирающих клетках, поскольку она воздействует на сигнальные пути соседних клеток. Например, каспаза-3 активирует кальций-независимую фосфолипазу A2 (iPLA2), которая производит лизофосфатидную кислоту (может блокировать апоптоз, за счет предотвращения расщепления поли(АДФ-рибоза)-полимеразы) и арахидоновую кислоту (увеличивает миграцию соседних клеток) [Zhao et al., 2006]. Исследования на мышах показали, что активация каспазы-3 индуцирует фактор роста соединительной ткани, что увеличивает фиброгенез [Laplante et al., 2010]. Для β -клеток островков Лангерганса был также показан паракринный стимулирующий эффект от каспаз-зависимого апоптоза [Bonner et al., 2010].

Более того, есть версия, что активность каспазы-3 в опухолевых клетках, подвергнутых радиотерапии, может вызвать репопуляцию опухоли за счет выделения простагландина E(2), стимулирующего деление окружающих клеток [Huang et al., 2011]. Таким образом, активность каспазы-3 представляет существенный интерес как для научных исследований, так и для медицины.

1.2.5 Апоптоз, некроз и медицинская терапия

В настоящее время одним из главных методов лечения злокачественных опухолей является химиотерапия. Многие химиотерапевтические агенты, такие как винкристин, паклитаксел, этопозид, цисплатин обладают противоопухолевой эффективностью за счет ареста клеток на разных этапах клеточного цикла с последующим их уходом в апоптоз (Gidding et al., 1999; Sleiman & Stewart, 2000; Das et al., 2001).

Основной проблемой подобных лекарств является их неизбирательное действие, что приводит к гибели не только мутантных, но и здоровых клеток. Поэтому необходим поиск адресного способа доставки лекарств – или разработка новых, которые действуют именно на опухоль с высокой специфичностью.

При этом необходимо, чтобы препарат вызывал именно апоптоз, а не некроз клеток (см. рисунок 25). В ходе апоптоза содержимое погибающих клеток не выбрасывается наружу, а заключается в пузырьки, которые поглощаются другими клетками, в частности, фагоцитами. В отличие от апоптоза, некроз – это патологический процесс, который приводит к нерегулируемому расщеплению клеточных компонентов и аутолизису клетки. Некроз почти всегда разрушителен и может быть даже смертелен, поскольку вызывает воспалительную реакцию в окружающей ткани.

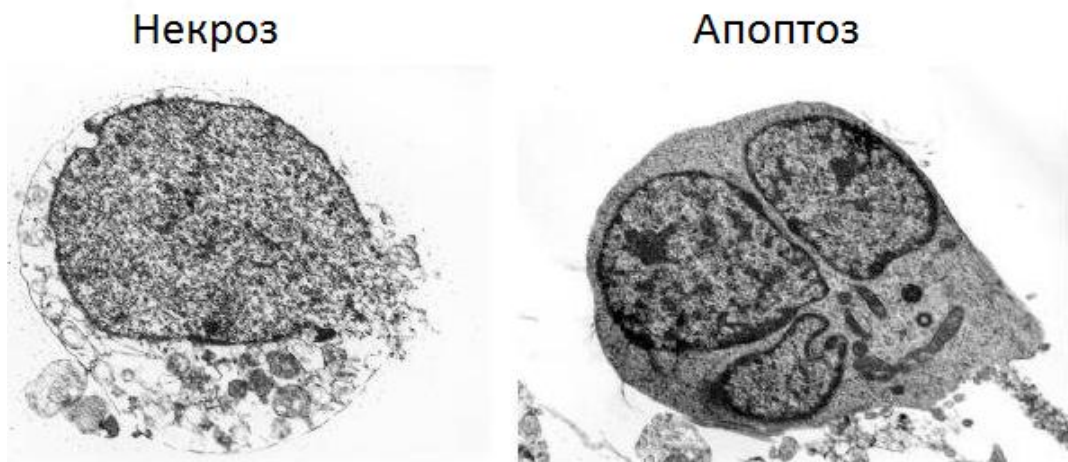


Рис. 25 Гистологические отличия некротизирующей нейрональной клетки (разрушение мембраны, потеря электронной плотности цитозоля) от апоптотической (целостная мембрана, фрагментация ядра и конденсация хроматина). (по [Ueda et al., 2007])

Таким образом, для разработки корректной терапии (в частности, противоопухолевой) и изучения механизма ее действия необходимо использовать сенсор, определяющий тип клеточной гибели в случае применения данной терапии.

1.2.6 Сенсоры для детекции апоптоза

В настоящее время существует довольно широкий спектр методов для детекции апоптоза, с использованием от химически синтезированных соединений – до генетически кодируемых сенсоров. В данном обзоре будут рассмотрены сенсоры на активность каспазы-3.

1.2.6.1 Внеклеточные сенсоры для детекции активности каспазы-3

Химически синтезированные сенсоры для определения апоптоза делятся на несколько групп по принципу детекции. Например, существуют потенциал-зависимые сенсоры, в частности, на основе (18)фтор-флуоробензил-трифенил-фосфониума [Madar et al., 2009]. При развитии апоптоза клетки перестают захватывать сенсор из внеклеточного пространства. Однако при таком типе детекции невозможно прицельно проследить за активацией каких-либо апоптотических сигналов, - только установить наличие апоптоза в клетке.

Широко представлены *in vitro* сенсоры, обеспечивающие более наглядное представление об апоптозе. Эти сенсоры основаны на детекции активности каспазы-3 с помощью специально подготовленной поверхности. На ней иммобилизуют вещества, содержащие аминокислотный линкер с сайтом разрезания каспазой –DEVD (далее в тексте для краткости будет использована именно эта аббревиатура; практически во всех типах сенсоров используют именно эту последовательность). В зависимости от типа соединений, детекция может осуществляться разными методами.

В некоторых исследованиях используется метод SPR (Surface Plasmon Resonance) и атомно-силовая микроскопия [Kosaihiro & Ona T, 2008; Park et al., 2008; Chen et al., 2013]. Другая электрохимическая платформа для непрямой детекции каспазы-3 основана на стеклоуглеродном электроде с золотыми наночастицами с иммобилизованными биотинилированным сайтом DEVD и щелочной фосфатазой. Детекцию осуществляют с помощью дифференциальной импульсной вольтамперометрии [Zhou et al., 2014].

Многие исследования для визуализации апоптоза используют изменение флуоресценции на специально подготовленной поверхности; например, биотинилированный сигнал DEVD, связанный с тушителем (подавляющим флуоресценцию поверхности) на иммобилизованном биотин-связывающем белке. При активации каспазы-3 отрезает тушитель, что приводит к восстановлению сигнала флуоресценции [Kumaraswamy et al., 2004].

Для детекции активности каспазы-3 используют и изменение Ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET, Förster resonance energy transfer: подробнее о методе см. раздел *FRET-сенсоры*), например, между иммобилизованными на поверхности квантовыми точками, соединенными линкером DEVD [Prasuhn et al., 2010] (см. рисунок 26). Ранее эта же группа ученых в роли акцептора энергии использовала не другую квантовую точку, а флуоресцентный белок mCherry; в остальном принцип метода совпадал [Voенeman et al., 2009].

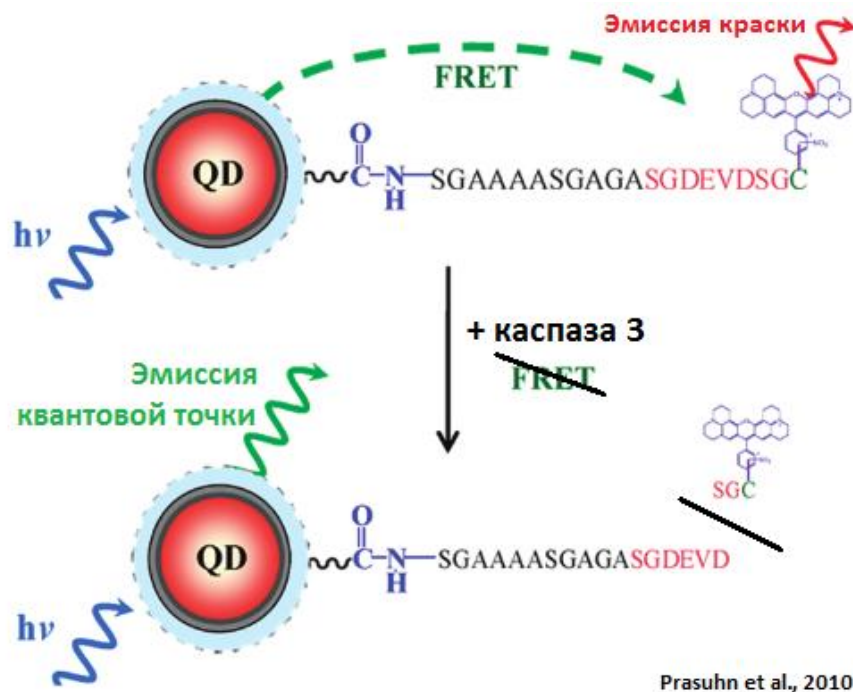
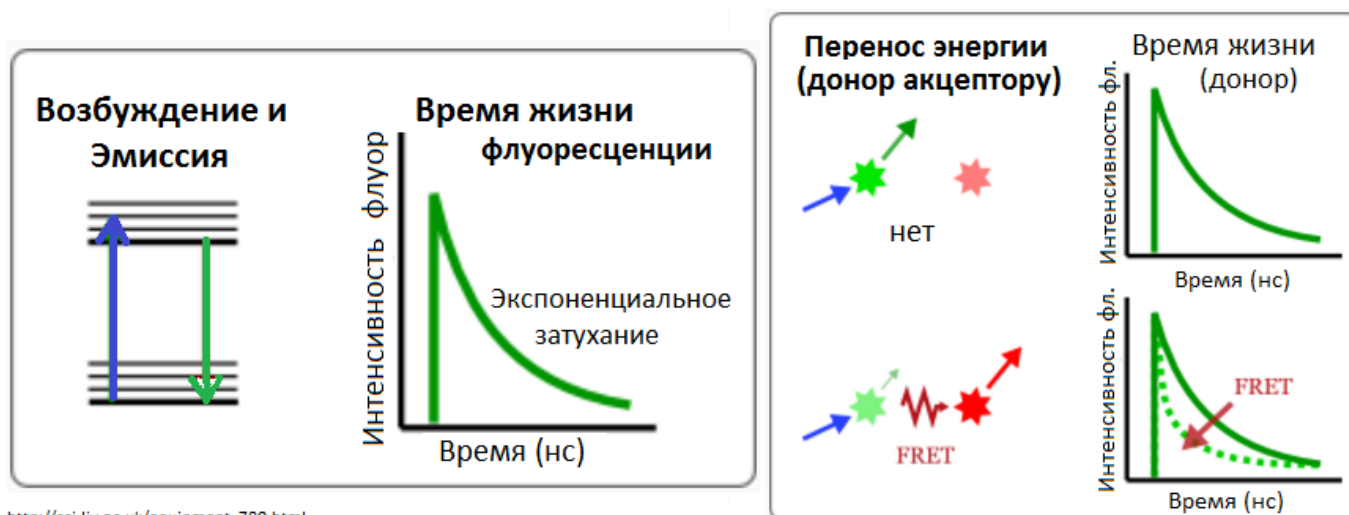


Рисунок 26 – Схема FRET-сенсора, основанного на квантовой точке и полициклического флуорофора (no [Prasuhn et al., 2010]).

In vitro методы, основанные на FRET, не обязательно требуют специально подготовленной поверхности. Например, был разработан частично генетически кодируемый сенсор на основе флуоресцентного белка TagRFP, соединенного сайтом DEVD с пептидом, связывающим хелат тербия. Энергия передается от возбужденного триптофана пептида – к иону тербия, а от него – к хромофору TagRFP. Детекцию сигнала проводили, в частности, с помощью технологии FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging, схема метода представлена на рисунке 27).



http://cci.liv.ac.uk/equipment_780.html

Рисунок 27 – Теоретические основы технологии FLIM. После возбуждения молекул флуорофора флуоресценция происходит в течение некоторого времени, экспоненциально затухая. “Время жизни флуоресценции” характеризует время, в течение которого флуорофор существует в возбужденном состоянии - перед испусканием фотона и возвращением в основное. При наличии FRET – безызлучательной передачи энергии акцептору - время жизни флуоресценции донора сокращается. (изображение с сайта Centre for Cell Imaging Ливерпульского Университета)

Технология FLIM основана на измерении времени жизни флуоресценции. С ее помощью можно, в частности, различить белки с одинаковым максимум эмиссии – если время жизни флуоресценции одного отличается от другого. Поскольку этот параметр зависит как от процесса высвечивания фотонов, так и от безызлучательных процессов (например, передачи энергии при FRET), то для FRET-сенсоров характерно сокращение времени жизни флуоресценции донора. Благодаря этому с помощью FLIM можно различить нативное и расщепленное состояние сенсора (см. рисунок 27). Это особенно показательно в данном случае, поскольку время жизни флуоресценции иона тербия находится в диапазоне микросекунд, что намного превышает время жизни органических хромофоров и флуоресцентных белков [Goryashchenko et al., 2015].

Более того, была разработана методика, использующая iFRET – внутримолекулярный перенос энергии. Лиганды (основанные на ингибиторах каспазы) связываются с каспазой из клеточных лизатов. При освещении лизатов ультрафиолетом, триптофаны каспазы переходят в возбужденное энергетическое состояние и передают энергию на лиганды, которые и флуоресцируют [Kang et al., 2015].

Методы, основанные на подобных технологиях, подходят для скрининга лекарственных препаратов и других задач, которые не требуют визуализации процессов в одиночных клетках и в принципе сохранения интактных клеток. Кроме того, параллельная детекция в реальном времени других апоптотических процессов в таких моделях затруднена (возможно ограниченное использование клеточных лизатов, например, для постановки белковых электрофорезов и Вестерн-блотов). Поэтому разрабатываются и совершенствуются сенсоры, которые способны проникать внутрь (или синтезироваться непосредственно внутри) клеток.

1.2.6.1 Внутриклеточные сенсоры для детекции активности каспазы-3

1.2.6.1.1 Химически синтезированные сенсоры

Спектр «химических» сенсоров на активность каспазы-3 весьма многообразен. Например, некоторые лекарства содержат встроенный сенсор на каспазу, который активируется при апоптозе. Приведу два примера: в состав одного лекарства на основе платины (IV) входит тетрафенилсилол с пептидом DEVD (исходно не светится из-за свободного вращения фениленовых колец). При расщеплении пептида каспазой-3 гидрофобный флуорофор агрегирует и начинает флуоресцировать [Yuan et al., 2014]. Другое лекарство (на основе пиррофоефорбида) представляет собой фотосенсибилизатор, соединенный линкером, включающим сайт DEVD, с тушителем флуоресценции. Таким образом, на первом этапе при освещении фотосенсибилизатор производит активные формы кислорода. На втором, когда запускается апоптоз и каспаза разрезает линкер, тушитель уходит и возникает сигнал флуоресценции [Stefflova et al., 2006]. Подобные методы встроенных сенсоров – изящное решение, но, к сожалению, годящееся только для конкретного лекарства.

Любые «химические» сенсоры нуждаются в специальной доставке внутрь клетки. В качестве одного из вариантов решения этой проблемы были разработаны флуоресцентные наномицеллы (двухфотонные возбуждаемые дальнекрасным светом), которые связаны линкером, включающим сайт DEVD, с тушителем флуоресценции. Эти наномицеллы одновременно являются транспортером, поскольку эффективно попадают внутрь клетки, и обеспечивают сигнал – при отрезании каспазой тушителя [Yan et al., 2014].

Другой пример – наноконъюгаты оксида графена с пептидом, содержащим сайт DEVD и лизин, меченый флуорофором ФАМ (флуоресцеин амидит). Оксид графена одновременно является транспортером сенсора в клетку и тушителем флуоресценции. Соответственно, при активации каспазы-3 флуорофор отщепляется от носителя и начинает флуоресцировать [Wang et al., 2011].

Сложности, связанные с подобными «химическими» методами, очевидны: во-первых, необходимо каждый раз синтезировать сенсор, который необратимо расходуется в экспериментах (и при этом довольно дорогой). Во-вторых, такие сенсоры подходят для клеточной культуры, но их сложно использовать для мечения, например, целой ткани.

1.2.6.1.2 Генетически кодируемые люминесцентные сенсоры

Генетически кодируемые сенсоры позволяют решить проблему «траты» сенсора, поскольку исследуемая клетка сама его нарабатывает. Одной из известных почти полностью генетически кодируемых систем является люциферазная система. Клетка сама синтезирует люциферазу – и начинает светиться, если добавить в питательную среду субстрат для люциферазы.

На основе этой системы было создано несколько сенсоров на каспазу-3. Например, сенсор, состоящий из сплит-доменов люциферазы, соединенных линкером с сайтом DEVD. Сплит-домены получают разделением последовательности гена на две (или более) части; причем возможно как полное разделение одной последовательности на несколько молекул ДНК, так и неполное, когда между участками вставляют линкер. В данном случае, был реализован второй вариант. При расщеплении белка каспазой домены объединялись в активную люциферазу, таким образом, появлялся люминесцентный сигнал [Lee et al., 2014-b].

Этот метод весьма нагляден, однако его недостаток очевиден: отсутствие люминесцентного сигнала может означать как неапоптотическое состояние клетки, так и отсутствие сенсора в клетке. Сенсоры, основанные на BRET - **B**ioluminescence-based **R**esonance **E**nergy **T**ransfer, - лишены этого недостатка. В данном случае происходит резонансный перенос энергии от люциферазы к зеленому или желтому флуоресцентному белку. При расщеплении каспазой линкера между донором и акцептором наблюдается падение BRET [Dacres et al., 2009-a] (см. рисунок 28). Эта же группа ученых впоследствии сравнила наиболее эффективный из этой пары сенсоров – с сенсором, основанным на FRET (состоящим из цианового и желтого флуоресцентного белков). Их исследование показало, что резонансный перенос энергии для пары люцифераза-зеленый флуоресцентный белок был более эффективен, чем для пары цианового и желтого флуоресцентных белков [Dacres et al., 2009-b].

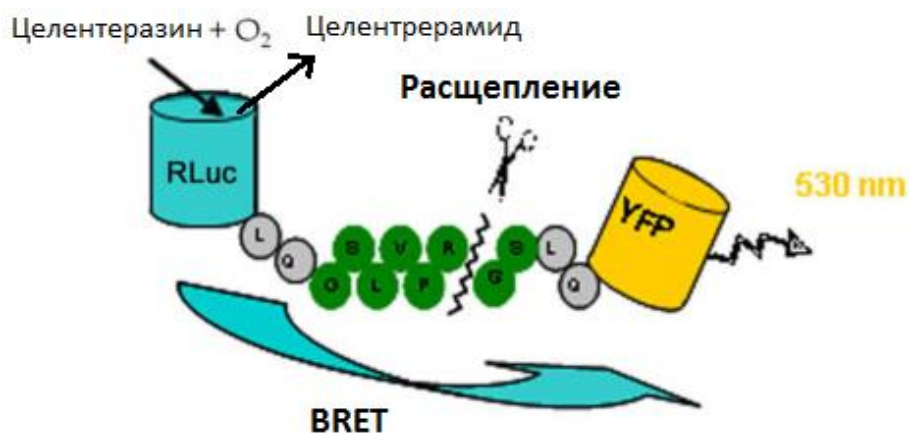


Рисунок 28 – Схема BRET-сенсора на активность каспазы-3. При наличии субстрата (целентеразина) и облучении синим светом люцифераза (RLuc) передает энергию на желтый флуоресцентный белок (YFP), который излучает свет. При расщеплении линкера между белками передача энергии прекращается (измененное изображение из статьи [Dacres et al., 2009-a]).

Впрочем, несмотря на высокую эффективность переноса энергии и, соответственно, значительное изменение сигнала при активации каспазы, необходимость в дополнительном компоненте (субстрате люциферазы) несколько ограничивает применение данного метода. Кроме того, желтый свет не оптимален для работы на уровне целых организмов.

1.2.6.1.3 Генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры

Флуоресцентная микроскопия – мощный инструмент для визуализации динамических процессов в живых клетках на разных уровнях, от индивидуальных молекул до целых организмов. Флуоресцентные белки широко используются как неинвазивные флуоресцентные метки для отслеживания экспрессии генов, локализации или взаимодействия белков, а также в качестве биосенсоров. На их основе создано несколько сенсоров на различные каспазы.

Для каспаз Dpice и Dcp1 был разработан сенсор, состоящий из зеленого и красного флуоресцентных белков, связанных линкером с сайтом разрезания каспаз. При разрезании сенсора зеленый флуоресцентный белок транслоцируется в ядро, поскольку слит с сигналом ядерной локализации. До расщепления превалирует сигнал экспорта из ядра, слитый с красным флуоресцентным белком. Таким образом, при развитии апоптоза цитоплазма остается красной, а ядро становится зеленым [Bardet et al., 2008]. Этот метод весьма нагляден для микроскопии и теоретически можно было бы применить для каспазы-3, изменив линкер, однако в нем оказываются заняты сразу два канала детекции, а кроме того, он его сложнее применять на уровне ткани или целого животного.

В другой работе уже для детекции активности каспазы-3 использовали коммерческий сенсор с аналогичным свойством: при расщеплении каспазой цитозольного белка, его часть, включающая желтый флуоресцентный белок, транслоцируется в ядро. В отличие от предыдущего случая, здесь задействован только один канал. Это добавляет возможность использования освобожденного канала, но зато уменьшает наглядность метода [Werner & Steinfeld, 2008]. Кроме того, остается проблема с использованием подобного сенсора *in vivo*.

Ряд сенсоров основан на появлении или исчезновении сигнала, что более удобно для использования *in vivo*. Например, был разработан сенсор, основанный на возникновении сигнала GFP (зеленого флуоресцентного белка) в процессе апоптоза. Для этого использовали бицистронный вектор, с которого сперва должен транскрибироваться только фактор транскрипции (связанный линкером, включающим сайт DEVD, с сигналом экспорта из ядра). При отрезании каспазой этого сигнала фактор транскрипции транслоцируется в ядро, где связывается со вторым цистроном, кодирующим зеленый флуоресцентный белок, - и наблюдается появление сигнала флуоресценции [Vagner et al., 2015]. Этот метод нагляден; однако, во-первых, отсутствие сигнала может означать как неапоптотическое состояние клетки, так и отсутствие сенсора в клетке. Во-вторых, у авторов наблюдалось возникновение сигнала в фоновом режиме, даже без апоптоза (возможно, связанное с недостаточно эффективным сигналом внеядерной локализации). Кроме того, существенным недостатком является сильное запаздывание сигнала: время, которое требуется для активации транскрипции, накопления и созревания GFP, составляет около получаса (а то и более, поскольку в процессе апоптоза частично подавляются процессы транскрипции и трансляции), - за это время клетки могут уже погибнуть.

Другая группа ученых ранее тоже использовала принцип появления сигнала, однако решила сразу несколько вопросов, актуальных для указанной выше работы. Они разработали сенсор в виде химерного белка на основе флуоресцентного белка Venus и интеина. Для этого они циркулярно пермутировали Venus, сшив прежние N и C-концы линкером, содержащим DEVD, и добавив последовательность интеина для того, чтобы после расщепления каспазой-3 половинки Venus легче соединялись [Zhang et al., 2013]. До активации каспазы-3 конфигурация сенсора такова, что флуоресценция невозможна; сигнал возникает только при расщеплении линкера и конформационной перестройке белка. Детекция сигнала значительно ускоряется по сравнению с предыдущим описанным вариантом, поскольку в данном случае происходит лишь перестройка, а не синтез с нуля. Однако до развития апоптоза невозможно определить, находится ли сенсор в клетке или нет. Кроме того, данный метод не радиометричен – уровень сигнала зависит морфологии клетки, так что можно лишь отследить начало активности каспазы-3, но не кинетику.

Сходная работа была посвящена разработке сенсора, также состоящего из циркулярно пермутированного, но уже инфракрасного, а не желтого, флуоресцентного белка. Его исходные N и C-концы также соединены линкером, включающим каспазный сайт. Белок сконструирован таким образом, что в нерасщепленном состоянии хромофор не инкорпорирован в молекулу, поэтому нет сигнала флуоресценции. При активации каспазы и расщеплении сайта белок перестраивается и начинает флуоресцировать в инфракрасной области. В отличие от предыдущей работы, для того, чтобы сигнал о наличии сенсора можно было зарегистрировать до апоптоза, авторы сконструировали химеру из пермутированного инфракрасного белка со сплит-GFP, который активен в обоих состояниях сенсора [To et al., 2015] (см. рисунок 29).

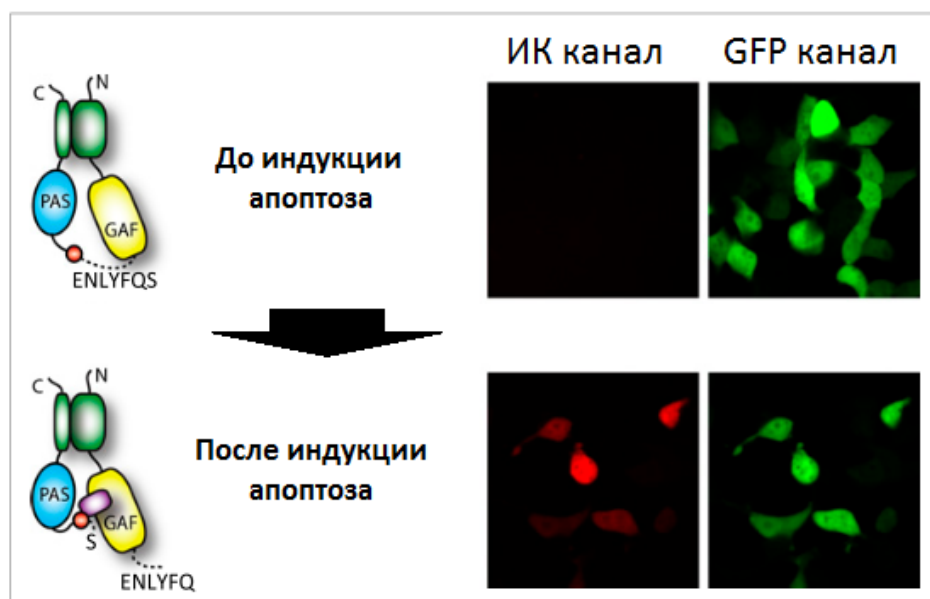


Рисунок 29 – Схема сенсора *iCasper*. Зеленые фрагменты - сплит-GFP; PAS/GAF домены - составные части инфракрасного флуоресцентного белка. Красным обозначен хромофор, встраивающийся в белок при разрезании протеазой линкера. Инфракрасный сигнал появляется только при активации клеточных протеаз. Зеленый сигнал активен как до, так и во время индукции апоптоза (по [To et al., 2015]).

С одной стороны, это решило проблему детекции сигнала сенсора до начала апоптоза, - но с другой, популярный канал зеленой флуоресценции таким образом оказался занят, что ограничило возможность одновременного наблюдения за несколькими процессами. Кроме того, используемый инфракрасный белок *iCasper* нуждается в кофакторе биливердине, который присутствует не во всех группах организмах (например, его сравнительно мало в дрозофилах и рыбах Данио, известных модельных организмах).

На основе вышеописанного сенсора год спустя та же группа ученых [To et al., 2016], чтобы не зависеть от наличия в клетке кофактора iCasper – биливердина, сделала сенсор, основанный на сплит-GFP с дополнительными спиральями. В отличие от предыдущей версии сенсора, новая светится и до разрезания каспазой линкера. При расщеплении ZipGFP перестраивается и разгорается в несколько раз по сравнению с первоначальным уровнем сигнала. Благодаря начальной фоновой флуоресценции нет необходимости встраивать второй белок для детекции наличия сенсора в клетке. Однако, свет в данной области спектра (зеленый) сильно рассеивается и лучше поглощается тканями млекопитающих, то есть не адаптирован для работы *in vivo* в данных организмах; кроме того, процесс перестройки происходит довольно медленно (около полутора часов).

Следующий пример – метод, основанный, наоборот, на потере сигнала GFP. Группа ученых создала химерный белок, имеющий вид: прокаспаза-3 – линкер – убиквитин – N-дегрон – GFP, при этом в состав линкеров входит сайт DEVD. При апоптозе и разрезании линкеров образуются активная каспаза-3 – и нестабильный белок, включающий репортер, который подвергается деградации. Одновременно за счет активации каспазы-3 достигается эффект положительной обратной связи [Xie et al., 2013]. С одной стороны, этот метод удобен тем, что сигнал присутствует с самого начала; с другой стороны, при некрозе сигнал EGFP также исчезнет, так что этот метод сложно использовать *in vivo*, особенно с быстродействующими лекарствами. Кроме того, дополнительно привнесенная в составе сенсора каспаза-3 может влиять на клеточные процессы (что не существенно, если цель – убить клетки, но нежелательно при изучении механизма апоптоза).

FRET-сенсоры каспазной активности

Одним из широко распространенных применений флуоресцентных белков является технология FRET (Förster Resonance Energy Transfer, уже упомянутая выше). Для эффективного протекания FRET между двумя флуорофорами необходимо соблюдение нескольких ключевых условий.

Во-первых, спектр эмиссии одного флуорофора (донора) должен существенно перекрываться со спектром поглощения другого (акцептора). При этом необходимо, чтобы спектр поглощения донора и акцептора существенно различались, чтобы не происходило одновременного возбуждения акцептора при возбуждении донора.

Во-вторых, молекулы донора и акцептора должны располагаться близко друг к другу (обычно не дальше 5–8 нм), т.к. эффективность FRET падает пропорционально шестой степени расстояния между флуорофорами. При этом должна быть корректная ориентация молекул (см. рисунок 30).

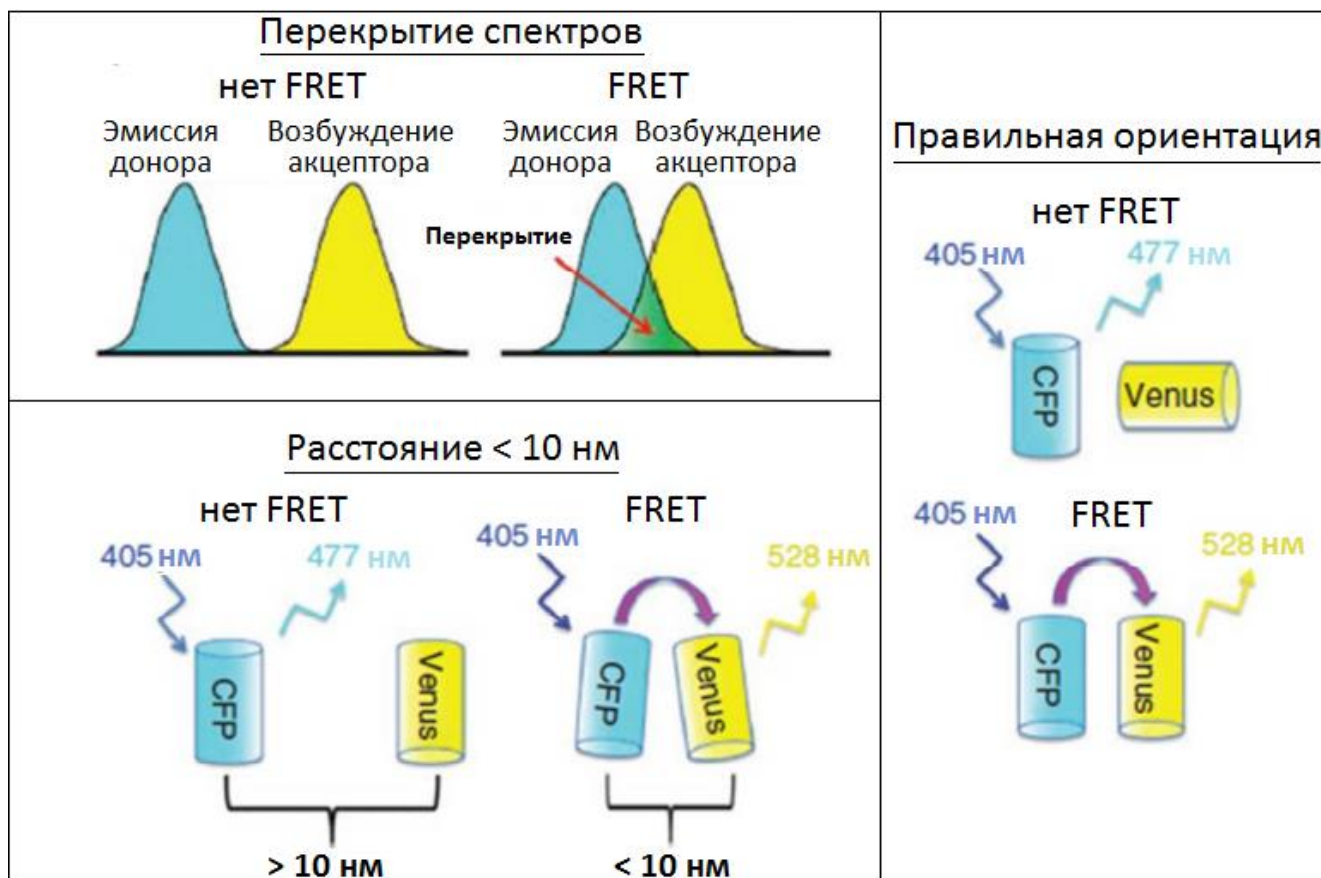


Рисунок 30 – Необходимые условия для возможности FRET на примере флуоресцентных белков CFP (циановый) и Venus (желтый) (по [Kochuveedu & Kim, 2014]).

В настоящее время существует несколько уже «устоявшихся» пар флуоресцентных белков, которые часто используют для этой технологии: BFP (синий) – GFP (зеленый), CFP (циановый) – YFP (желтый), GFP-TagRFP (красный) и т.д. Теоретически, для создания сенсора на каспазу достаточно соединить эти белки линкером, содержащим сайт разрезания каспазы. На практике, однако, не все сенсоры, построенные по данному типу, оказываются высокоэффективными.

Использование такого генетически кодируемого маркера возможно как на уровне органелл, так и целого организма. Оно удобно тем, что сигнал присутствует с самого начала исследования. Кроме того, использование FRET-пар делает метод детекции каспазы ратиометрическим: изменение сигнала донора нормируют на сигнал акцептора (при возбуждении в максимуме поглощения акцептора), таким образом, нивелируя эффект изменения локальной концентрации.

Помимо изменения интенсивности сигнала флуоресценции, для FRET-пар можно использовать эффект сокращения времени жизни флуоресценции донора в составе пары. Для измерения этого параметра используется технология FLIM (уже упомянута выше). При разрезании

каспазой химерного белка, соответственно, время жизни флуоресценции донора восстанавливается.

Целый ряд исследований основаны на подобных сенсорах. Однако, крайне важно, чтобы условия наблюдения не привносили в наблюдаемую систему искажения; в данном случае, чтобы облучение не травмировало клетки. Сенсоры, чьи доноры флуоресцируют в наиболее "синей" области спектра, например, сине-зеленый сенсор [Xu et al., 1998], нуждаются в возбуждении ультрафиолетовым светом, что токсично для клеток.

Аналогичная проблема, хоть и в меньшей степени, возникает для цианово-желтого сенсора (спектр поглощения акцептора, YFP, пересекается со спектром поглощения донора, CFP, в синей области спектра, фактически оставляя свободной для возбуждения только ультрафиолетовую). Однако некоторые исследователи используют именно такой вариант сенсора [Luo et al., 2001; Köhler et al., 2003; Tian et al., 2007; Angres et al., 2009]. В последней указанной статье для минимизации ущерба от возбуждающего света использовали технологию TIRFM (**T**otal **I**nternal **R**eflection **F**luorescence **M**icroscopy) и мембранно-связанный сенсор, при расщеплении которого его «желтая» часть оказывалась в цитоплазме, а на мембране оставался только циановый белок. Благодаря TIRFM облучается только часть клетки, непосредственно прилегающая к подложке/стеклу, кроме того, отношение сигнал-шум существенно возрастает. Однако такая технология не является широкодоступной, поэтому в общем случае для избегания фототоксичности необходимо использовать сенсоры в более красной области спектра.

Двигаясь в длинноволновую область спектра, необходимо упомянуть FRET-сенсоры, состоящие из цианового или зеленого и красного белков. Приведу несколько примеров:

- сенсор на основе CFP-DsRed (в приведенной в пример статье активность каспазы наблюдали с помощью капиллярного электрофореза, но это можно делать и на уровне интактной клетки с помощью флуоресцентного микроскопа [Sha et al., 2013]);
- сенсор на основе мономерного зеленого и димерного красного белка - EGFP и tHcred (использовали для методов FLIM и FCS - **F**luorescence **C**orrelation **S**pectroscopy [Keese et al., 2007] и [Keese et al., 2010]);
- сенсор CaspeR3 на основе мономерных зеленого и красного белков - TagGFP и TagRFP (см. рисунок 31; сенсор используется как для FRET, так и FLIM технологий [Shcherbo et al., 2009]).

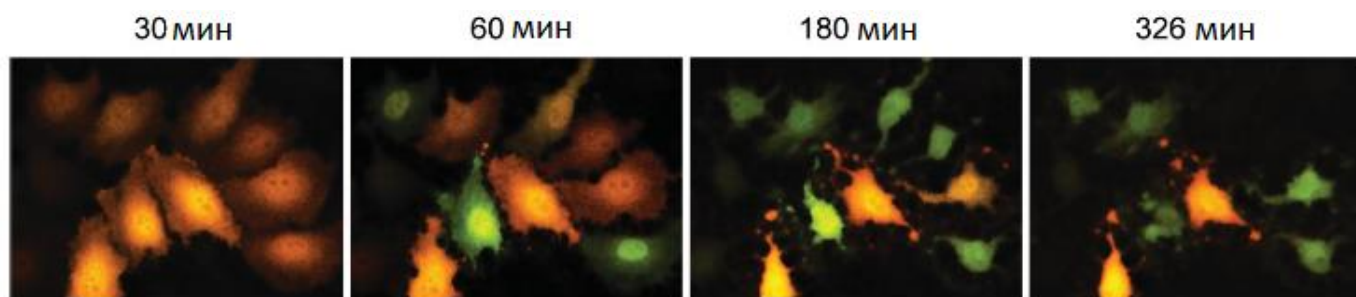


Рисунок 31 – Сенсор CaspeR3 *in vivo*: при развитии апоптоза линкер между зеленым и красным флуоресцентными белками разрезается каспазой-3, FRET прекращается, наблюдается возникновение клеток только с зеленой флуоресценцией при возбуждении синим светом (по [Shcherbo et al., 2009]).

Для возбуждения данных сенсоров можно использовать синюю область спектра, – менее токсичную для клеток, чем ультрафиолетовая; но тем не менее все еще довольно токсичную. Кроме того, они занимают сразу два самых часто используемых канала, что уменьшает возможность дополнительной визуализации процессов клеточной жизнедеятельности.

Ключевым моментом для исследования тканей *in vivo* является использование оранжево-дальнекрасного света (590-740 нм) для возбуждения, поскольку это наименее токсично для клеток. Кроме того, при этих длинах волн компоненты живых клеток обладают наименьшим поглощением, рассеянием и автофлуоресценцией [Weissleder & Ntziachristos, 2003]. Таким образом, использование флуоресцентных белков со спектром эмиссии в красной области позволяет увеличить доступную для детекции глубину в тканях для методов, основанных на флуоресценции [Li et al., 2006] с перспективой использования их на лабораторных животных. В тоже время, в культуре клеток эта система позволяет использовать другие каналы (синий/зеленый/желтый) для дополнительной визуализации других клеточных процессов. Это особенно важно в случае зеленого канала: существуют широкие панели клеточных белков, слитых именно с вариантами GFP, или сенсоров, несущих GFP в своем составе.

Наиболее близкие решению данных задач существующие сенсоры состоят из красных белков и в качестве донора, и в качестве акцептора. Например, каспазный сенсор на основе dKeima570 и тандема белков FP615 позволяет параллельно использовать сенсор на ионы кальция, состоящий из цианового и желтого белков [Miyamoto et al., 2015].

Другой сенсор был основан на еще более длинноволновых белках: донор - TagRFP (максимум возбуждения - 555 нм), акцептор - практически не флуоресцентный до фотоактивации зеленым светом белок KFP (kindling fluorescent protein). Акцептор такого типа был выбран для того, чтобы пересечение спектров флуоресценции не оказывало влияния на детекцию сигнала. Для детекции FRET использовали технологию FLIM, отслеживая изменение времени жизни флуоресценции донора TagRFP [Rusanov et al., 2010; Savitsky et al., 2012]. Этот сенсор отлично работает для технологии FLIM; однако в такой конфигурации метод не ратиометричен для обычной флуоресцентной микроскопии, поскольку отсутствует внутренний контроль, на который необходимо нормировать сигнал от донора.

Таким образом, актуальна разработка полностью генетически кодируемого FRET-сенсора в дальнекрасной области для детекции каспазы-3, с возможной детекцией сигнала как с помощью ратиометрической флуоресцентной микроскопии, так и технологии FLIM.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

В работе использовали следующие реактивы отечественного производства:

- деионизированная вода mQ,
- этиловый спирт, уксусная кислота, сульфат марганца, хлорид марганца, хлорид кальция, гидроксид натрия, глицерин, сахароза («Реахим»)
- ацетат натрия, хлорид калия, хлорид натрия, хлорид магния, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), додецилсульфат натрия (SDS) («Хеликон»)
- дельта-аминолевулиновая кислота («Вектон»)
- ампициллин, канамицин («Синтез»)
- цисплатин («Тева»)
- агароза («Хеликон»)
- среда DMEM, пенициллин-стрептомицин, раствор Версена, раствор трипсина 10%, фосфатно-солевой буфер в таблетках pH 7.4 («Панэко»)
- среда SOB («Диаэм»)
- маркер для электрофореза нуклеиновых кислот 1 Kb Ladder («СибЭнзим»).

В работе использовали следующие реактивы зарубежного производства:

- рамноза, арабиноза, 1,4-дигидроксиэтанол (ДГЭ), бромистый этидий («AppliChem»)
- бычий сывороточный альбумин («BioRad»)
- 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диол (Tris) («Amresco»)
- HEPES («Invitrogen»)
- CHAPS («Panreac»)
- бакто-агар, бакто-триптон, дрожжевой экстракт («Difco»)
- эмбриональная сыворотка теленка («HyClone»)
- стауроспорин («Enzo»)
- среда OptiMEM («Gibco»)
- среда IMEM, имидазол («Sigma»)
- трансфицирующий агент FuGene 6 («Roche»)
- смола TALON («Clontech»)

Использовали также следующие ферменты, соответствующие буферы и компоненты:

- ДНК-полимераза Tersus, буфер Tersus и 2'-дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфаты; ДНК-лигаза фага T4 с соответствующим буфером («Евроген»)
- эндонуклеазы рестрикции и соответствующие буферы, РНК-аза А («СибЭнзим»)
- каспаза-3 (Abcam)

Также использовали наборы реактивов:

- наборы для очистки ДНК на колонках («Qiagen», «Евроген»).

В работе были использованы следующие плазмиды:

- iRFP-pBAD, pwa23-НО (предоставлены д.б.н Верхушей В.В.)
- pLVT1 (pRRLSIN.EF1.WPRE), R8.91, pM.DG (предоставлены Didier Trono)
- EGFP-bax, N (предоставлена к.б.н. Богдановым А.М.)
- KillerOrange, pQE-30; SuperNova, pQE-30; SuperNova2, pQE-30 (предоставлены к.б.н Саркияном К.С.)
- pKillerRed-mem, pKillerRed-dMito, mKate2-N, TurboFP650-N, NirFP-N, TagBFP-N (Евроген, Россия)
- pQE-30 (Qiagen, Германия)
- C1 (Clontech, США).

В работе были использованы следующие олигонуклеотиды («Евроген»):

BamH1-mKate2-F	TTTGGATCCATGGTGAGCGAGCTGATTAAGG
Sac1-mKate2-R	TTTGAGCTCTCTGTGCCCCAGTTTGCTAGG
BamH1-NiRFP-F	TTTGGATCCATGGGAGAGGATAGCGAGCTGATC
Sac1-NiRFP-R	TTTGAGCTCGCTGTGCCCCAGTTTGCTAGG
BamH1-FP650-F	TTTGGATCCATGGGAGAGGATAGCGAGCTGATC
Sac1-FP650-R	TTTGAGCTCGCTGTGCCCCAGTTTGCTAGG
Kpn1-casp-F1	TTTGGTACCGAATTCGGTGGTTCTGGTTCTGATGAAG TTGATAAGCTTGGTGGTTCTGGTTC
Kpn1-caspmut-F1	TTTGGTACCGAATTCGGTGGTTCTGGTTCTGATGAAG TTGGTAAGCTTGGTGGTTCTGGTTC
casp-iRFP-F2	GTTGATAAGCTTGGTGGTTCTGGTTCTATGGCTAGCA TGACTGGTGGAC
Sal1-iRFP-R	TTTGTCGACTCACTCTCCATCACGCCGATC
Nde1-Histag-F	TTTCATATGATGAGAGGATCGCATCACCATCAC

Sal1-iRFP-R	TTTGTCGACTCACTCTTCCATCACGCCGATC
BamH1-UniDonor-F	CACCATCACCATCACGGATCCATG
Nde1-mKate2-R	TTTCATATGTCATCTGTGCCCCAGTTTGCTAGG
Nde1-FP650-R	TTTCATATGTCAGCTGTGCCCCAGTTTGCTAGG
Age1-caspsens-F	TTTACCGGTATGAGAGGATCGCATCACCATCAC
Not1-caspsens-R	TTTGCGGCCGCTAATTAAGCTTGGCTGCAGGTCGAC
Age1-mem-SuperNova-F	TTTACCGGTGCCACCATGCTGTGCTGTATGAGAAGA ACCAAACAGGTTGAAAAGAATGATGAGGACCAAAA GATC TCAGAGGTCGGCCCCG
Not1-SuperNova- R	TTTGCGGCCGCTTAATCCTCGTCGCTACCGATG
Age1-mem-KillerOrange-F	TTTACCGGTGCCACCATGCTGTGCTGTATGAGAAGA ACCAAACAGGTTGAAAAGAATGATGAGGACCAAAA GATCTCCGAGTGCGGCCCC
Not1-KillerOrange-R	TTTGCGGCCGC TCAATCCTGGTCGCTACCGATG
Age1-SuperNova-F	TTTACCGGTCGCCACCTCAGAGGTCGGCCCCG
Age1-KillerOrange-F	TTTACCGGTCGCCACCTCCGAGTGCGGCCCC

2.2 Методы

2.2.1 Получение генетических конструкций

2.2.1.1 ПЦР-амплификация

Амплификации проводили на приборе PTC-100 Thermal Cycler (MJ Reserch, Германия). Каждая реакционная проба содержала праймеры (0.2 мкМ, кроме отдельно обговоренных случаев), эквимольную смесь dNTP (0,5 мкМ), матричную ДНК (10-100 нг), Tersus полимеразу и буфер (Евроген). Для доведения смеси до нужного объема использовали стерильную деионизованную воду. Использовали следующий режим амплификации: денатурация 95°C - 20 сек, отжиг 65°C – 20 сек, элонгация 72°C - 1 мин, - 25 циклов ПЦР; дополнительная элонгация - 72°C - 2 мин.

Создание сенсоров на активность каспазы-3:

Для создания конструкций mKate2-casp-iRFP, FP650-casp-iRFP, NiRFP-casp-iRFP в pQE-30 (casp – линкер EFGGSGSDEVDKLGSGSGT из плазмиды Casper BG (Евроген), содержащий узнаваемую каспазой-3 последовательность), вставку, кодирующую белок-донор, амплифицировали с соответствующих праймеров (mKate2 – с BamH1-mKate2-F и Sac1-mKate2-R; FP650 – с BamH1-FP650-F и Sac1-FP650-R; NiRFP – с BamH1-NiRFP-F и Sac1-NiRFP-R).

Полученные фрагменты клонировали в вектор pQE-30 по сайтам BamH1 и Sac1.

После проверки полученных конструкций с помощью секвенирования («Евроген») в полученные векторы по сайтам Kpn1 и Sal1 клонировали амплифицированную последовательность гена, кодирующего акцепторный белок iRFP, вместе с линкером для каспазы (праймеры Kpn1-casp-F1 (0.2 мкМ) и casp-iRFP-F2 (0.02 мкМ) в соотношении 10:1 + праймер Sal1-iRFP-R, по количеству соответствующий праймеру Kpn1-casp-F1).

Для переноса конструкций mKate2-casp-iRFP, FP650-casp-iRFP, NiRFP-casp-iRFP в лентивирусный вектор вставки амплифицировали, используя праймеры Nde1-Histag-F и Sal1-iRFP-R, и клонировали амплифицированные последовательности в вектор pLVT по сайтам NdeI и SalI. Конструкции, кодирующие белки-доноры, амплифицировали с праймеров BamH1-UniDonor-F и Nde1-mKate2-R (для mKate2) и BamH1-UniDonor-F и Nde1-FP650-R (для eqFP650) и также клонировали в вектор pLVT по соответствующим сайтам.

Создание плазмид для временной экспрессии сенсоров в клетках млекопитающих включало амплификацию последовательностей сенсоров с помощью праймеров Age1-caspsens-F и Not1-caspsens-R; и клонирование в вектор TagBFP-N по сайтам AgeI и NotI вместо TagBFP.

Схемы кодирующей части генетических конструкций приведены в Приложении.

Получение KillerOrange, SuperNova, SuperNova-2 в мембранной и митохондриальной локализациях

Для создания мембранного варианта KillerOrange, SuperNova и SuperNova2 амплифицировали соответствующие фрагменты с праймеров, содержащие рестриктные сайты AgeI и сигнал мембранной локализации (Age1-mem-KillerOrange-F или Age1-mem-SuperNova-F), и клонировали по данным сайтам в вектор KillerRed-mem вместо KillerRed-mem.

Для создания митохондриального варианта KillerOrange, SuperNova и SuperNova2 амплифицировали соответствующие фрагменты с праймеров, содержащие рестриктные сайты AgeI (Age1-KillerOrange-F или Age1-SuperNova-F) и клонировали по данным сайтам в вектор KillerRed-mito вместо KillerRed.

Схемы кодирующей части генетических конструкций приведены в Приложении.

2.2.1.2 Рестрикция

Рестрикцию фрагментов ДНК проводили с использованием реактивов компании «СибЭнзим». Конечный объём рестрикционной смеси составлял 50 мкл, количество ДНК в реакции - 2 мкг вектора (концентрацию ДНК определяли на спектрофотометре Varian Cary100Bio, OD260) или весь полученный продукт вставки. Реакцию проводили при 37°C в течение 1,5 ч. Результаты рестрикции анализировали и очищали с помощью электрофореза в агарозном геле.

2.2.1.3 Электрофорез ДНК в агарозном геле

Электрофорез ДНК проводили в 1,5% агарозном геле в TAE - буфере (TAE 50x: 2М Трис-ацетат, 0.1М ЭДТА) с добавлением бромистого этидия до концентрации 0,5 мкг/мл при 10 В/см в течение 0,5 часов. Размер фрагмента определяли с помощью ДНК-маркёра («СибЭнзим»): 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000 и 10000 п. о.

2.2.1.4 Экстракция ДНК из агарозного геля после электрофоретического разделения

Экстракцию ДНК из агарозного геля после электрофоретического разделения проводили с помощью коммерческого набора Cleanup Standard («Евроген») согласно инструкции производителя.

2.2.1.5 Лигирование

Лигирование осуществляли с использованием ДНК-лигазы фага T4 и соответствующего буфера («Евроген») согласно протоколу производителя. Объем реакционной смеси составил 15 мкл, молярное соотношение вектора к вставке в реакционной смеси составляло 1:3. Реакцию проводили при 14°C в течение 9 - 16 ч.

2.2.1.6 Химическая трансформация клеток E. coli

Для проведения трансформации E. coli штамма XL1-blue химическим методом брали аликвоту компетентных клеток («Евроген») и размораживали на льду (около 10 мин). К аликвоте компетентных клеток добавляли 7,5 мкл охлажденной на льду соответствующей лигазной смеси. Смесь клеток и ДНК инкубировали на льду в течение 30 минут. Затем проводили тепловой шок в течение 60 сек при 42°C, после чего сразу же помещали пробирку с клетками в лёд, добавляли к клеточной суспензии 300 мкл среды SOB и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Суспензию клеток высевали с помощью стерильного шпателя на чашку со средой LB-агар, в которую предварительно был добавлен соответствующий антибиотик (ампициллин или канамицин, в зависимости от вектора) в концентрации 100 мкг/мл. Колонии бактерий выращивали в термостатируемом шкафу при 37°C в течение 14-18 часов.

2.2.1.7 Анализ полученных после трансформации колоний методом ПЦР (ПЦР-скрининг)

Колонии, выросшие на чашке с LB-агаром, анализировали на наличие правильной вставки методом ПЦР-скрининга с использованием реактива ScreenMix («Евроген») согласно протоколу производителя. Для проведения реакции готовили смесь, включающую один праймер, специфичный к последовательности вставки, а другой – к последовательности вектора. В качестве матриц использовали бактериальные колонии, которые вносили в соответствующие лунки с ПЦР-смесью с помощью зубочисток. Кроме того, обязательно присутствовала отрицательная контрольная проба, в неё вносили зубочистку, которой касались поверхности LB-агара без колоний. Параметры температурных циклов ПЦР-скрининга имели те же значения, что для ПЦР вставок. Результаты ПЦР-скрининга анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле.

2.2.1.8 Приготовление ночных культур трансформированных *E. coli* (miniprep)

Несколько случайно выбранных бактериальных колоний, оказавшихся положительными по результатам ПЦР-скрининга, использовали для приготовления ночных культур. Для этого в стерильную пробирку для культивации бактерий помещали 4-5 мл среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина или канамицина (в зависимости от вектора). Далее стерильным носиком скалывали положительную колонию с чашки и помещали в пробирку со средой. Ночную культуру при покачивании при помощи орбитального шейкера (Excella25, New Brunswick Scientific) инкубировали при 37°C и 200 об./мин в течение 17-19 часов.

2.2.1.9 Выделение плазмидной ДНК из клеток *E. coli* для секвенирования (miniprep)

Выделение плазмидной ДНК проводили из 4-5 мл ночной культуры бактерий (miniprep). Для этого осаждали клетки в микроцентрифужной пробирке объёмом 2 мл в режиме 8 тыс. об./мин. в течение 4 мин (Eppendorf miniSpin). От супернатанта тщательно избавлялись, а осадок интенсивно ресуспендировали в 250 мкл Раствора 1 (1-кратный PBS pH 7.4 с добавлением РНКазы А, 0,5 мг/мл). К суспензии добавляли 250 мкл Раствора 2 (1% SDS, 0,2М NaOH), осторожно перемешивали, несколько раз переворачивая пробирку до тех пор, пока содержимое пробирки не становилось гомогенной полупрозрачной жидкостью вязкой консистенции; эта процедура занимала не более 5 минут. После этого добавляли к смеси 350 мкл Раствора 3 (3М ацетат калия, 5М по ацетату) и осторожно перемешивали переворачиванием до образования творожистой хлопьевидной взвеси. Далее пробу центрифугировали 10 мин при 13 тыс. об./мин (Eppendorf miniSpin), супернатант осторожно переносили в новую пробирку объёмом 1,5 мл, избегая попадания не осевших частиц взвеси в наконечник пипетки. К супернатанту добавляли 700 мкл изопропанола и интенсивно перемешивали. После этого вновь центрифугировали раствор при 13 тыс. об./мин в течение 10 мин, супернатант тщательно удаляли. Затем к осадку осторожно добавляли 0,5 мл 80%-ного этанола, центрифугировали раствор при 13 тыс. об./мин в течение 4 мин, супернатант тщательно удаляли. От остатков спирта избавлялись, высушивая содержимое пробирки при 42°C в течение 7 мин. После этого добавляли к осадку 50 мкл деионизированной воды, инкубировали 10 мин при 42°C и тщательно перемешивали. Количество плазмидной ДНК оценивали с помощью спектрофотометра Varian Cary100Bio, OD260. Для секвенирования отбирали 3 мкг полученного раствора ДНК и разводили в 10 раз mQ.

2.2.1.10 Выделение плазмидной ДНК для временной трансфекции

Выделение плазмидной ДНК проводилось с использованием коммерческого набора Plasmid Miniprep (Евроген) согласно инструкции производителя, со стадией дополнительной очистки ДНК от эндотоксинов.

2.2.1.11 Выделение плазмидной ДНК из клеток E. coli (maxiprep) для трансфекции эукариотических клеток с целью наработать вирус

Выделение плазмидной ДНК для трансфекции осуществляли из 100 мл ночной культуры с помощью коммерческого набора «Plasmid Midi Kit» (Qiagen) согласно протоколу производителя.

2.2.2 Работа по выделению белка

2.2.2.1 Приготовление электрокомпетентных клеток штамма E.coli BW25113

Замороженный глицериновый сток E.coli BW25113 высевали стерильным шпателем на чашку Петри с LB-агаром до получения одиночных колоний. Чашку растили при 37°C в течение 12-15 часов в термостатируемом шкафу. Затем колонии, соответствующие штамму по форме, отбирали стерильным носом и помещали в пробирку с 4-5 мл стерильной среды SOB. Клетки подращивали при помощи орбитального шейкера (Excella25, New Brunswick Scientific) при 37°C и 200 об./мин до оптической плотности 0.6 О.Е. (определяли на спектрофотометре Varian Cary100Bio, OD600). Затем добавляли подращенную культуру в колбу с 800 мл SOB, которую инкубировали при тех же условиях и доводили до плотности 2-3 О.Е.

Полученную суспензию клеток охлаждали на ледяной бане, переносили в стерильные фальконы объемом 50 мл и подвергали центрифугированию при 3600 об/мин, 4°C, 25 мин (Multifuge 3S-R, Thermo Scientific Heraeus). Все последующие центрифугирования проводили при тех же параметрах, кроме последнего. После центрифугирования супернатант сливали, а пробирки охлаждали на льду. Осадок клеток промывали последовательно: три раза 50 мл mQ, затем один раз 20 мл 20%-ного глицерина. Осадок, полученный после последней промывки, ресуспендировали в 5 мл стерильного 10%-ного глицерина и аликвотировали по 40 мкл в пробирки 1.5 мл, которые замораживали с помощью жидкого азота и переносили к кельвинатор для хранения (-73°C).

Аналогичным образом готовили электрокомпетентные клетки из клеток этого же штамма, трансформированных плазмидой pwa23-НО (кодирующей гем-оксигеназу).

2.2.2.2 Электропорация бактериальных клеток

Для электропорации аликвоту электрокомпетентных клеток размораживали на льду (около 10 мин). К ней добавляли 3 мкл охлажденной на льду соответствующей лигазной смеси, очищенной от солей, или вектора (0.1 мкг). Смесь клеток и ДНК инкубировали на льду в течение 30 минут. Суспензию переносили использовали в кюветы для электропорации с зазором 0,1 см (Eppendorf) и подвергали электропорации при напряжении 1,8 КВ (Eppendorf Multiporator). После электропорации в кювету сразу же добавляли 1 мл среды LB, всю смесь переносили в пробирку и инкубировали 30 мин при 37°C, а затем рассеивали на чашки с селективной средой.

2.2.2.3 Бактериальная экспрессия сенсоров на активность каспазы-3

Для бактериальной экспрессии был использован штамм E.coli BW25113, коэкспрессирующий одну из экспрессионных плазмид mKate2-casp-iRFP, FP650-casp-iRFP, NiRFP-casp-iRFP и плазмиду pwa23-НО (кодирующую гем-оксигеназу).

Трансформированные согласно протоколу для электрокомпетентных клеток бактерии E.coli BW25113 высевали на чашки Петри, содержащие питательную среду LB-агар с арабинозой (150 мг/мл), рамнозой (0,0024% по массе), канамицином (0,1 мг/мл), ампициллином (0,5 мг/мл) и предшественником гема - δ -аминолевулиновой кислотой (0,2 мМ). Чашки с трансформантами инкубировали при 37°C в течение 16 ч, затем при 4°C в течение 24 часов.

2.2.2.4 Выделение белка на смоле TALON

Белок выделяли из биомассы бактерий, собранных с 5 чашек Петри с помощью PBS (pH 7.4) и стерильного шпателя. Бактерии лизировали в объеме 13-15 мл с помощью дезинтегратора Sonics VibraCell (Sonics and Materials inc., США), диаметр зонда 13 мм, амплитуда 60 мкМ, режим 2 секунды импульс (30% амплитуда) – 3 секунды пауза, в течение 5 минут. Для предотвращения нагревания емкость находилась в ледяной бане. После разрушения смесь центрифугировали при 13400 g (Eppendorf Centrifuge 5415R) 30 минут с охлаждением 4°C. Надосадочная жидкость содержала растворимую фракцию целевого белка. Белок из надосадочной жидкости очищали с помощью TALON His Tag Purification Resin (Clontech, США), по стандартному протоколу производителя с элюцией в PBS-имидазоле (0,25M).

2.2.2.5 Обработка выделенных белков (сенсоров) каспазой-3.

Для анализа изменения FRET при расщеплении сенсора каспазой-3 использовали буфер: 50 мМ HEPES буфер (pH 7.5), 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 10% сахарозу (масса/объем), 0,1% CHAPS, 10 мМ ДТТ. К смеси белка в PBS-имидазоле и буфера добавляли каспазу-3 (1 ед.) согласно протоколу производителя (Abscam), и инкубировали 1 час при 37°C.

2.2.2.6 Измерение спектральных характеристик биосенсоров mKate2-casp-iRFP, FP650-casp-iRFP, NiRFP-casp-iRFP

Биосенсоры mKate2-casp-iRFP, FP650-casp-iRFP и NiRFP-casp-iRFP были выделены из бактерий, как описано ранее, и протестированы на применимость для детекции активности каспазы-3. Для этого в спектрофотометрическую кювету (Agilent) вносили выделенный белок в PBS-имидазоле. Количество белка в различных пробах отличалось, поскольку спектральные характеристики сенсора (в частности, наличие или отсутствие FRET) не должны зависеть от его концентрации. Далее снимали спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции на приборе Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer (Agilent). Для mKate2-casp-iRFP: спектр возбуждения при эмиссии 740 нм, спектры эмиссии флуоресценции при 550 нм и 650 нм. Для FP650-casp-iRFP: спектр возбуждения при эмиссии 740 нм, спектры эмиссии флуоресценции при 580 нм и 670 нм. Для NiRFP-casp-iRFP: спектр возбуждения при эмиссии 740 нм, спектры эмиссии флуоресценции при 590 нм и 670 нм.

После обработки сенсоров каспазой-3 (см. ранее) повторно снимали соответствующие спектры.

2.2.3 Работа с клеточными культурами

2.2.3.1 Клеточные линии и условия культивирования

Клетки аденокарциномы шейки матки человека HeLa (изолят Kyoto), клетки эмбриональной почки человека HEK293, HEK293T (с добавленным T-антигеном) или клетки рака кишки мыши CT26 (mouse colon 26) культивировали в среде DMEM с глутамином (Панэко) с добавлением 10% фетальной сыворотки теленка (HyClone) и 10 Ед/мл пенициллина, 10 мкг/мл стрептомицина (Панэко). Клетки культивировали при +37°C в атмосфере с 5% CO₂.

2.2.3.2 Временная трансфекция эукариотических клеток

Для временной трансфекции использовали реагент FuGene 6 (Roche, Швейцария) в соответствии с протоколом производителя. Клетки рассаживали на чашки с тонким стеклянным дном FluoroDish (WPI, США) в количестве 5×10^4 кл/чашку за 24 часа до трансфекции и культивировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в среде DMEM с 10% фетальной сыворотки телёнка, 4 мМ L-глутамин, 10 Ед/мл пенициллина, 10 мкг/мл стрептомицина в течение одного дня.

Трансфекционный комплекс формировали в среде OptiMEM (Gibco). Сначала в 100 мкл среды растворяли 9 мкл трансфекционного реагента FuGene 6 (Roche) и инкубировали раствор в течение 5 минут. Затем добавляли плазмидную ДНК, в суммарном количестве 3 мкг, и инкубировали смесь в течение 15 мин. Затем на чашку с клетками по каплям добавляли трансфекционный комплекс и инкубировали 24 часа. По прошествии 24 часов среду заменяли на свежую. К микроскопии приступали через 48 часов после трансфекции.

2.2.3.3 Лентивирусная трансдукция эукариотических клеток

Клетки упаковочной линии линии НЕК 293Т за сутки до трансфекции рассаживали в количестве $1,5 \times 10^6$ клеток на чашку диаметром 60 мм (подсчёт клеток производили в камере Горяева).

Через сутки клетки НЕК 293Т трансфицировали смесью транспортной (несущей соответствующий трансген) и двух вспомогательных плазмид рMDG и рR8.91 в соотношении 2,5 : 0,6 : 2, соответственно. Для трансфекции использовали кальций-фосфатный протокол. На одну чашку диаметром 60 мм использовали суммарно 10 мкг плазмидной ДНК. В стерильную пробирку «А» вносили 150 мкл 2-кратного буфера HBS (Hepes Buffered Saline), в пробирку «Б» помещали раствор ДНК, 18 мкл 2М раствора хлорида кальция CaCl₂ и доводили объём смеси до 150 мкл стерильной водой (все компоненты – «Invitrogen»). Затем содержимое пробирки «Б» очень медленно, в течение 1-2 минут, переносили в пробирку «А», создавая при этом в ней пузыри пастеровской пипеткой. После этого инкубировали полученный раствор в течение 30 минут при комнатной температуре и раскапывали его по поверхности чашки с клетками линии НЕК 293Т. Трансфекционный комплекс инкубировали с клетками в течение 6 часов при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Затем среду заменяли на свежую DMEM (с 10% фетальной телячьей сыворотки, 4 мМ L-глутамин, 10 Ед/мл пенициллина, 10 мкг/мл стрептомицина) и инкубировали клетки ещё 48 ч при тех же условиях.

Далее среду собирали и фильтровали через стерильный одноразовый фильтр с размером пор 0,45 мкм. Затем препарат вирусных частиц концентрировали центрифугированием в течение 2 мин

часов при 4°C и 600 об./мин (Beckman J2-21, ротор JA-20) в концентраторе Pierce Concentrators («Thermo Scientific»), оставляя в пробирке ~500 мкл жидкости. Полученный препарат вирусных частиц измеряли на титр, а остатки до дальнейшего использования переносили в криопробирки объемом 2 мл и замораживали при -70°C. Титр вируса определяли при помощи контрольной трансдукции, для чего на чашки в день трансдукции сажали 1×10^5 клеток HeLa Kyoto и добавляли к ним 100 мкл препарата вирусных частиц. Титр вируса определяли через 2 дня как количество клеток на чашке, умноженное на процент клеток, экспрессирующих необходимый ген, деленное на объем добавленного супернатанта в миллилитрах.

2.2.3.4 Флуоресцентно-микроскопический анализ

Для флуоресцентно-микроскопического анализа клетки эукариот, временно или постоянно экспрессирующие различные гибридные гены флуоресцентных белков, растили на чашках диаметром 35 мм с тонким стеклянным дном (0,17 мм, FluoroDish, WPI) в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в среде DMEM с 10% фетальной сыворотки теленка, 4 мМ L-глутамин, 10 Ед/мл пенициллина, 10 мкг/мл стрептомицина. Клетки анализировали в среде IMEM (Sigma) с содержанием 10% фетальной сыворотки теленка и 20 мМ HEPES.

Флуоресцентно-микроскопический анализ проводили с помощью системы Leica AF6000LX на базе инвертированного микроскопа Leica DMI 6000 B, оснащенного камерой Photometrics CoolSNAP HQ CCD. В качестве источника света использовали дуговую лампу 120W HXP (Osram, Германия). Для регистрации синей флуоресценции использовали фильтр S Blue (D 395-415+LP 425); для зеленой – GFP (BP 450-490+LP 515); для регистрации красной флуоресценции использовали фильтр TX2 (BP 560/40+BP 645/75), для инфракрасной – Y5 (BP 620/60+BP 700/75). Для длительных экспериментов, в частности, индукции апоптоза, использовали термостатированную камеру (37 °C). Анализ изображений проводили с помощью пакета приложений Leica LAS AF.

2.2.3.5 Индукция апоптоза

Для индукции апоптоза клетки эукариот, временно или постоянно экспрессирующие различные гибридные гены флуоресцентных белков (в том числе ген сенсора на активность каспазы-3), растили на чашках диаметром 35 мм с тонким стеклянным дном (0,17 мм, FluoroDish, WPI) в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в среде DMEM с 10% фетальной сыворотки теленка, 4 мМ L-глутамин, 10 Ед/мл пенициллина, 10 мкг/мл стрептомицина. Клетки помещали в 1 мл среды IMEM (Sigma) с содержанием 10% фетальной сыворотки теленка и 20 мМ HEPES и инкубировали полчаса в термостатируемой камере флуоресцентного микроскопа (37°C) для уравнивания температуры.

При индукции апоптоза стауроспорином:

После уравнивания температуры осторожно отбирали 300 мкл среды, добавляли в пробирку с 10 мкл раствора стауроспорина в DMSO (итоговая концентрация стауроспорина в среде с клетками – 5 мкг/мл), перемешивали и по каплям аккуратно раскапывали обратно на чашку. Сразу же начинали вести съемку с частотой один раз в 5 минут – до момента гибели большинства клеток (в среднем 4-8 часов).

При индукции апоптоза цисплатином:

Цисплатин «Тева» доводили до раствора 1мМ (50 мкл цисплатина смешивали с 35 мкл ИМЕМ). Затем осторожно отбирали 300 мкл среды из чашки Петри, добавляли в пробирку с 2 мкл раствора цисплатина (итоговая концентрация цисплатина в среде – 2.2 мкМ) перемешивали и по каплям аккуратно раскапывали обратно на чашку. Сразу же начинали вести съемку с частотой один раз в 5 минут – до момента гибели большинства клеток (в среднем 2-5 часов).

2.2.3.6 Стерильная проточная сортировка клеток

Для стерильной сортировки 2×10^6 клеток открепляли от чашек раствором Версена с добавлением 0,25% трипсина («Панэко»), после центрифугирования (900 об./мин, Multi centrifuge CM6M) и удаления супернатанта клетки ресуспендировали в PBS (pH 7.4) с 10% фетальной сывороткой до плотности 5×10^5 клеток/мл. Суспензию клеток пропускали через нейлоновый фильтр с диаметром ячейки 70 мкм.

Для проточно-цитофлуориметрической сортировки клеток использовали проточный сортер FACS Vantage SE DIVA, оснащенный аргоновыми лазерами с воздушным охлаждением и длиной волны 405 и 488 нм (Beckman-Coulter, США). Для детекции использовали фильтр PE-Cy5 (640-680). Диаметр сопла – 70 микрон. Средняя скорость потока составила примерно 2000 событий/секунду. Из каждого образца собирали как минимум 30'000 событий в 1,5 мл пробирку с 300 мкл фетальной телячьей сыворотки (РАА). После сортировки клетки каждого препарата высевали в лунку 6-луночного планшета в 5 мл среды DMEM с 10% фетальной сыворотки телёнка, 4 мМ L-глутамин, 10 Ед/мл пенициллина, 10 мкг/мл стрептомицина.

Дальнейшее культивирование проводили в соответствии с оптимальными для данной клеточной линии условиями.

2.2.3.7 Облучение клеточных линий, стабильно экспрессирующих KillerRed, SuperNova, Supernova-2, KillerOrange, набором сверхъярких диодов

Для возбуждения флуоресцентного белка KillerOrange использовали облучение с помощью набора сверхъярких диодов с длиной волны 470 нм (спектральная полуширина – 20 нм; 7 Luxeon Star LXML-PB01-0040 Rebel LED, Lumileds), плотность мощности излучения 60 мВт/см², и набора сверхъярких диодов с длиной волны 590 нм (спектральная полуширина – 20 нм; 7 Luxeon Star 7 LXML-PL01-0040 Rebel LED, Lumileds), плотность мощности излучения 20 мВт/см².

Для возбуждения флуоресцентных белков KillerRed/SuperNova/SuperNova-2 использовали облучение с помощью набора сверхъярких диодов с длиной волны 590 нм (спектральная полуширина – 20 нм; 7 Luxeon Star 7 LXML-PL01-0040 Rebel LED, Lumileds), плотность мощности излучения 20 мВт/см². Облучение осуществляли в акриловых прозрачных акриловых кюветках (Sarstedt) через чашечку Петри, заполненную водой для уменьшения нагревания кюветы.

Изучение фототоксичности KillerOrange:

Клетки линии HEK293, временно экспрессирующие гены флуоресцентных белков (KillerOrange, KillerRed или EGFP) открепляли от культивационной чашки с помощью обработки раствором Версена с добавлением 0,25% трипсина («Панэко»). Для удаления трипсина суспензии клеток (10⁵ клеток) центрифугировали 6 минут при 900 об./мин (Multi centrifuge CM6M), супернатант отбирали и ресуспендировали клетки в 300 мкл раствора PBS. Для KillerRed, KillerOrange и EGFP суспензии объединяли, перемешивали пипетированием и разносили по 3 кюветкам (Sarstedt) по 200 мкл и пробирку 1.5 мл (примерно 300 мкл). Кюветы облучали набором сверхъярких диодов в течение 30, 60 и 90 минут, унося по одной и отбирая по 180 мкл суспензии через заданные промежутки. Отобранные аликвоты высевали на чашку Петри в стандартные условия культивации. Контрольная пробирка с теми же клеточными линиями находилась в темноте при тех же условиях до завершения облучения. После этого 180 мкл суспензии контрольных клеток также рассеивали на чашку Петри. На следующий день среду заменяли на свежую, а через 24 часа анализировали результат облучения с помощью проточной цитофлуориметрии.

Изучение фототоксичности SuperNova2:

Клетки линии HEK293T, временно экспрессирующие гены флуоресцентных белков (mKate2, KillerRed, EGFP, SuperNova или SuperNova2) открепляли от культивационной чашки с помощью обработки раствором Версена с добавлением 0,25% трипсина («Панэко»). Для удаления

трипсина суспензию клеток с фототоксичным белком (10^5 клеток) центрифугировали 6 минут при 900 об./мин (Multi centrifuge CM6M), супернатант отбирали и ресуспендировали клетки в 400 мкл раствора PBS. Суспензию разделяли на кювету (300 мкл) и пробирку 1.5 мл (оставшиеся примерно 100 мкл). Кювету облучали набором сверхъярких диодов в течение 30, 60 и 90 минут, отбирая по 80 мкл суспензии через заданные промежутки. Отобранные аликвоты высевали на чашку Петри в стандартные условия культивации. Контрольная пробирка с теми же клеточными линиями находилась в темноте при тех же условиях до завершения облучения. После окончания облучения 80 мкл суспензии контрольных клеток также рассеивали на чашку Петри. На следующий день во всех чашках среду заменяли на свежую и к клеткам подсеивали равное количество контрольных клеток, экспрессирующих EGFP. Через 24 часа анализировали результат облучения с помощью проточной цитофлуориметрии.

2.2.3.8 Проточная цитофлуориметрия

Клетки линий НЕК293 или НЕК293Т через 48 часов после облучения набором сверхъярких диодов открепляли от чашек с помощью обработки раствором Версена с добавлением 0,25% трипсина. Для удаления трипсина суспензию клеток, а также среду, в которой они культивировались, центрифугировали при 900 об./мин (Multi centrifuge CM6M) в течение 6 мин, супернатант отбирали и ресуспендировали клетки в 1 мл раствора PBS.

Для проточно-цитоплуориметрического анализа эксперимента с KillerOrange использовали цитометр Cytomics FC500, оснащенный аргоновым лазером мощностью 20 мВт с воздушным охлаждением и длиной волны 488 нм (Beckman-Coulter, США). Для детекции флуоресценции KillerRed использовали следующие параметры: мощность лазера 6 мВт, фильтр 610 нм (канал FL3). Для детекции флуоресценции EGFP и KillerOrange - фильтр 525 нм (канал FL1). Для каждого образца детектировали как минимум 30000 событий.

Для проточно-цитоплуориметрического анализа эксперимента с SuperNova-2 использовали цитометр BD FACS Aria III (BD Biosciences-US, США). Для детекции флуоресценции белков семейства KillerRed использовали следующие параметры: лазер 561 нм, регистрировали сигнала в полосе фильтра 610/20 (канал mCherry). EGFP возбуждали лазером 488 нм, а регистрировали сигнал в полосе 530/30 (канал FITC).

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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 использовали ближне-инфракрасный 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 SypHer.

3.1 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.

3.1.1 KillerOrange: первый генетически кодируемый фотосенсибилизатор в оранжевой области спектра

3.1.1.1 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, см. рисунок 32).

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 33), в белке KillerOrange происходит формирование двух типов хромофора: CFP-подобный и mHoneyDew-подобный [Ai et al., 2007], поглощающие при 455 и 514 нм, соответственно (см. рисунок 32). KillerOrange, как и KillerRed, из которого он был получен, является димерным белком.

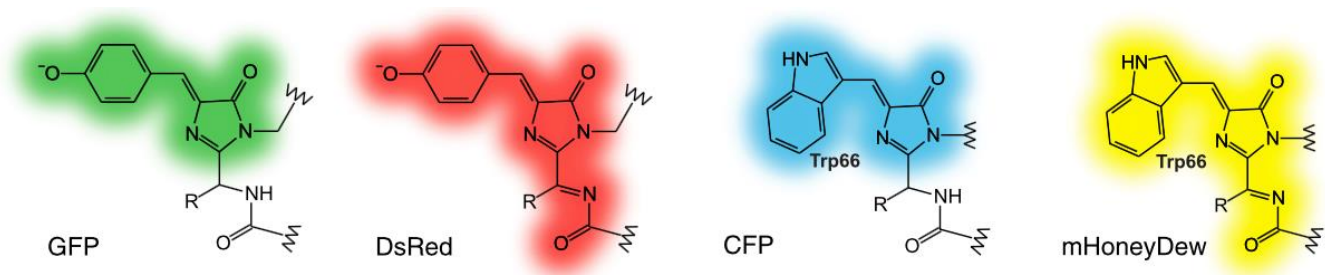


Рисунок 32 – Структуры GFP-, DsRed-, CFP- и mHoneyDew-подобных хромофоров.

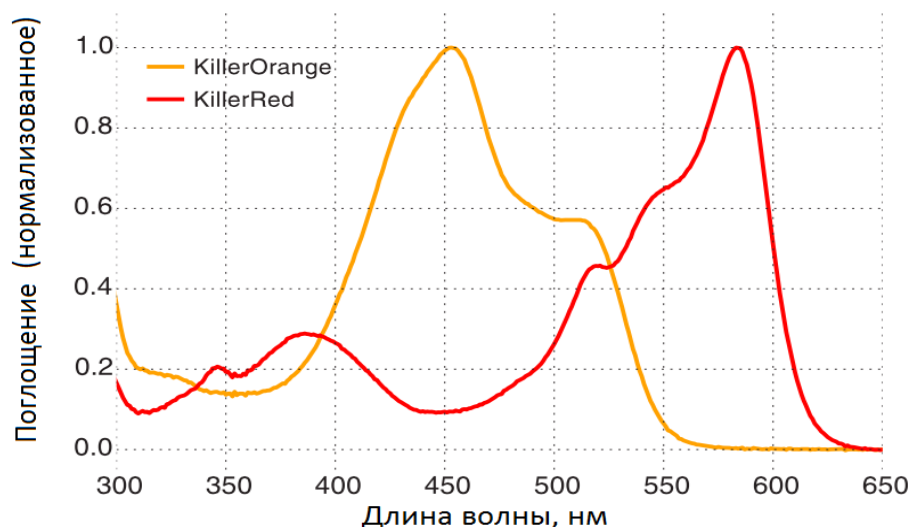


Рисунок 33 – Спектры поглощения белков KillerRed и KillerOrange.

3.1.1.2 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. Для эукариотической экспрессии KillerOrange были выбраны мембранная и митохондриальная локализации с целью достижения максимального фототоксического эффекта.

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 (см. рисунок 34). Впоследствии для работы была выбрана митохондриальная локализация.

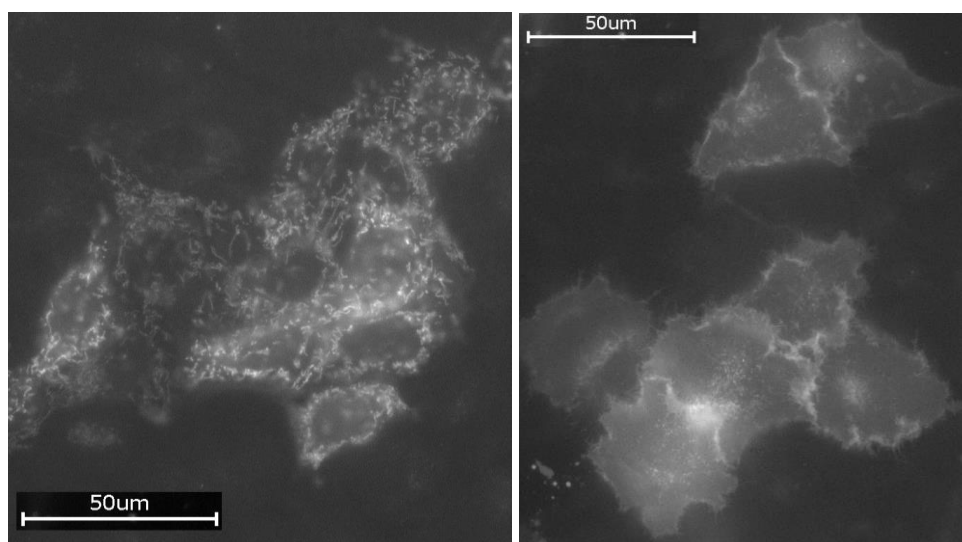


Рисунок 34 – KillerOrange в митохондриальной (слева) и мембранной (справа) локализациях. Культура HeLa, временная трансфекция (широкопольная флуоресцентная микроскопия).

Для исследования фототоксичности в клетках эукариот использовали клеточную линию НЕК293. Эксперимент проводили следующим образом: временно трансфицированные клетки плазмидой pKillerRed-dmito, pKillerOrange-dmito или pEGFP-N смешивали вместе (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 клеток облучали в прозрачных кюветах на сверхярких светодиодах с длиной волны 447 нм или 590 нм (в зависимости от эксперимента). 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 35).

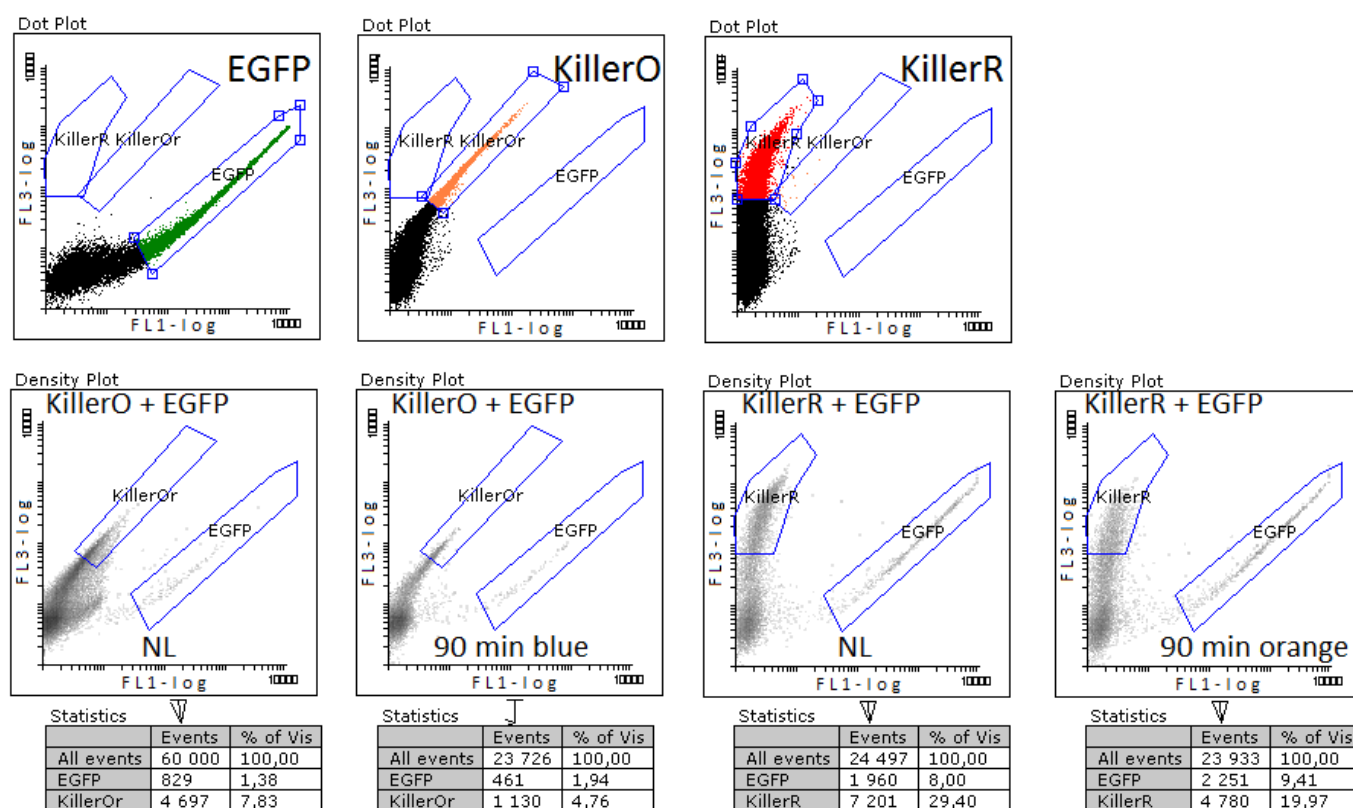


Рисунок 35 – Пример анализа смесей клеток НЕК293 до и после облучения на проточном цитофлуориметре. KillerO = KillerOrange, KillerR = KillerRed; NL = без облучения, 90 min blue/orange = 90 минут облучения синим (447 нм) или оранжевым светом (590 нм).

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 36).

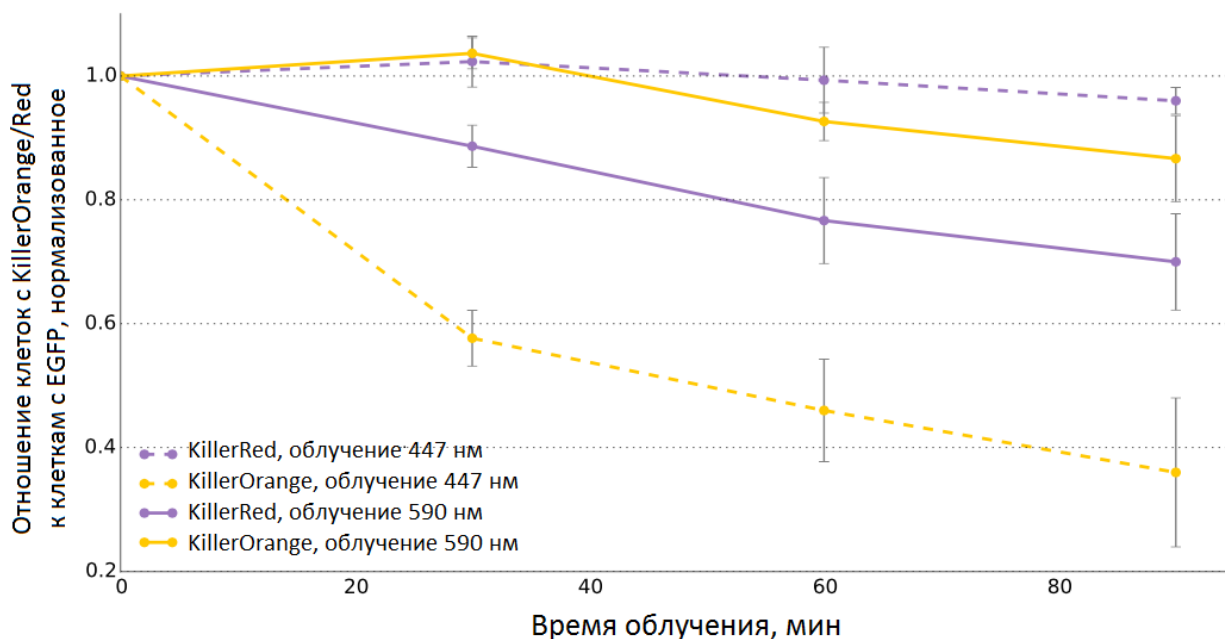


Рисунок 36 – Фототоксичность *KillerOrange* и *KillerRed* в клетках млекопитающих (HEK293). *KillerOrange*, *KillerRed* и EGFP-несущие клетки были смешаны и облучены светом длиной волны 447 (60 мВт/см^2) или 590 нм (20 мВт/см^2). По оси Y отложены изменения доли *KillerOrange* (оранжевые линии) или *KillerRed* (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*.

3.1.2 SuperNova и SuperNova-2: мономерные варианты KillerRed

3.1.2.1 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.

Промежуточный вариант решения этой проблемы – использование tandemных повторов димеризующегося белка [Serebrovskaya et al., 2011]. В таком случае преимущественно образуются внутримолекулярные, а не межмолекулярные димеры, и функция целевого белка сохраняется. Однако из-за этого размер молекулы существенно увеличивается, что также может негативно сказаться на «дееспособности» целевого белка, если сам он небольшого размера.

Первый мономеризованный вариант KillerOrange – mKillerOrange [Pletneva et al., 2015] – оказался менее фототоксичным, чем исходный белок. Для KillerRed же ранее была получена и опубликована мономерная форма, названная “SuperNova”.

Данные о фототоксичности белка SuperNova в некоторой степени противоречивы, поскольку не согласуются с экспериментами разных групп. Ряд исследований (см. обзор литературы) показал, что KillerRed не производит при облучении существенного количества синглетного кислорода. Однако в статье, посвященной получению SuperNova, этот белок сравнили с KillerRed именно по показателю генерирования синглетного кислорода. По данным авторов, SuperNova производит его на 5% эффективнее, чем KillerRed. Учитывая, что KillerRed его практически не генерирует, полученные результаты выглядят не значимыми.

По второму проверяемому компоненту – супероксид-аниону – по данным авторов, SuperNova уступает KillerRed. В совокупности, это позволяет предположить, что SuperNova по крайней мере не превосходит KillerRed по фототоксическому эффекту. 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

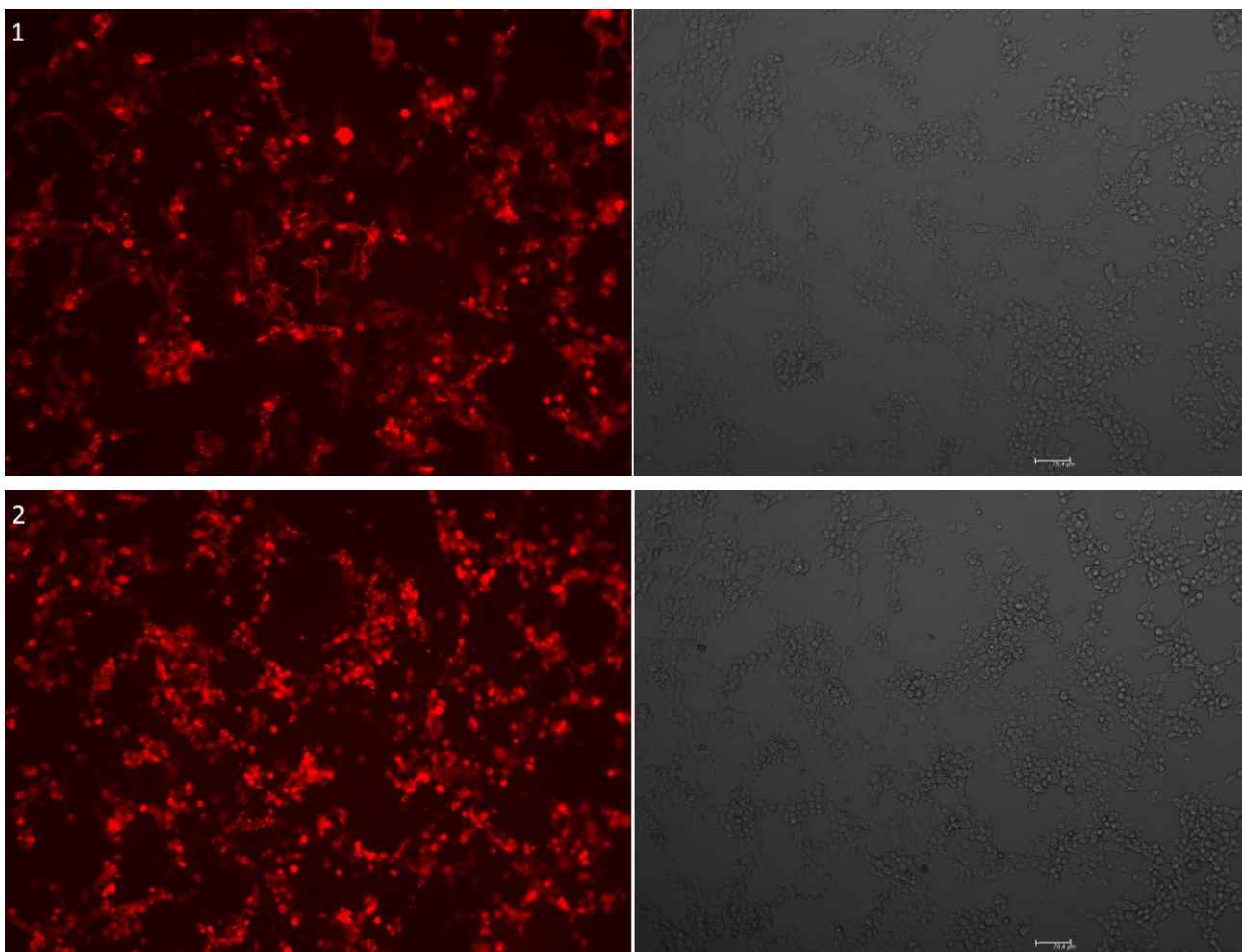
3.1.2.2 SuperNova-2 в клетках млекопитающих

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 pKillerRed-dMito и pKillerRed-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: облучаемая смесь клеток содержала клетки, несущие один из вариантов красного фотосенсибилизатора, и клетки с EGFP (см. рисунок 37). В качестве дополнительного отрицательного контроля также облучали смесь клеток, несущих митохондриально-локализованный нефототоксичный белок mKate2, и клеток с EGFP.

Часть смесей оставляли в качестве контроля в темном месте при комнатной температуре вплоть до окончания облучения. Другую часть клеток 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 38).



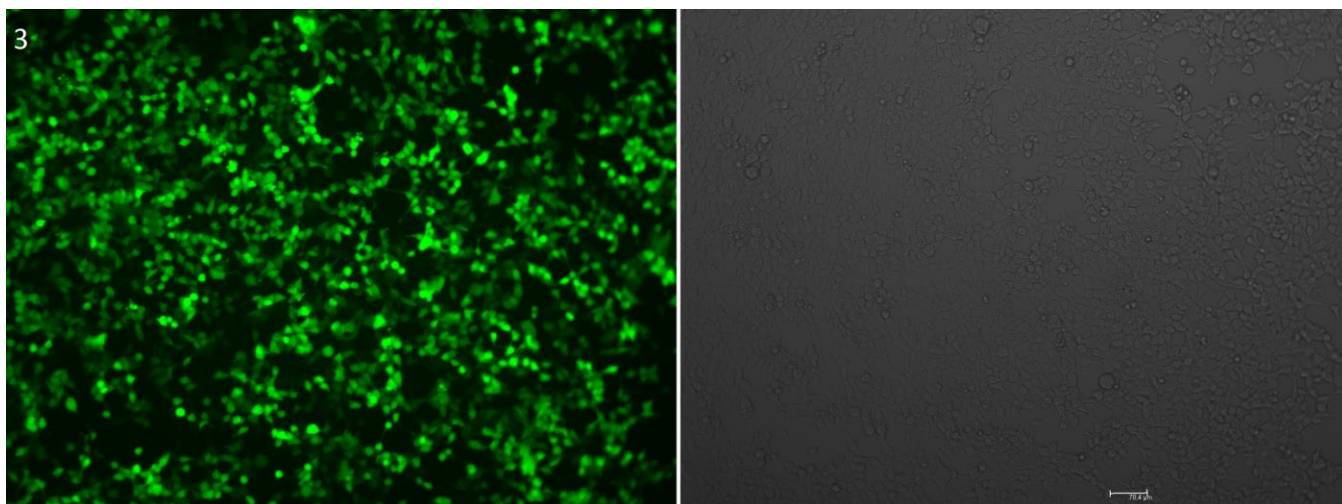


Рисунок 37 – Типичный результат временной трансфекции клеток HEK293 для проведения экспериментов по фототоксичности. (1) SuperNova-тет, (2) SuperNova-dMito, (3) EGFP. Слева - флуоресценция, справа - изображение в проходящем свете.

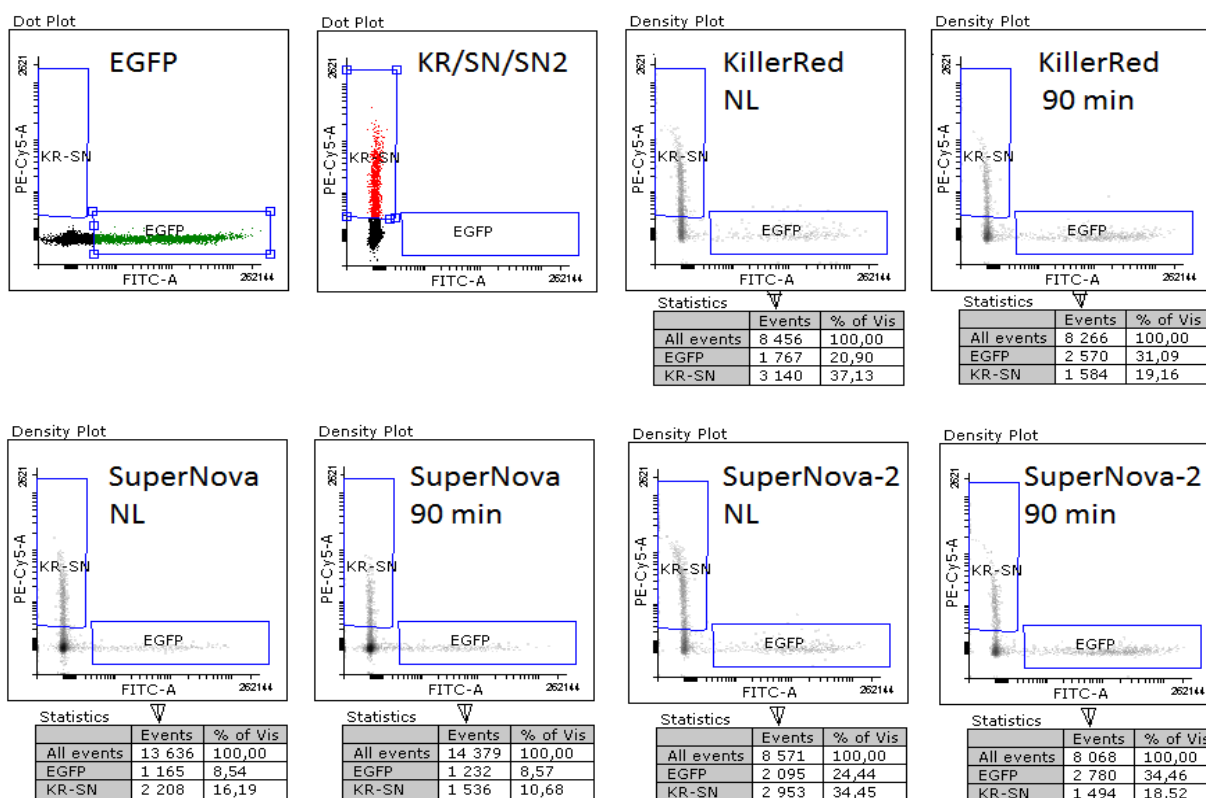


Рисунок 38 – Пример анализа смесей клеток до и после облучения на проточном цитофлуориметре.

Динамику гибели клеток рассчитывали, используя отношение количества клеток, несущих фототоксичные белки, к количеству клеток, несущих EGFP (см. рисунок 39).

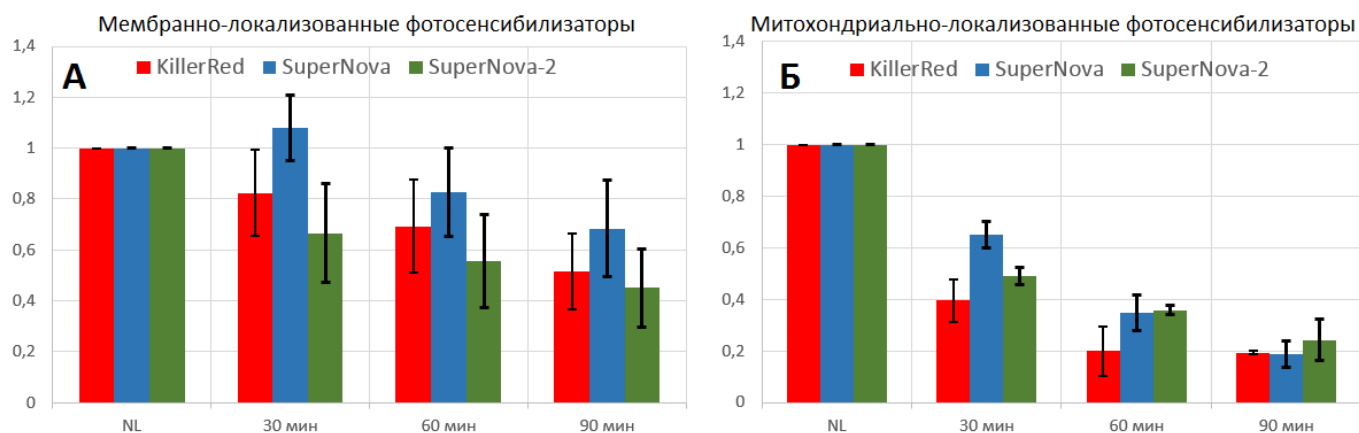


Рисунок 39 – Фототоксичность SuperNova-2, SuperNova и KillerRed в клетках млекопитающих (HEK293). По оси Y отложены значения отношения клеток, несущих фототоксичные белки (KillerRed, SuperNova или SuperNova-2 - красные, синие и зеленые столбцы, соответственно), к клеткам, несущим EGFP. Данные нормированы на отношения в необлученном образце для каждой смеси. Погрешности обозначают стандартное отклонение, $N = 3$.

В экспериментах с мембранной локализацией фотосенсибилизаторов (см. рисунок 39А) 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 39Б) 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.

3.2 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 [Slee et al., 2001; Walsh et al., 2008]. 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.

3.2.1 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 (см. рисунок 40):

- 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 [Filonov et al., 2011]. 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 (см. рисунок 40) 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 [Shcherbakova et al., 2016], однако на момент начала нашей работы они не были известны.

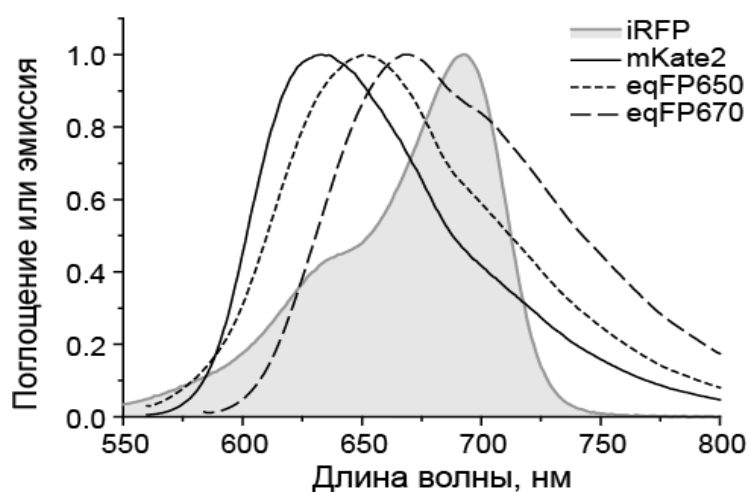


Рисунок 40 – Нормированные спектры эмиссии белков mKate2, eqFP650 и eqFP670, и спектр поглощения белка iRFP.

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) - EFGGSGSDEVDKLGGSGSGT.

3.2.2 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.

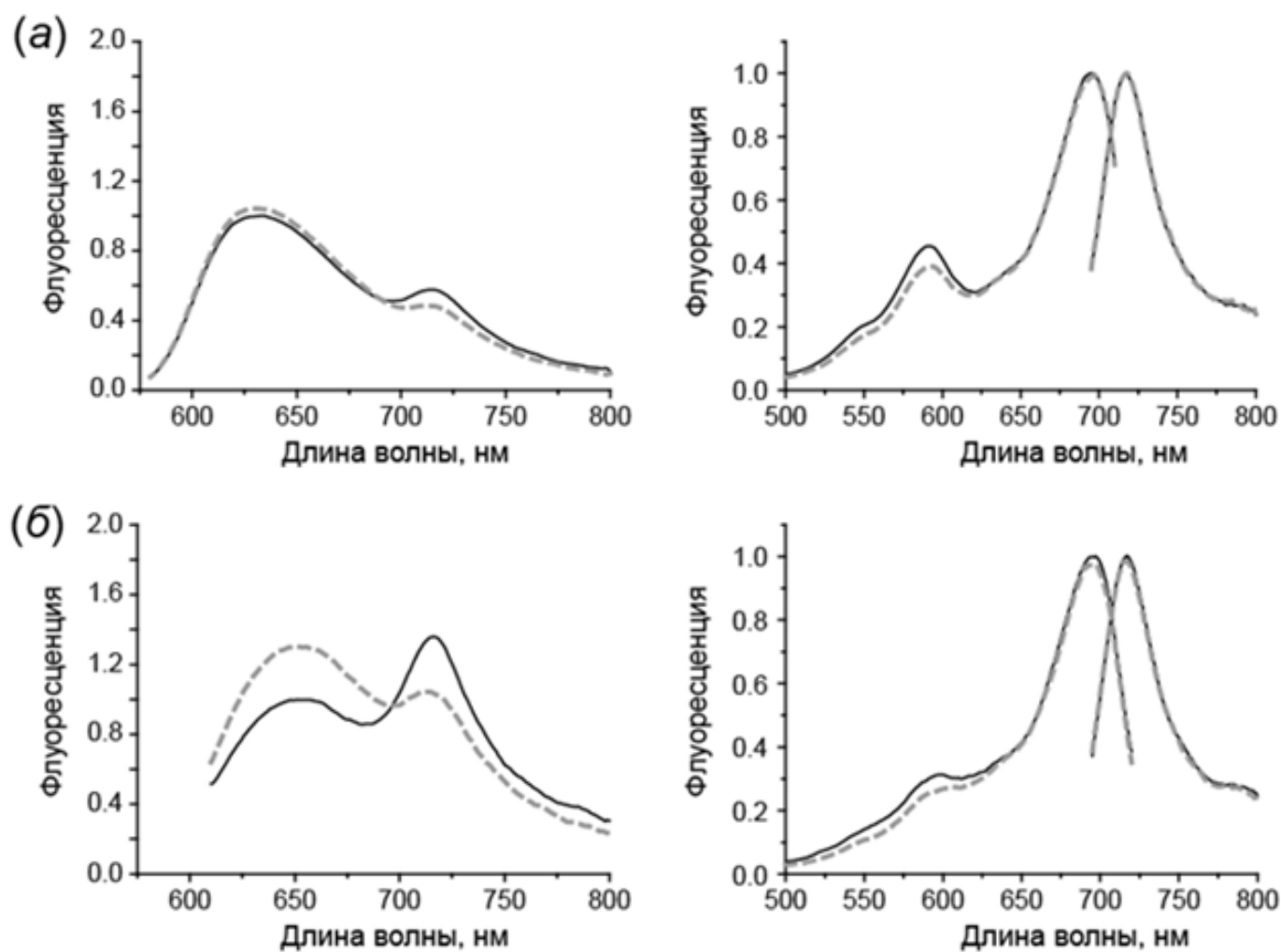
По этой причине для успешной наработки белков сенсоров в бактериях использовали клетки *E. coli* штамма BW25113, которые не усваивают рамнозу. Экспрессии достигали в несколько этапов. Сперва из глицеринового стока BW25113 готовили электрокомпетентные клетки, которые трансформировали плазмидой rwa-gHO. Селекцию колоний осуществляли с помощью канамицина в питательной среде. Из трансформированных rwa23-gHO клеток вновь готовили электрокомпетентные клетки, которые затем трансформировали плазмидой, кодирующей один из вариантов каспазного сенсора. Селекцию в данном случае проводили с помощью обоих антибиотиков, устойчивость к которым обеспечивают данные плазмиды, – канамицина (rwa23) и ампициллина (pQE-30).

Для корректного созревания iRFP питательная среда содержала индуктор для плазмиды rwa23 (рамнозу) и предшественник гема (дельта-аминолевулиновую кислоту). После трансформации клетки 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 41, левые панели) и возбуждения и эмиссии для акцептора (см. рисунок 41, правые панели). Такое же количество белка развели и обработали каспазой-3, после чего измерили те же спектры (см. рисунок 41, пунктирные линии).



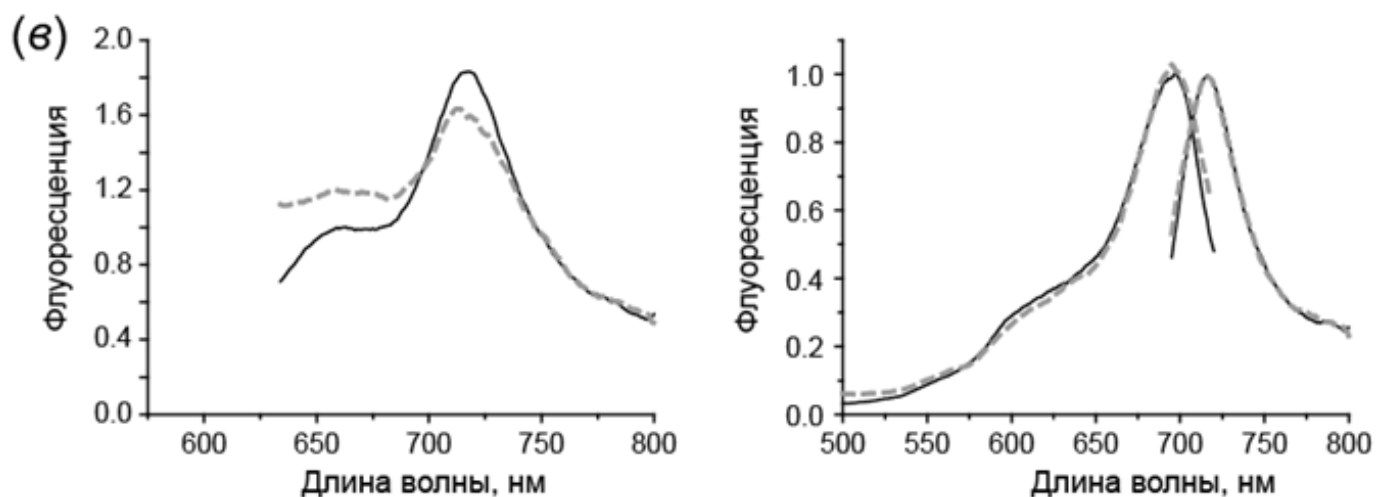


Рисунок 41 – Спектры флуоресценции химерных белков *mKate2-DEVD-iRFP* (а), *FP650-DEVD-iRFP* (б), *FP670-DEVD-iRFP* (в). На каждой панели слева показаны спектры эмиссии при возбуждении донора, справа – спектры возбуждения и эмиссии акцептора. Сплошными линиями показаны спектры образцов до обработки каспазой-3, 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.

3.2.3 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 таковым 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, выше уже была описана важная причина необходимости сдвига в дальневолновую область спектра: пониженное поглощение и рассеяния в ней 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.

3.2.3.1 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 (см. рисунок 42).

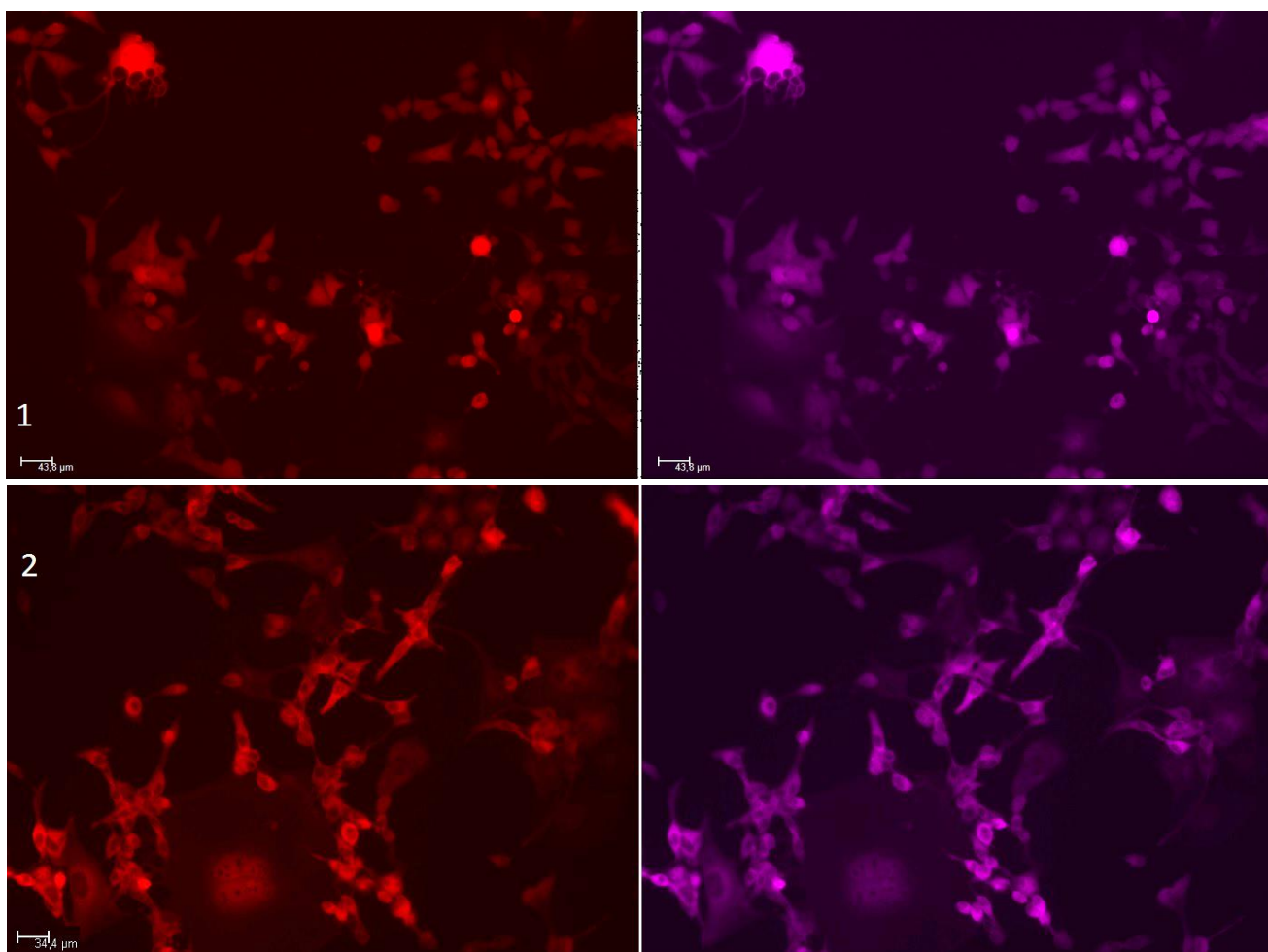


Рисунок 42 – Линия CT26, стабильно экспрессирующая 1) сенсор *mKate2-DEVD-iRFP*; 2) сенсор *FP650-DEVD-iRFP*. Красный псевдоцвет – канал TX2 (красный), фиолетовый – Y5 (ближне-инфракрасный).

Особый интерес вызывает 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 43), распределенные по цитоплазме. Если клетка находится в оптимальной питательной среде, 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.

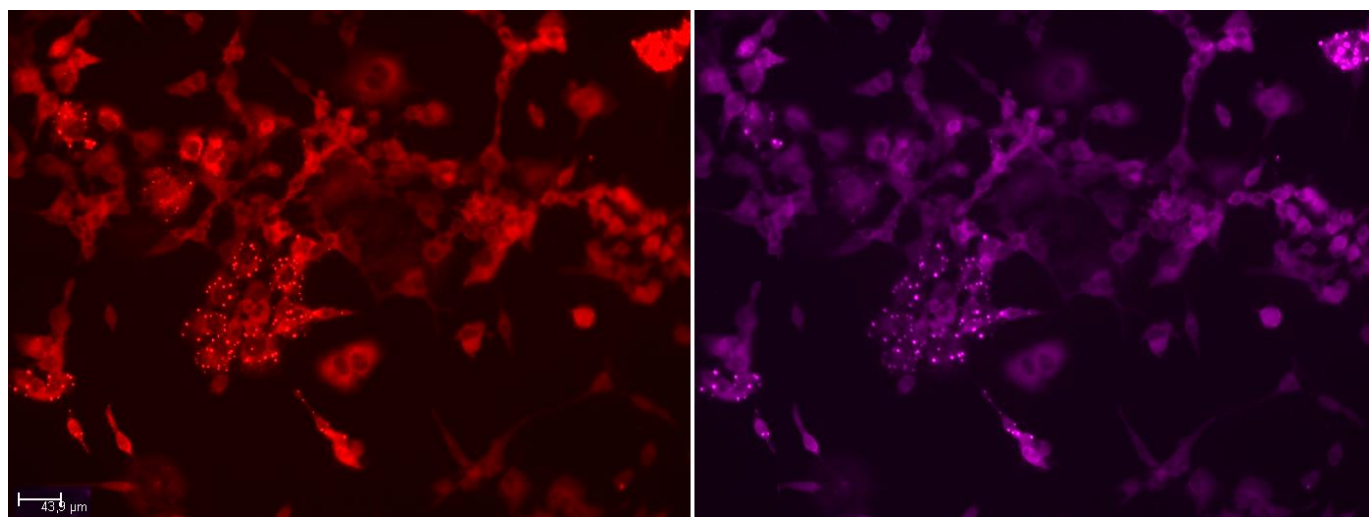


Рисунок 43 – Клетки линии CT26, стабильно экспрессирующие сенсор FP650-DEVD-iRFP, уравновешены до pH 6.0. Красным псевдоцветом окрашен канал TX2 (красный), фиолетовым – Y5 (ближне-инфракрасный).

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.

3.2.3.2 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.

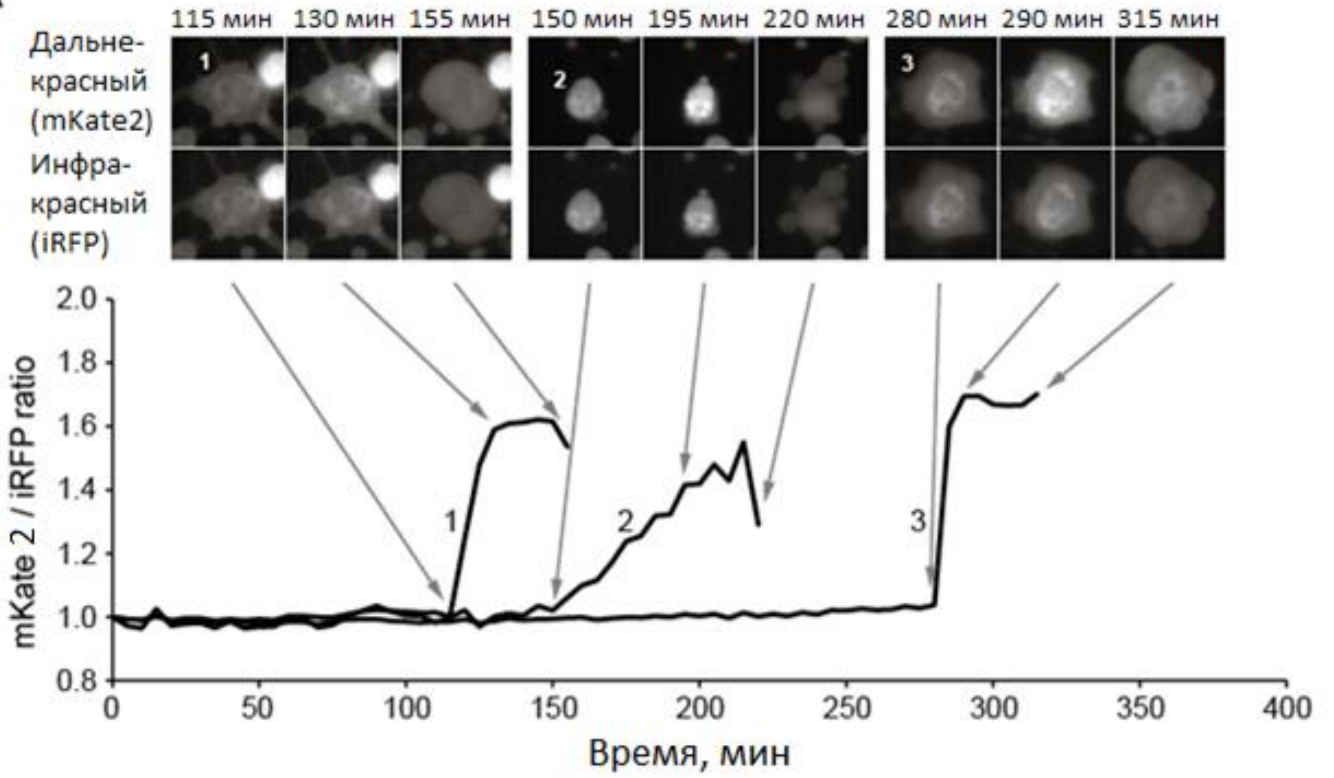
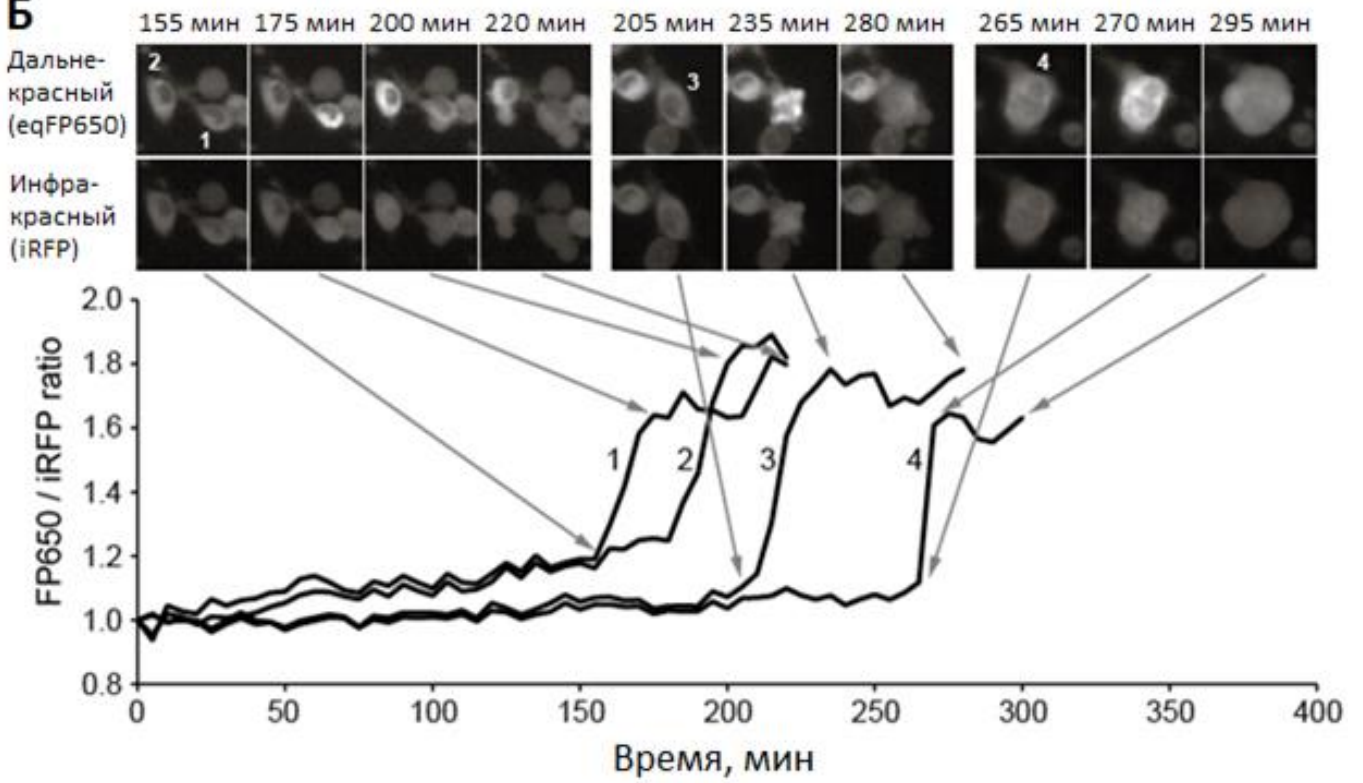
В первую очередь, mKate2-DEVD-iRFP и FP650-DEVD-iRFP тестировали при временной экспрессии в клетках HeLa Kyoto; затем были получены клеточные линии СТ26, постоянно экспрессирующие данные сенсоры. Для исследования использовали термостатируемую камеру с температурой +37°C. Апоптоз вызывали добавлением 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 ратиометричным, 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 44 А, Б). 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.

A**Б**

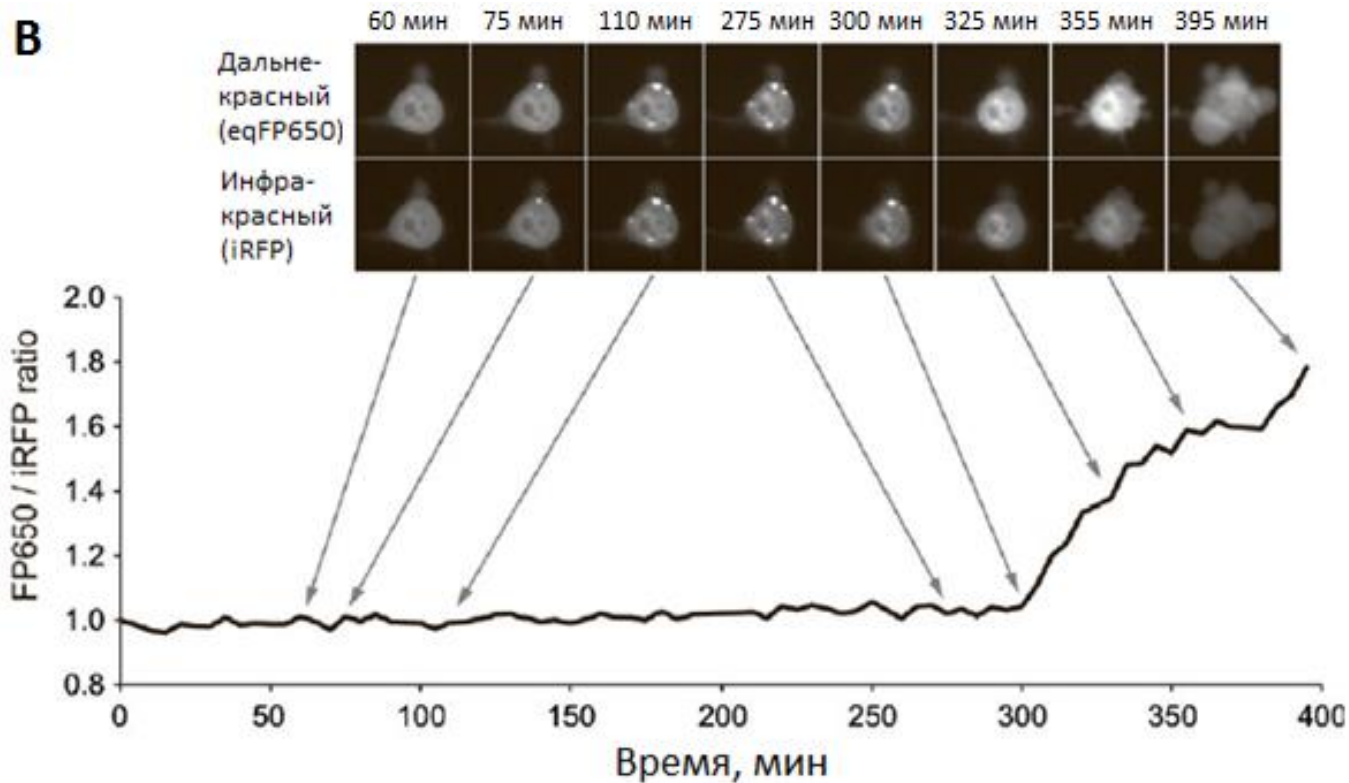


Рисунок 44 – Пример развития апоптоза и активации сенсора для клетки, экспрессирующей А: сенсор *mKate2-DEVD-iRFP* и Б, В: сенсор *FP650-DEVD-iRFP*. На графике В представлен пример клетки, формирующей “фокусы” после добавления стауроспорина в среду.

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.

3.2.3.3 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 была следующей: сначала Вах 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.

Эксперимент проводили на клеточной линии СТ26, стабильно экспрессирующей сенсор mKate2-DEVD-iRFP и временно – Вах-EGFP. Индуктором апоптоза был стауроспорин в концентрации 5 мкг/мл. В красном и дальнекрасном каналах регистрировали активность каспазы-3, а в зеленом – перераспределение химерного белка Вах-EGFP между цитоплазмой и митохондриями.

К нашему удивлению, описанный выше порядок развития событий наблюдался крайне редко (не более 10% случаев, 4 клетки) – см. рисунок 45А. Преимущественно сначала происходила активация каспазы-3, а затем – перераспределение Вах-EGFP между цитоплазмой и митохондриями (более 90%, 54 клетки) – см. рисунок 45Б.

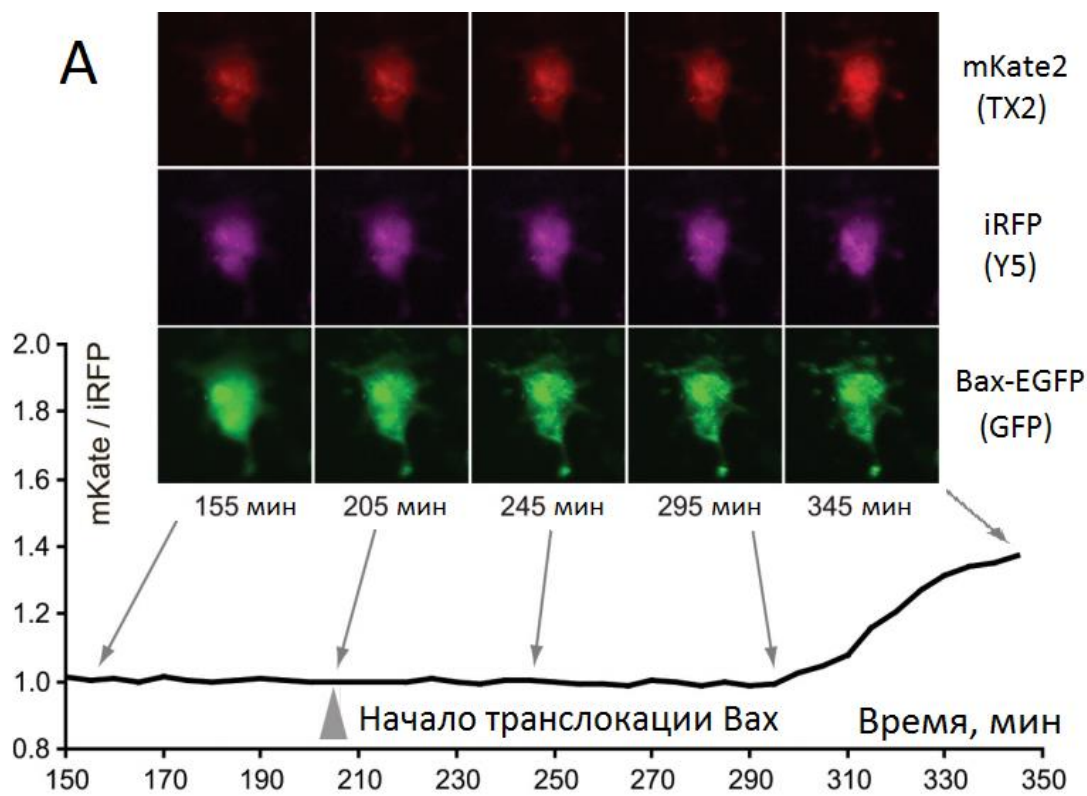
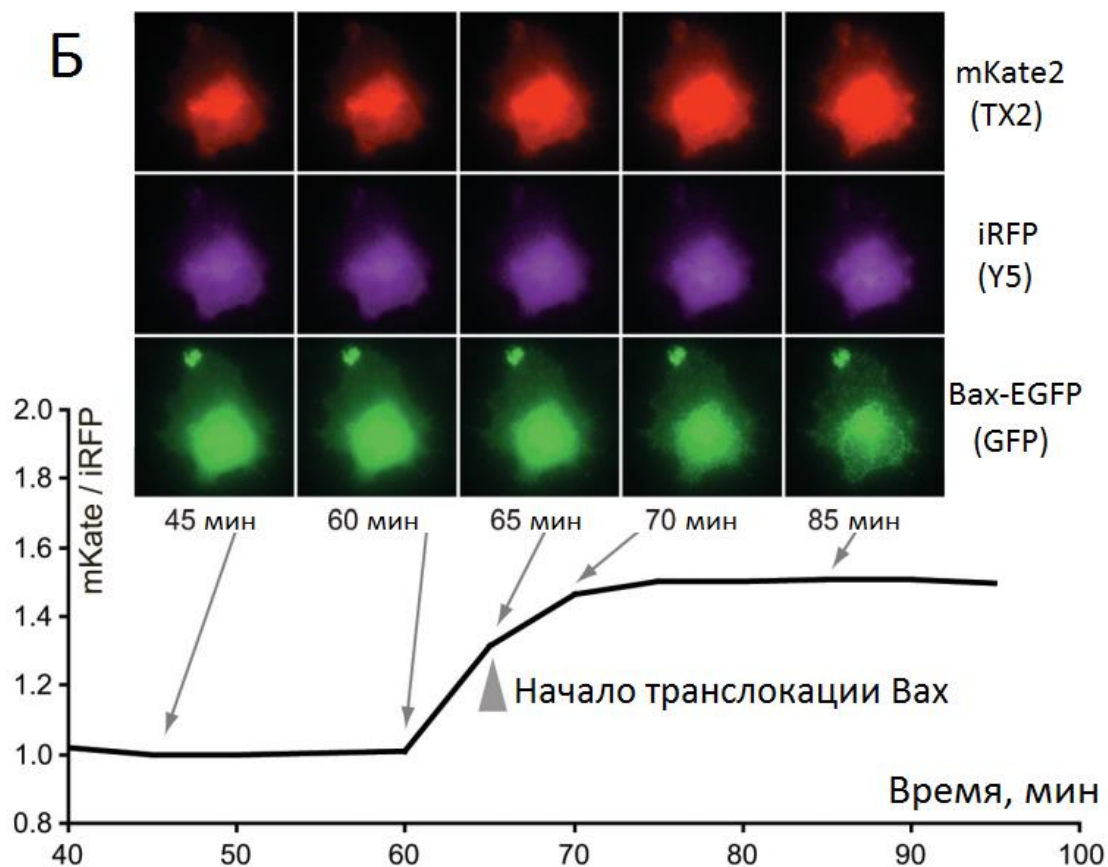


Рисунок 45 –
 Порядок развития событий в процессе апоптоза: красный и инфракрасный каналы – детекция активности каспазы-3, зеленый – перераспределение Вах-EGFP из цитоплазмы в митохондрии.



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 [Manns et al., 2011]. Используя различные блокаторы митохондриального пути активации апоптоза (гиперэкспрессия антиапоптотических белков Bcl2 и Bcl-xL; нокаут адаптерного белка Araf-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 использованы, 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.

3.2.3.4 Одновременная детекция активности каспазы-3 и изменения pH в цитоплазме в процессе апоптоза

Внутриклеточный pH 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 pH цитоплазмы (например, корректировка pH необходима для активации некоторых ферментов).

Процесс апоптоза в ряде случаев характеризуется закислением цитоплазмы; существует предположение, что в зависимости от пути активации снижение pH может быть каспаз-зависимым (в случае внешнего пути) или каспаз-независимым (при внутреннем пути) [Lagadic-Gossmann et al., 2004]. При использовании стауроспорина для достижения апоптоза было показано, что закисление происходит до активации каспаз [Matsuyama et al., 2000], и была даже выдвинута гипотеза о том, что понижение pH является ранним событием в митохондриальном пути активации каспаз.

Для одновременной детекции активности каспазы-3 и изменения pH в цитоплазме в процессе апоптоза мы использовали сенсоры mKate2-DEVD-iRFP и SypHer. SypHer - генетически кодируемый ратиометрический pH-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 pH 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, см. рисунок 46).

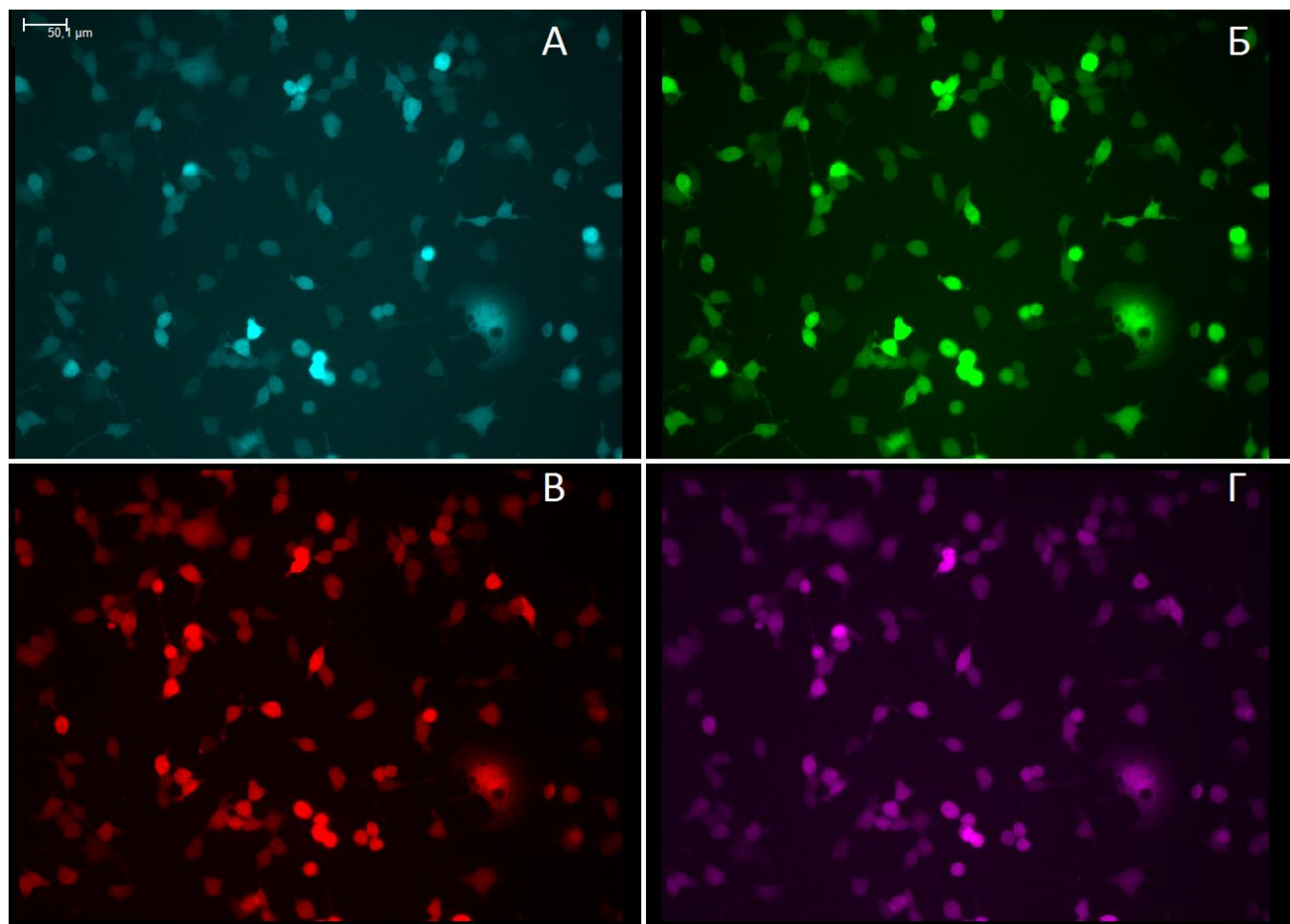


Рисунок 46 – Линия CT26, стабильно экспрессирующая сенсоры SypHer (A - циановый канал CFP, B - зеленый канал GFP) и mKate2-DEVD-iRFP (B - красный канал TX2, Г - инфракрасный канал Y5).

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 47). В процессе развития клеточной гибели резкое падение отношения цианового к зеленому сигналу свидетельствовало о повреждении наружной мембраны.



Рисунок 47 – 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 47, 48), что подтверждает данные литературы о возможной корреляции этих событий. Однако, эффект не характеризуется высокой амплитудой, поэтому необходимо дальнейшее исследование данного явления на увеличенной выборке.

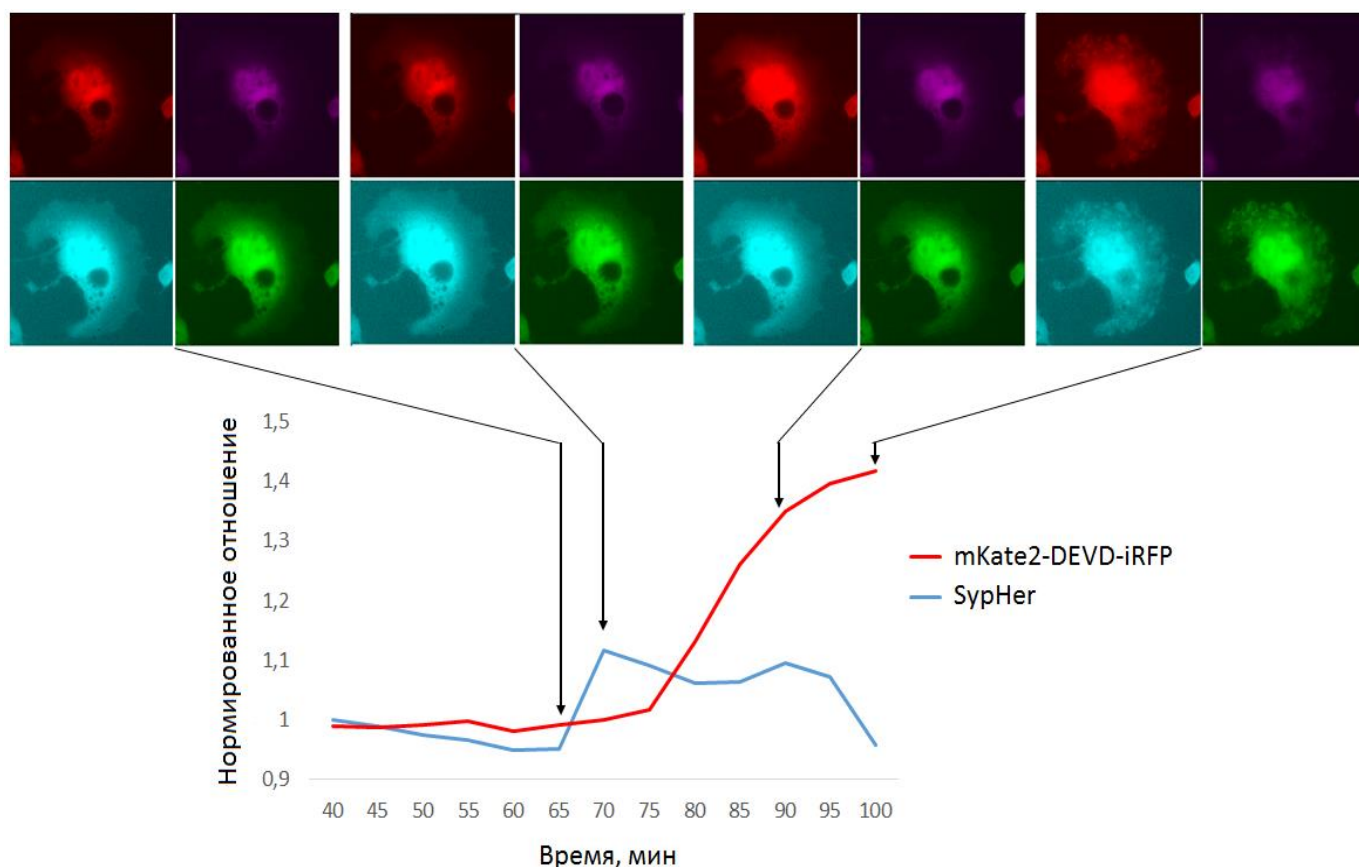


Рисунок 48 – Порядок развития событий в процессе апоптоза: красный и инфракрасный каналы – детекция активности каспазы-3, голубой и зеленый – закисление цитоплазмы.

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 49). 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%).

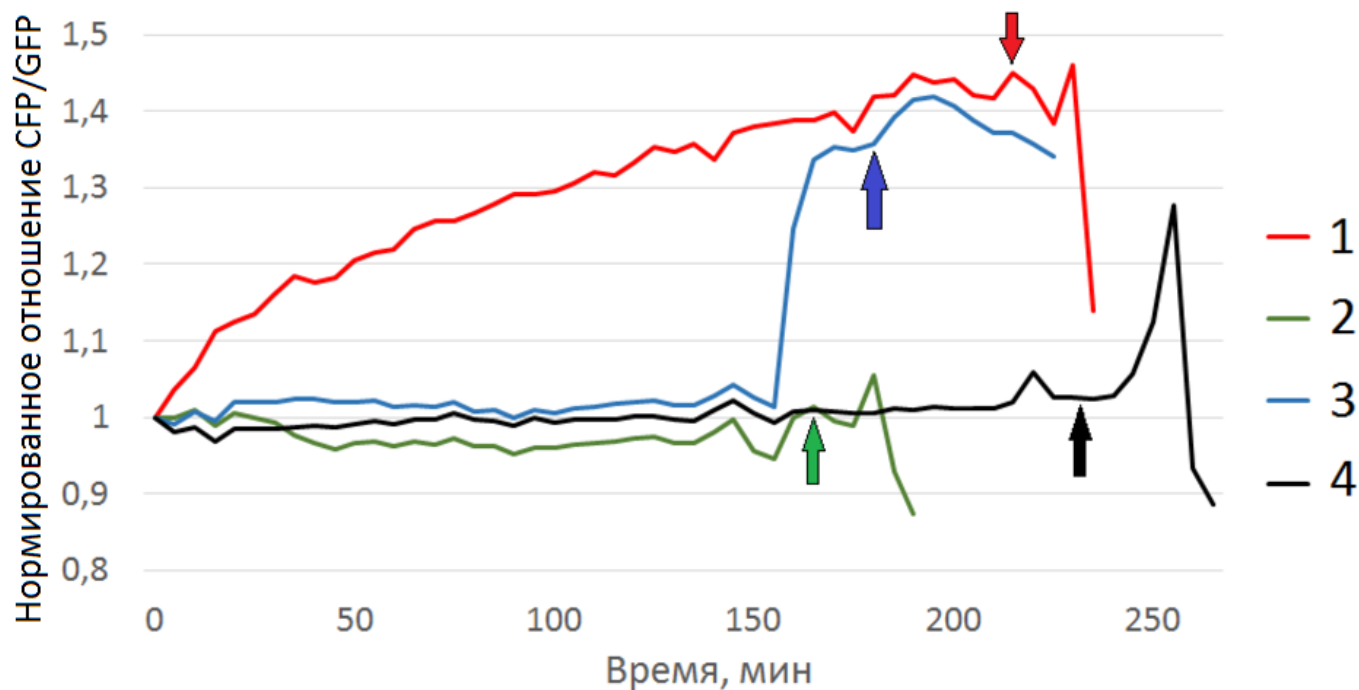


Рисунок 49 – Изменение соотношения цианового к зеленому сигналу SypHer после добавления цисплатина к клеткам, впоследствии погибшим путем апоптоза, нормированное на нулевую точку. Клетка №1 - пример постепенного закисления цитоплазмы без резкого изменения во время активации каспазы-3; клетка №2 - пример 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 50).

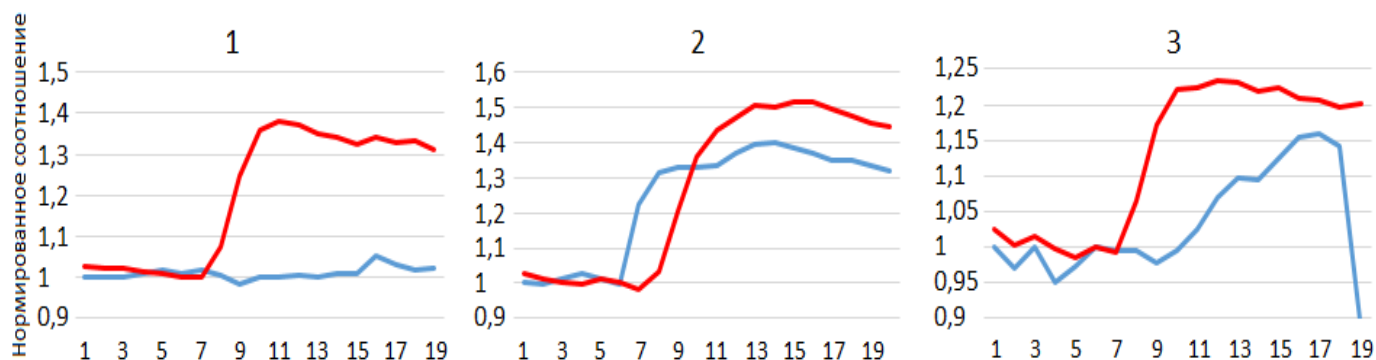


Рисунок 50 – Порядок развития событий в процессе апоптоза: красная линия – нормированный на начало развития сигнал сенсора *mKate2-DEVD-iRFP*, синяя линия – сигнал сенсора *SypHer*, нормированный на уровень за 25 минут до начала развития сигнала на активность каспазы-3. Съемка с промежутком 5 минут. **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 *Vax* и *SypHer*, а также параллельное отслеживание изменения цитоплазматического pH 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. Таким образом, 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 и на клеточной мембране) обладает скоростью созревания и фототоксичностью, сходными с таковыми димерного белка KillerRed и превосходящими скорость созревания и 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.

Заключение

Данная работа была 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 исследовали производные флуоресцентного фотосенсибилизатора KillerRed – KillerOrange, SuperNova и SuperNova-2 – на наличие фототоксичности для клеток млекопитающих. KillerOrange проявил фототоксические свойства 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 сконструировали и протестировали несколько вариантов дальнекрасно-ближнеинфракрасного сенсора на активность каспазы-3, в состав которых впервые вошел белок на основе бактериофитохрома iRFP. Наиболее успешный вариант по результатам экспериментов *in vitro* и *in cellulo* – mKate2-DEVD-iRFP – использовали для мультиканальной флуоресцентной микроскопии с визуализацией нескольких клеточных процессов.

При наблюдении за транслокацией проапоптотического белка Вах и активностью каспазы-3 при активации апоптоза стауроспорином обнаружили неоднозначность очередности момента миграции Вах в митохондрии и начала работы каспазы-3, что позволило предположить одновременное протекание нескольких путей активации апоптоза, вызываемого стауроспорином.

Отслеживание изменения кислотности среды и активности каспазы-3 при активации апоптоза стауроспорином и цисплатином выявило различия механизмов клеточной гибели,

вызываемой данными индукторами:

- закисление цитоплазмы при использовании цисплатина не столь значительно, как при использовании стауроспорина, и не коррелирует со временем активации каспазы-3;
- активация каспазы-3 в случае цисплатин-опосредованной гибели является более поздним событием в процессе апоптоза, т.е. более близким по времени к началу фрагментации клетки, чем при вызывании апоптоза стауроспорином.

Проведенные эксперименты *in cellulo* позволяют утверждать, что созданный сенсор на активность каспазы-3 – mKate2-DEVD-iRFP – перспективный инструмент для исследования механизма апоптоза; флуоресценция в дальнекрасной-ближнеинфракрасной области спектра делает данный сенсор подходящим для работы *in vivo*.

Данная работа объединяет в себе два больших раздела развития технологий на основе флуоресцентных белков: применение фотосенсибилизаторов для достижения клеточной гибели и создание новых генетически-кодируемых сенсоров. Главными результатами являются сравнение фототоксического эффекта новых белков семейства KillerRed, а также создание первого дальнекрасно-ближнеинфракрасного сенсора на активность каспазы-3 на основе бактериофитохромного белка iRFP - mKate2-DEVD-iRFP.

Список сокращений

АФК	-	активные формы кислорода
ВИЧ	-	вирус иммунодефицита человека
ДНК	-	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИК	-	инфракрасный
ПЦР	-	полимеразная цепная реакция
СЕ	-	субъединица
ФАМ	-	флуоресцеин амидит
ФДТ	-	фотодинамическая терапия
ФС	-	фотосенсибилизаторы
ЭДТА	-	этилендиаминтетрауксусная кислота
ADPA	-	9,10-anthracene dipropionic acid
APAF-1	-	Apoptotic protease activating factor 1
Bak	-	Bcl-2 homologous antagonist killer,
Bax	-	Bcl-2-associated X protein
Bcl2	-	B-cell lymphoma 2
BER	-	base excision repair
BFP	-	blue
BD	-	BH3 interacting-domain death agonist
BRET	-	Bioluminescence-based Resonance Energy Transfer
BSA	-	бычий сывороточный альбумин
CALI	-	chromophore-assisted light inactivation
CARD	-	caspase recruitment domain
Caspase	-	cysteine-dependent aspartate-directed protease
CFP	-	cyan fluorescent protein
CT26	-	линия клеток колоректальной карциномы мышей
DED	-	death effector domain
DFF40/CAD	-	DNA-Fragmenting Factor / Inhibitor of Caspase Activated DNase
Diablo	-	Direct IAP binding protein with low pI
DISC	-	death-inducing signaling complex
DMEM	-	модифицированная по методу Дульбекко минимальная среда Игла
dNTP	-	2'-дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфаты
DTT	-	1,4-дитиотреитол
eIF4G	-	Eukaryotic translation initiation factor 4 G
FADD	-	Fas-associated Death Domain-protein
Fas	-	First apoptosis signal
FBS	-	бычья эмбриональная сыворотка
FCS	-	Fluorescence Correlation Spectroscopy
FLIM	-	Fluorescence Lifetime Imaging

FP	-	fluorescent protein
FRET	-	Förster resonance energy transfer
GFP	-	green fluorescent protein
H2B-tKillerRed	-	H2B-tandemKillerRed
HBS	-	Hepes Buffered Saline
HEK293T	-	линия клеток человеческой эмбриональной почки 293T
HeLa	-	линия клеток раковой опухоли шейки матки пациентки Henrietta Lacks
HEPES	-	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IAP-белки	-	inhibitors of apoptosis
iPLA2	-	calcium-independent phospholipase A2
iRFP	-	infrared fluorescent protein
IkB α	-	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
KFP	-	kindling fluorescent protein
LAP2	-	Lamina-associated polypeptide 2
LB (среда)	-	среда Lysogeny broth
Mcl1	-	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein
miniSOG	-	mini singlet oxygen generator
mQ	-	Milli-Q вода
NF- κ B	-	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
Nup153	-	нуклеопорин 153
PBS	-	фосфатный буферный солевой буфер
PH-домен	-	домен плейкстриновой гомологии
Rb-protein	-	retinoblastoma protein
SDS	-	додецилсульфат натрия
SMAC	-	Second Mitochondria-derived Activator of Caspases
SOB	-	Super Optimal Broth
ТА-активатор	-	активатор теломеразы
ТАЕ-буфер	-	Трис-ацетатный буфер с ЭДТА
t-BID	-	truncated BID
Tet	-	тетрациклин
TIRFM	-	Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy
TNFR1	-	Tumour Necrosis Factor receptor 1
TRADD	-	TNFR1-associated Death Domain-protein
TRAIL	-	TNF-related apoptosis-inducing ligand
XRCC1	-	X-ray repair cross-complementing protein 1
YFP	-	yellow fluorescent protein

Список использованной литературы

В алфавитном порядке:

1. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. (1972) Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. Москва, изд. «Наука»;
2. Ермакова Е.Ю. (2005) Перекисное окисление липидов и барьерная функция кожи в условиях старения организма (диссертация)
3. Мартынова ЕА (2003) Регуляция активности каспаз в апоптозе. *Биоорг. Хим.* **29**(5):518-43.
4. Мерзляк М.Н. (1999) Активированный кислород и жизнедеятельность растений *Соросовский образовательный журнал* №9:20-26
5. Миронов А.Ф. (1996) Фотодинамическая терапия рака - новый эффективный метод диагностики и лечения злокачественных опухолей. *Соросовский образовательный журнал*, №8:32-40.
6. Ширманова МВ, Снопина ЛБ, Проданец НН, Серебровская ЕО, Игнатова НИ, Сергеева ЕА, Каменский ВА, Клементьева НВ, Лукьянов КА, Лукьянов СА, Загайнова ЕВ. Патоморфологическое исследование фототоксичности генетически-кодированного фотосенсибилизатора KillerRed на опухолях животных (2013) *Современные технологии в медицине* **5**(1):6-13.
7. Ярилин А. А. Апоптоз и его роль в целостном организме (2003) *Глаукома* **2**:46—54.
8. Abou-Ghali M, Stiban J (2015) Regulation of ceramide channel formation and disassembly: Insights on the initiation of apoptosis. *Saudi J Biol Sci.* **22**(6):760-72.
9. Agostinis P, Buytaert E, Breysens H, Hendrickx N (2004) Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochem. Photobiol. Sci.* **3**:721–729.
10. Agostinis P., Berg K., Cengel K.A., Foster T.H., Girotti A.W., Gollnick S.O., Hahn S.M., Hamblin M.R., Juzeniene A., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Mroz P., Nowis D., Piette J., Wilson B.C., Golab J (2011) Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J. Clin.* **61**:250–281
11. Ai HW, Shaner NC, Cheng Z, Tsien RY, Campbell RE (2007) Exploration of new chromophore structures leads to the identification of improved blue fluorescent proteins. *Biochemistry* **46**:5904–5910
12. Alcivar A, Hu S, Tang J, Yang X (2003) DEDD and DEDD2 associate with caspase-8/10 and signal cell death. *Oncogene* **22**(2):291-7.
13. Almeida RD, Manadas BJ, Carvalho AP, Duarte CB (2004) Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim. Biophys. Acta* **1704**:59–86
14. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J (1996). Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. *Cell* **87**(2): 171.
15. Angres B, Steuer H, Weber P, Wagner M, Schneckenburger H (2009) A membrane-bound FRET-based caspase sensor for detection of apoptosis using fluorescence lifetime and total internal reflection microscopy. *Cytometry A* **75**(5):420-7.

16. Avery SV (2011) Molecular targets of oxidative stress. *Biochemical Journal*, **434**(2) 201-210.
17. Bachowski GJ, Korytowski W & Girotti AW (1994) Characterization of lipid hydroperoxides generated by photodynamic treatment of leukemia cells. *Lipids* **29**, 449-59.
18. Bachowski GJ, Pintar TJ & Girotti AW (1991) Photosensitized lipid peroxidation and enzyme inactivation by membrane-bound merocyanine 540: reaction mechanisms in the absence and presence of ascorbate. *Photochemistry and photobiology* **53**, 481-91.
19. Baehrecke EH (2003) Autophagic programmed cell death in Drosophila. *Cell Death and Differentiation* **10**:940–945.
20. Bardet, Kolahgar, Mynett, Miguel-Aliaga, Briscoe, Meier, Vincent (2008) A fluorescent reporter of caspase activity for live imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(37): 13901–13905
21. Boeneman K, Mei BC, Dennis AM, Bao G, Deschamps JR, Mattoussi H, Medintz IL (2009) Sensing caspase 3 activity with quantum dot-fluorescent protein assemblies. *J Am Chem Soc* **131**(11):3828-9.
22. Bogdanov AM, Mishin AS, Yampolsky IV, Belousov VV, Chudakov DM, Subach FV, Verkhusha VV, Lukyanov S, Lukyanov KA (2009) Green fluorescent proteins are light-induced electron donors. *Nat Chem Biol.* **5**(7):459-61.
23. Bonner C, Bacon S, Concannon CG, Rizvi SR, Baquié M, Farrelly AM, Kilbride SM, Dussmann H, Ward MW, Boulanger CM, Wollheim CB, Graf R, Byrne MM, Prehn JH (2010) INS-1 cells undergoing caspase-dependent apoptosis enhance the regenerative capacity of neighboring cells. *Diabetes* **59**(11):2799-808
24. Brown S.B., Brown E.A., Walker I (2004) The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol.* **5**:497–508
25. Buchko GW, Wagner JR, Cadet J, Raoul S & Weinfeld M (1995) Methylene blue-mediated photooxidation of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine. *Biochimica et biophysica acta* **1263**, 17-24.
26. Bulina ME, Chudakov DM, Britanova OV, Yanushevich YG, Staroverov DB, Chepurnykh TV, Merzlyak EM, Shkrob MA, Lukyanov S & Lukyanov KA (2006-a) A genetically encoded photosensitizer. *Nature biotechnology* **24**, 95-9
27. Bulina ME, Lukyanov KA, Britanova OV, Onichtchouk D, Lukyanov S, Chudakov DM. (2006-b) Chromophore-assisted light inactivation (CALI) using the phototoxic fluorescent protein KillerRed. *Nat Protoc.* **1**(2):947-53.
28. Buytaert E, Callewaert G, Hendrickx N, Scorrano L, Hartmann D, Missiaen L, Vandenheede JR, Heirman I, Grooten J & Agostinis P (2006-a) Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **20**, 756-8.
29. Buytaert E, Callewaert G., Vandenheede J.R., Agostinis P (2006-b) Deficiency in apoptotic effectors Bax and Bak reveals an autophagic cell death pathway initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum. *Autophagy* **2**:238–240.
30. Buytaert E, Dewaele M & Agostinis P (2007) Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et biophysica acta* **1776**, 86-107
31. Byrne LC, Khalid F, Lee T, Zin EA, Greenberg KP, Visel M, Schaffer DV, Flannery JG. (2013)

AAV-mediated, optogenetic ablation of Müller Glia leads to structural and functional changes in the mouse retina. *PLoS One* **8**(9):e76075.

32. Carpentier P, Violot S, Blanchoin L, Bourgeois D (2009) Structural basis for the phototoxicity of the fluorescent protein KillerRed. *FEBS Lett.* **583**(17):2839-42.
33. Castano A, Demidova T & Hamblin M (2004) Mechanisms in photodynamic therapy: part one. Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **1**, 279-293
34. Chaloupka R, Petit PX, Israël N & Sureau F (1999) Over-expression of Bcl-2 does not protect cells from hypericin photo-induced mitochondrial membrane depolarization, but delays subsequent events in the apoptotic pathway. *FEBS letters* **462**, 295-301.
35. Chang HY, Nishitoh H, Yang X, Ichijo H, Baltimore D (1998) Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. *Science* **281**(5384):1860-3.
36. Chen B, Roskams T, Xu Y, Agostinis P, de Witte PA (2002) Photodynamic therapy with hypericin induces vascular damage and apoptosis in the RIF-1 mouse tumor model. *Int. J. Cancer* **98**:284–290
37. Chen H, Mei Q, Hou Y, Zhu X, Koh K, Li X, Li G (2013) Fabrication of a protease sensor for caspase-3 activity detection based on surface plasmon resonance. *Analyst* **138**(19):5757-61.
38. Chen H, Yang X, Feng Z, Tang R, Ren F, Wei K, Chen G (2015) Prognostic value of Caspase-3 expression in cancers of digestive tract: a meta-analysis and systematic review. *Int J Clin Exp Med* **8**(7):10225-34.
39. Chernyak BV, Izyumov DS, Lyamzaev KG, Pashkovskaya AA, Pletjushkina OY, Antonenko YN, Sakharov DV, Wirtz KWA & Skulachev VP (2006) Production of reactive oxygen species in mitochondria of HeLa cells under oxidative stress. *Biochimica et biophysica acta* **1757**, 525-34.
40. Cho SJ, Kim SY, Jeong HC, Cheong H, Kim D, Park SJ, Choi JJ, Kim H, Chung HM, Moon SH, Cha HJ (2015) Repair of Ischemic Injury by Pluripotent Stem Cell Based Cell Therapy without Teratoma through Selective Photosensitivity. *Stem Cell Reports.* **5**(6):1067-80.
41. Chudakov DM, Lukyanov S & Lukyanov KA (2005) Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging. *Trends in biotechnology* **23**, 605-13.
42. Dacres H, Dumancic MM, Horne I, Trowell SC (2009-a) Direct comparison of bioluminescence-based resonance energy transfer methods for monitoring of proteolytic cleavage. *Anal Biochem* **385**(2):194-202.
43. Dacres H, Dumancic MM, Horne I, Trowell SC (2009-b) Direct comparison of fluorescence- and bioluminescence-based resonance energy transfer methods for real-time monitoring of thrombin-catalysed proteolytic cleavage. *Biosens Bioelectron* **24**(5):1164-70.
44. Das GC, Holiday D, Gallardo R, Haas C (2001) Taxol-induced cell cycle arrest and apoptosis: dose-response relationship in lung cancer cells of different wild-type p53 status and under isogenic condition. *Cancer Lett* **165**(2):147-53.
45. Dash PK, Blum S, Moore AN (2000) Caspase activity plays an essential role in long-term memory. *Neuroreport* **11**(12):2811-6.
46. Dat J, Vandenaabeele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* **57**(5):779-95.
47. Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Ferri KF, Irinopoulou T, Larochette N, Prévost MC, Leber B,

- Andrews D, Penninger J, Kroemer G (2000) Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J* **14**:729-39.
48. de Rosny E, Carpentier P. (2012) GFP-like phototransformation mechanisms in the cytotoxic fluorescent protein KillerRed unraveled by structural and spectroscopic investigations. *J Am Chem Soc.* **134**(43):18015-21.
49. Destaing O, Ferguson SM, Grichine A, Oddou C, De Camilli P, Albiges-Rizo C, Baron R (2013) Essential function of dynamin in the invasive properties and actin architecture of v-Src induced podosomes/invasosomes. *PLoS One* **8**(12):e77956.
50. Dolmans DE, D. Fukumura, R.K. Jain (2003) Photodynamic therapy for cancer. *Nat. Rev., Cancer* **3**:380–387
51. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, Moan J & Peng Q (1998) Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute* **90**, 889-905.
52. Edinger AL & Thompson CB (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current opinion in cell biology* **16**, 663-9
53. Engels IH, Totzke G, Fischer U, Schulze-Osthoff K, Jänicke RU (2005) Caspase-10 sensitizes breast carcinoma cells to TRAIL-induced but not tumor necrosis factor-induced apoptosis in a caspase-3-dependent manner. *Mol Cell Biol* **25**(7):2808-18.
54. Ertürk A, Wang Y, Sheng M.J (2014) Local pruning of dendrites and spines by caspase-3-dependent and proteasome-limited mechanisms. *Neurosci.* **34**(5):1672-88.
55. Fabian MA, Biggs WH 3rd, Treiber DK, Atteridge CE, Azimioara MD, Benedetti MG, Carter TA, Ciceri P, Edeen PT, Floyd M, Ford JM, Galvin M, Gerlach JL, Grotzfeld RM, Herrgard S, Insko DE, Insko MA, Lai AG, Lélias JM, Mehta SA, Milanov ZV, Velasco AM, Wodicka LM, Patel HK, Zarrinkar PP, Lockhart DJ (2005) A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nat. Biotechnol.* **23**:329-336.
56. Fabris C, Valduga G, Miotto G, Borsetto L, Jori G, Garbisa S & Reddi E (2001) Photosensitization with zinc (II) phthalocyanine as a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Cancer research* **61**, 7495-500.
57. Fesik SW, Shi Y (2001) Structural biology. Controlling the caspases. *Science* **294**(5546):1477-8.
58. Fickweiler S, Abels C, Karrer S, Bäuml W, Landthaler M, Hofstädter F & Szeimies RM (1999) Photosensitization of human skin cell lines by ATMPn (9-acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(beta-methoxyethyl)-porphycene) in vitro: mechanism of action. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* **48**, 27-35.
59. Filonov GS, Piatkevich KD, Ting LM, Zhang J, Kim K, Verkhusha VV (2011) Bright and stable near-infrared fluorescent protein for in vivo imaging. *Nat Biotechnol.* **29**(8):757-61.
60. Furre IE, Shahzidi S, Luksiene Z, Møller MTN, Borgen E, Morgan J, Tkacz-Stachowska K, Nesland JM & Peng Q (2005) Targeting PBR by hexaminolevulinate-mediated photodynamic therapy induces apoptosis through translocation of apoptosis-inducing factor in human leukemia cells. *Cancer research* **65**, 11051-60.
61. Gidding CE, Meeuwse-de Boer GJ, Koopmans P, Uges DR, Kamps WA, de Graaf SS. (1999) Vincristine pharmacokinetics after repetitive dosing in children. *Cancer Chemother Pharmacol* **44**(3):203-9.
62. Goryashchenko AS, Khrenova MG, Bochkova AA, Ivashina TV, Vinokurov LM, Savitsky AP

(2015) Genetically Encoded FRET-Sensor Based on Terbium Chelate and Red Fluorescent Protein for Detection of Caspase-3 Activity. *Int J Mol Sci* **16**(7):16642-54.

63. Grune T, Klotz LO, Gieche J, Rudeck M & Sies H (2001) Protein oxidation and proteolysis by the nonradical oxidants singlet oxygen or peroxyxynitrite. *Free radical biology & medicine* **30**, 1243-53.

64. Guliaeva NV (2004) "Apoptotic" mechanisms in normal brain plasticity: caspase-3 and long-term potentiation. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* **54**(4):437-47.

65. Henderson BW, T.J. Dougherty (1992) How does photodynamic therapy work? *Photochem. Photobiol.* **55**:145–157.

66. Holler N, Zaru R., Micheau O., Thome M., Attinger A., Valitutti S., Bodmer J.L., Schneider P., Seed B., Tschopp J. (2000) Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat. Immunol.* **1**:489–495.

67. Hoogenboom JP, van Dijk, E.M., Hernando, J., van Hulst, N.F. and Garcia-Parajo, M.F. (2005) Power-law-distributed dark states are the main pathway for photobleaching of single organic molecules. *Phys. Rev. Lett.* **95**, 097401. – цитировано по Carpentier P., Sebastien V., Laurent B., Bourgeois D. (2009) Structural basis for the phototoxicity of the fluorescent protein KillerRed *FEBS, Letters* **583** 2839–2842

68. Huang Q, Li F, Liu X, Li W, Shi W, Liu FF, O'Sullivan B, He Z, Peng Y, Tan AC, Zhou L, Shen J, Han G, Wang XJ, Thorburn J, Thorburn A, Jimeno A, Raben D, Bedford JS, Li CY (2011) Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nat Med* **17**(7):860-6.

69. Huesmann GR, Clayton DF (2006) Dynamic role of postsynaptic caspase-3 and BIRC4 in zebra finch song-response habituation. *Neuron* **52**(6):1061-72

70. Jewhurst K, Levin M, McLaughlin KA (2014) Optogenetic Control of Apoptosis in Targeted Tissues of *Xenopus laevis* Embryos. *J Cell Death.* **7**:25-31.

71. Jin C & Reed JC. Yeast and apoptosis (2002) *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **3**:453-459

72. Juraver-Geslin HA, Durand BC (2015) Early development of the neural plate: new roles for apoptosis and for one of its main effectors caspase-3. *Genesis* **53**(2):203-24.

73. Kang HJ, Kim JH, Chung SJ (2015) Homogeneous detection of caspase-3 using intrinsic fluorescence resonance energy transfer (iFRET). *Biosens Bioelectron* **67**:413-8.

74. Keese M, Offtderinger M, Tischer C, Girod A, Lommerse PH, Yagublu V, Magdeburg R, Bastiaens PI (2007) Quantitative imaging of apoptosis commitment in colorectal tumor cells. *Differentiation* **75**(9):809-18.

75. Keese M, Yagublu V, Schwenke K, Post S, Bastiaens P (2010) Fluorescence lifetime imaging microscopy of chemotherapy-induced apoptosis resistance in a syngenic mouse tumor model. *Int J Cancer* **126**(1):104-13.

76. Kessel D, Antolovich M & Smith KM (2001) The role of the peripheral benzodiazepine receptor in the apoptotic response to photodynamic therapy. *Photochemistry and photobiology* **74**, 346-9

77. Kessel D, Luo Y, Deng Y & Chang CK (1997) The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochemistry and photobiology* **65**, 422-6.

78. Kessel D, Luo Y, Mathieu P & Reiners JJ (2000) Determinants of the apoptotic response to lysosomal photodamage. *Photochemistry and photobiology* **71**, 196-200.

79. Kessel D., Vicente M.G., Reiners J.J.(2006) Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy. *Lasers Surg. Med.* **38**:482–488.
80. Kirveliėne V, Sadauskaite A, Kadziauskas J, Sasnauskiene S & Juodka B (2003) Correlation of death modes of photosensitized cells with intracellular ATP concentration. *FEBS letters* **553**, 167-72.
81. Kobayashi J, Shidara H, Morisawa Y, Kawakami M, Tanahashi Y, Hotta K, Oka K (2013) A method for selective ablation of neurons in *C. elegans* using the phototoxic fluorescent protein, KillerRed. *Neurosci Lett.* **548**:261-4.
82. Kochuveedu ST, Kim DH. Surface plasmon resonance mediated photoluminescence properties of nanostructured multicomponent fluorophore systems (2014) *Nanoscale* **6**(10):4966-84
83. K hler M, Zaitsev SV, Zaitseva II, Leibiger B, Leibiger IB, Turunen M, Kapelioukh IL, Bakkman L, Appelskog IB, de Monvel JB, Imreh G, Berggren PO (2003) On-line monitoring of apoptosis in insulin-secreting cells. *Diabetes* **52**(12):2943-50.
84. Korzh V, Teh C, Kondrychyn I, Chudakov DM, Lukyanov S. (2011) Visualizing compound transgenic zebrafish in development: a tale of green fluorescent protein and KillerRed. *Zebrafish* **8**(1):23-9.
85. Kosaihira A, Ona T (2008) Rapid and quantitative method for evaluating the personal therapeutic potential of cancer drugs. *Anal Bioanal Chem* **391**(5):1889-97.
86. Kriska T, Korytowski W., Girotti A.W. (2005) Role of mitochondrial cardiolipin peroxidation in apoptotic photokilling of 5-aminolevulinatetreated tumor cells, *Arch. Biochem. Biophys.* **433**:435–446
87. Kulkarni A, Wilson DM 3rd (2008) The involvement of DNA-damage and -repair defects in neurological dysfunction. *Am J Hum Genet* **82**(3):539-66.
88. Kumaraswamy S, Bergstedt T, Shi X, Rininsland F, Kushon S, Xia W, Ley K, Achyuthan K, McBranch D, Whitten D (2004) Fluorescent-conjugated polymer superquenching facilitates highly sensitive detection of proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(20):7511-5.
89. Kuznetsova DS, Shirmanova MV, Dudenkova VV, Subochev PV, Turchin IV, Zagaynova EV, Lukyanov SA, Shakhov BE, Kamensky VA (2015) Photobleaching and phototoxicity of KillerRed in tumor spheroids induced by continuous wave and pulsed laser illumination. *J Biophotonics* **8**(11-12):952-60.
90. Lagadic-Gossmann D, Huc L, Lecreur V (2004) Alterations of intracellular pH homeostasis in apoptosis: origins and roles. *Cell Death Differ.* **11**(9):953-61
91. Lamkanfi M, Dixit VM (2014) Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* **157**(5):1013-22
92. Lan L, Nakajima S, Wei L, Sun L, Hsieh CL, Sobol RW, Bruchez M, Van Houten B, Yasui A, Levine AS (2014) Novel method for site-specific induction of oxidative DNA damage reveals differences in recruitment of repair proteins to heterochromatin and euchromatin. *Nucleic Acids Res.* **42**(4):2330-45.
93. Laplante P, Sirois I, Raymond MA, Kokta V, B liveau A, Prat A, Pshezhetsky AV, Hébert MJ (2010) Caspase-3-mediated secretion of connective tissue growth factor by apoptotic endothelial cells promotes fibrosis. *Cell Death Differ* **17**(2):291-303
94. Laurent M. Dejean, Sonia Martinez-Caballero, Kathleen W. Kinnally (2006) Is MAC the knife that cuts cytochrome c from mitochondria during apoptosis?. *Cell Death and Differentiation* **13**(8): 1387–5
95. Lee A., A.S. Mathuru, C. Teh, C. Kibat, V. Korzh, T.B. Penney, S. Jesuthasan, (2010) The habenula prevents helpless behavior in larval zebrafish, *Curr. Biol.* **20**:2211–2216

96. Lee H, Kim SA, Coakley S, Mugno P, Hammarlund M, Hilliard MA, Lu H. (2014-a) A multi-channel device for high-density target-selective stimulation and long-term monitoring of cells and subcellular features in *C. elegans*. *Lab Chip*. **14**(23):4513-22.
97. Lee HW, Singh TD, Lee SW, Ha JH, Rehemtulla A, Ahn BC, Jeon YH, Lee J (2014-b) Evaluation of therapeutic effects of natural killer (NK) cell-based immunotherapy in mice using in vivo apoptosis bioimaging with a caspase-3 sensor. *FASEB J* **28**(7):2932-41.
98. Li IT, Pham E, Truong K (2006) Protein biosensors based on the principle of fluorescence resonance energy transfer for monitoring cellular dynamics. *Biotechnol Lett* **28**:1971–82
99. Li J, Figueira SK, Vrazo AC, Binkowski BF, Butler BL, Tabata Y, Filipovich A, Jordan MB, Risma KA (2014) Real-time detection of CTL function reveals distinct patterns of caspase activation mediated by Fas versus granzyme B. *J Immunol* **193**(2):519-28.
100. Li Z, Jo J, Jia JM, Lo SC, Whitcomb DJ, Jiao S, Cho K, Sheng M (2010) Caspase-3 activation via mitochondria is required for long-term depression and AMPA receptor internalization. *Cell* **141**(5):859-71.
101. Liang L, Lu Y, Zhang R, Care A, Ortega TA, Deyev SM, Qian Y, Zvyagin AV (2017) Deep-penetrating photodynamic therapy with KillerRed mediated by upconversion nanoparticles. *Acta Biomater*. **51**:461-470
102. Liao ZX, Li YC, Lu HM, Sung HW (2014) A genetically-encoded KillerRed protein as an intrinsically generated photosensitizer for photodynamic therapy. *Biomaterials* **35**(1):500-8.
103. Liu X, Shi R, Zou D, Li Z, Liu X, Chen Y, Yang X, Zhou Y, Zheng D (2011) Positive selection vector using the KillerRed gene. *Anal Biochem* **412**(1):120-2.
104. Lockshin RA & Zakeri Z (2004) Apoptosis, autophagy, and more. *The international journal of biochemistry & cell biology* **36**, 2405-19.
105. Lukyanov KA, Serebrovskaya EO, Lukyanov S, Chudakov DM (2010) Fluorescent proteins as light-inducible photochemical partners. *Photochem Photobiol Sci*. **9**(10):1301-6.
106. Luo KQ, Yu VC, Pu Y, Chang DC (2001) Application of the fluorescence resonance energy transfer method for studying the dynamics of caspase-3 activation during UV-induced apoptosis in living HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* **283**(5):1054-60.
107. Madar I, Huang Y, Ravert H, Dalrymple SL, Davidson NE, Isaacs JT, Dannals RF, Frost JJ (2009) Detection and quantification of the evolution dynamics of apoptosis using the PET voltage sensor ¹⁸F-fluorobenzyl triphenyl phosphonium. *J Nucl Med* **50**(5):774-80.
108. Majno G & Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis (1995) An overview of cell death. *Am J Pathol*. **146**(1): 3–15.
109. Manns, J., M. Daubrawa, S. Driessen, F. Paasch, N. Hoffmann, A. Loffler, K. Lauber, A. Dieterle. 2011. Triggering of a novel intrinsic apoptosis pathway by the kinase inhibitor staurosporine: activation of caspase-9 in the absence of Apaf-1. *FASEB J*. **25**:3250-3261.
110. Matroule J.Y., Carthy C.M., Granville D.J., Jolois O., Hunt D.W., Piette J. (2001) Mechanism of colon cancer cell apoptosis mediated by pyropheophorbide—A methylester photosensitization. *Oncogene* **20**:4070–4084.
111. Matsuyama S, Llopis J, Deveraux QL, Tsien RY, Reed JC (2000) Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nat Cell Biol*.

2(6):318-25.

112. Midden WR & Dahl TA (1992) Biological inactivation by singlet oxygen: distinguishing O₂(¹Δg) and O₂(¹Σg⁺). *Biochimica et biophysica acta* **1117**, 216-22.
113. Miyamoto A, Miyauchi H, Kogure T, Miyawaki A, Michikawa T, Mikoshiba K (2015) Apoptosis induction-related cytosolic calcium responses revealed by the dual FRET imaging of calcium signals and caspase-3 activation in a single cell. *Biochem Biophys Res Commun* **460**(1):82-7
114. Moan J & Berg K (1991) The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochemistry and photobiology* **53**, 549-53.
115. Mohan S, Abdul AB, Abdelwahab SI, Al-Zubairi AS, Sukari MA, Abdullah R, Elhassan Taha MM, Ibrahim MY, Syam S.(2010) Typhonium flagelliforme induces apoptosis in CEMss cells via activation of caspase-9, PARP cleavage and cytochrome c release: its activation coupled with G0/G1 phase cell cycle arrest. *J Ethnopharmacol.* **131**(3):592-600.
116. Moor AC (2000) Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* **57**, 1-13
117. Mortusewicz O, Leonhardt H. (2007) XRCC1 and PCNA are loading platforms with distinct kinetic properties and different capacities to respond to multiple DNA lesions. *BMC Mol Biol.* **8**:81.
118. Mroz P, Yaroslavsky A, Kharkwal GB, Hamblin MR (2011) Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers* **3**(2), 2516-2539
119. Nordgren M, Wang B, Apanasets O, Brees C, Veldhoven PP, Fransen MJ (2012) Potential limitations in the use of KillerRed for fluorescence microscopy. *Microsc.* **245**(3):229-35.
120. Nuñez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N (1998) Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* **17**(25):3237-45
121. Oleinick NL & Evans HH (1998) The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms. *Radiation research* **150**:S146-56.
122. Oleinick NL, R.L. Morris, I. Belichenko (2002) The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem. Photobiol. Sci.* **1**:1–21
123. Ormo M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ (1996) Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein. *Science* **273**:1392-1395
124. Park K, Ahn J, Yi SY, Kim M, Chung BH (2008) SPR imaging-based monitoring of caspase-3 activation. *Biochem Biophys Res Commun* **368**(3):684-9.
125. Peter ME, Heufelder AE, Hengartner MO (1997) Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(24):12736-7.
126. Petrova NV, Luzhin AV, Serebrovskaya EO, Ryumina AP, Velichko AK, Razin SV, Kantidze OL (2016) Inducing cellular senescence in vitro by using genetically encoded photosensitizers. *Aging (Albany NY)* **8**(10):2449-2462.
127. Pletnev S, Gurskaya NG, Pletneva NV, Lukyanov KA, Chudakov DM, Martynov VI, Popov VO, Kovalchuk MV, Wlodawer A, Dauter Z, Pletnev V (2009) Structural basis for phototoxicity of the genetically encoded photosensitizer KillerRed. *J Biol Chem.* **284**(46):32028-39.
128. Pletneva NV, Pletnev VZ, Sarkisyan KS, Gorbachev DA, Egorov ES, Mishin AS, Lukyanov KA, Dauter Z, Pletnev S. (2015) Crystal Structure of Phototoxic Orange Fluorescent Proteins with a

Tryptophan-Based Chromophore. *PLoS One*. **10**(12):e0145740.

129. Pop C, Timmer J, Sperandio S, Salvesen GS (2006) The apoptosome activates caspase-9 by dimerization. *Molecular Cell* **22**(2): 269–75
130. Prasuhn DE, Feltz A, Blanco-Canosa JB, Susumu K, Stewart MH, Mei BC, Yakovlev AV, Loukov C, Mallet JM, Oheim M, Dawson PE, Medintz IL (2010) Quantum dot peptide biosensors for monitoring caspase 3 proteolysis and calcium ions. *ACS Nano* **4**(9):5487-97.
131. Rasola A & Bernardi P (2007) The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death* **12**, 815-33.
132. Rusanov AL, Ivashina TV, Vinokurov LM, Fiks II, Orlova AG, Turchin IV, Meerovich IG, Zherdeva VV, Savitsky AP (2010) Lifetime imaging of FRET between red fluorescent proteins. *J Biophotonics* **3**(12):774-83
133. Savitsky AP, Rusanov AL, Zherdeva VV, Gorodnicheva TV, Khrenova MG, Nemukhin AV (2012) FLIM-FRET Imaging of Caspase-3 Activity in Live Cells Using Pair of Red Fluorescent Proteins. *Theranostics* **2**(2): 215–226.
134. Schwartz L. M., Milligan C. E. (1996) Cold thoughts of death: The role of ICE proteases in neuronal cell death. *TINS* **19**:555-562.
135. Schweichel JU & Merker HJ (1973) The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* **7**: 253-66
136. Serebrovskaya EO, Edelweiss E.F., Stremovskiy O.A., Lukyanov K.A., Chudakov D.M., and Deyev S.M. (2009) Targeting cancer cells by using an antireceptor antibody-photosensitizer fusion protein. *PNAS* **23**:9221–9225
137. Serebrovskaya EO, Edelweiss EF, Stremovskiy OA, Lukyanov KA, Chudakov DM, Deyev SM (2009) Targeting cancer cells by using an antireceptor antibody-photosensitizer fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(23):9221-5.
138. Serebrovskaya EO, Gorodnicheva TV, Ermakova GV, Solovieva EA, Sharonov GV, Zagaynova EV, Chudakov DM, Lukyanov S, Zaraisky AG, Lukyanov KA (2011) Light-induced blockage of cell division with a chromatin-targeted phototoxic fluorescent protein. *Biochem J*. **435**(1):65-71.
139. Serebrovskaya EO, Ryumina AP, Boulina ME, Shirmanova MV, Zagaynova EV, Bogdanova EA, Lukyanov SA, Lukyanov KA (2014) Phototoxic effects of lysosome-associated genetically encoded photosensitizer KillerRed. *J Biomed Opt* **19**(7):071403.
140. Sha S, Jin H, Li X, Yang J, Ai R, Lu J (2012) Comparison of caspase-3 activation in tumor cells upon treatment of chemotherapeutic drugs using capillary electrophoresis. *Protein Cell* **3**(5):392-9.
141. Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N., Palmer, A. E., Tsien R.Y. (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol*. **22**(12):1567-72.
142. Shcherbakova DM, Baloban M, Emelyanov AV, Brenowitz M, Guo P, Verkhusha VV (2016) Bright monomeric near-infrared fluorescent proteins as tags and biosensors for multiscale imaging. *Nat Commun*. **7**:12405
143. Shcherbo D, Souslova EA, Goedhart J, Chepurnykh TV, Gaintzeva A, Shemiakina II, Gadella TW, Lukyanov S, Chudakov DM (2009) Practical and reliable FRET/FLIM pair of fluorescent

proteins. *BMC Biotechnol* **9**:24

144. Shi Y, Chen J, Weng C, Chen R, Zheng Y, Chen Q, Tang H (2003) Identification of the protein-protein contact site and interaction mode of human VDAC1 with Bcl-2 family proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **305**(4): 989–96
145. Shibuya T, Tsujimoto Y (2012) Deleterious effects of mitochondrial ROS generated by KillerRed photodynamic action in human cell lines and *C. elegans*. *J Photochem Photobiol B.* **117**:1-12.
146. Shirmanova M, Yuzhakova D, Snopova L, Perelman G, Serebrovskaya E, Lukyanov K, Turchin I, Subochev P, Lukyanov S, Kamensky V, Zagaynova E. (2015) Towards PDT with Genetically Encoded Photosensitizer KillerRed: A Comparison of Continuous and Pulsed Laser Regimens in an Animal Tumor Model. *PLoS One* **10**(12):e0144617.
147. Shirmanova MV, Serebrovskaya EO, Lukyanov KA, Snopova LB, Sirotkina MA, Prodanetz NN, Bugrova ML, Minakova EA, Turchin IV, Kamensky VA, Lukyanov SA, Zagaynova EV (2013) Phototoxic effects of fluorescent protein KillerRed on tumor cells in mice. *J Biophotonics* **6**(3):283-90.
148. Shu X., Lev-Ram V., Deerinck T.J., Qi Y., Ramko E.B., Davidson M.W., Jin Y., Ellisman M.H., Tsien RY (2011) A genetically encoded tag for correlated light and electron microscopy of intact cells, tissues, and organisms. *PLoS Biol.* **9**(4):e1001041
149. Slee EA, Adrain C, Martin SJ (2001) Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* **276**(10):7320-6.
150. Sleiman RJ, Stewart BW (2000) Early caspase activation in leukemic cells subject to etoposide-induced G2-M arrest: evidence of commitment to apoptosis rather than mitotic cell death. *Clin Cancer Res* **6**(9):3756-65
151. Stefflova K, Chen J, Marotta D, Li H, Zheng G (2006) Photodynamic therapy agent with a built-in apoptosis sensor for evaluating its own therapeutic outcome in situ. *J Med Chem* **49**(13):3850-6.
152. Stepanichev MY, Kudryashova IV, Yakovlev AA, Onufriev MV, Khaspekov LG, Lyzhin AA, Lazareva NA, Gulyaeva NV (2005) Central administration of a caspase inhibitor impairs shuttle-box performance in rats. *Neuroscience* **136**(2):579-91
153. Swanson RL, Morey NJ, Doetsch PW, Jinks-Robertson S (1999) Overlapping specificities of base excision repair, nucleotide excision repair, recombination, and translesion synthesis pathways for DNA base damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**(4):2929-35.
154. Tait SWG & Green DR (2010) Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**:621–632
155. Takehara K, Tazawa H, Okada N, Hashimoto Y, Kikuchi S, Kuroda S, Kishimoto H, Shirakawa Y, Narii N, Mizuguchi H, Urata Y, Kagawa S, Fujiwara T (2016) Targeted Photodynamic Virotherapy Armed with a Genetically Encoded Photosensitizer. *Mol Cancer Ther.* **15**(1):199-208
156. Takemoto K, Matsuda T, Sakai N, Fu D, Noda M, Uchiyama S, Kotera I, Arai Y, Horiuchi M, Fukui K, Ayabe T, Inagaki F, Suzuki H, Nagai T. (2013) SuperNova, a monomeric photosensitizing fluorescent protein for chromophore-assisted light inactivation. *Sci Rep* **3**:2629.
157. Tan R, Nakajima S, Wang Q, Sun H, Xue J, Wu J, Hellwig S, Zeng X, Yates NA, Smithgall TE, Lei M, Jiang Y, Levine AS, Su B, Lan L (2017-a) Nek7 Protects Telomeres from Oxidative DNA Damage by Phosphorylation and Stabilization of TRF1. *Mol Cell* **65**(5):818-831.e5.
158. Tan SY, Teh C, Ang CY, Li M, Li P, Korzh V, Zhao Y (2017-b) Responsive mesoporous silica

nanoparticles for sensing of hydrogen peroxide and simultaneous treatment toward heart failure. *Nanoscale* **9**(6):2253-2261.

159. Teh C, Chudakov DM, Poon K.L., Mamedov I.Z., Sek J.Y., Shidlovsky K., Lukyanov S., Korzh V., (2010) Optogenetic in vivo cell manipulation in KillerRed- expressing zebrafish transgenics, *BMC Dev. Biol.* **10**:110

160. Tian L, Ip Luo, Chang Luo (2007) A high throughput drug screen based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) for anticancer activity of compounds from herbal medicine. *Br J Pharmacol* **150**(3):321-34

161. To TL, Piggott BJ, Makhijani K, Yu D, Jan YN, Shu X (2015) Rationally designed fluorogenic protease reporter visualizes spatiotemporal dynamics of apoptosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**(11):3338-43.

162. To TL, Schepis A, Ruiz-González R, Zhang Q, Yu D, Dong Z, Coughlin SR, Shu X (2016) Rational Design of a GFP-Based Fluorogenic Caspase Reporter for Imaging Apoptosis In Vivo. *Cell Chem Biol.* **23**(7):875-82.

163. Trinité B, Chan CN, Lee CS, Levy DN (2015) HIV-1 Vpr- and Reverse Transcription-Induced Apoptosis in Resting Peripheral Blood CD4 T Cells and Protection by Common Gamma-Chain Cytokines. *J Virol* **90**(2):904-16.

164. Tseng SJ, Huang KY, Kempson IM, Kao SH, Liu MC, Yang SC, Liao ZX, Yang PC (2016) Remote Control of Light-Triggered Virotherapy. *ACS Nano* **10**(11):10339-10346

165. Tseng SJ, Liao ZX, Kao SH, Zeng YF, Huang KY, Li HJ, Yang CL, Deng YF, Huang CF, Yang SC, Yang PC, Kempson IM (2015) Highly specific in vivo gene delivery for p53-mediated apoptosis and genetic photodynamic therapies of tumour. *Nat Commun.* **6**:6456.

166. Ueda H, Fujita R, Yoshida A, Matsunaga H, Ueda M. Identification of prothymosin-alpha1, the necrosis-apoptosis switch molecule in cortical neuronal cultures (2007) *J Cell Biol.* **176**(6):853-62.

167. Uzdensky A, Lobanov A., Bibov M., Petin Y. (2007) Involvement of Ca²⁺- and cyclic adenosine monophosphate-mediated signaling pathways in photodynamic injury of isolated crayfish neuron and satellite glial cells. *J. Neurosci. Res.* **85**:860–870.

168. Vagner T, Mouravlev A, Young D (2015) A novel bicistronic sensor vector for detecting caspase-3 activation. *J Pharmacol Toxicol Methods* **72**:11-8.

169. Vanden Berghe T., Kalai M., Van L.G., Declercq W., Vandenabeele P. (2003) Disruption of HSP90 function reverts tumor necrosis factor-induced necrosis to apoptosis. *J. Biol. Chem.* **278**:5622–5629.

170. Varnes ME, Chiu SM, Xue LY & Oleinick NL (1999) Photodynamic therapy-induced apoptosis in lymphoma cells: translocation of cytochrome c causes inhibition of respiration as well as caspase activation. *Biochemical and biophysical research communications* **255**:673-9

171. Vegh RB, Bravaya KB, Bloch DA, Bommarius AS, Tolbert LM, Verkhovsky M, Krylov AI, Solntsev KM. (2014) Chromophore photoreduction in red fluorescent proteins is responsible for bleaching and phototoxicity. *J Phys Chem B.* **118**(17):4527-34.

172. Vegh RB; Solntsev KM; Kuimova MK; Cho S; Liang Y; Loo BLW; Tolbert LM; Bommarius AS (2011) Reactive oxygen species in photochemistry of the red fluorescent protein “Killer Red”. *Chem. Commun.* **47**:4887–4889

173. Waldeck W, Heidenreich E, Mueller G, Wiessler M, Tóth K, Braun K (2012) ROS-mediated

killing efficiency with visible light of bacteria carrying different red fluorochrome proteins. *J Photochem Photobiol B*. **109**:28-33.

174. Waldeck W, Mueller G, Wiessler M, Brom M, Tóth K, Braun K. (2009) Autofluorescent proteins as photosensitizer in eukaryotes. *Int J Med Sci*. **6**(6):365-73.

175. Wall DM and McCormick BA (2014) Bacterial secreted effectors and caspase-3 interactions *Cell Microbiol*. **16**(12): 1746–1756.

176. Walsh JG, Cullen SP, Sheridan C, Lüthi AU, Gerner C, Martin SJ (2008) Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(35):12815-9

177. Wang B, Van Veldhoven PP, Brees C, Rubio N, Nordgren M, Apanasets O, Kunze M, Baes M, Agostinis P, Fransen M (2013) Mitochondria are targets for peroxisome-derived oxidative stress in cultured mammalian cells. *Free Radic Biol Med*. **65**:882-94.

178. Wang H, Zhang Q, Chu X, Chen T, Ge J, Yu R (2011) Graphene oxide-peptide conjugate as an intracellular protease sensor for caspase-3 activation imaging in live cells. *Angew Chem Int Ed Engl* **50**(31):7065-9.

179. Wang P, Shi T, Ma D (2006) Cloning of a novel human caspase-9 splice variant containing only the CARD domain. *Life Sci* **79**(10):934-40.

180. Wang Y, Nartiss Y, Steipe B, McQuibban GA, Kim PK (2012) ROS-induced mitochondrial depolarization initiates PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial degradation by autophagy. *Autophagy* **8**(10):1462-76.

181. Weissleder R, Ntziachristos V (2003) Shedding light onto live molecular targets. *Nat Med* **9**(1):123-8.

182. Werner JM, Steinfelder HJ (2008) A microscopic technique to study kinetics and concentration-response of drug-induced caspase-3 activation on a single cell level. *J Pharmacol Toxicol Methods* **57**(2):131-7.

183. Williams DC, El B.R., Ramirez P.M., Coakley S., Kim S.A., Lee H., Wen Q., Samuel A., Lu H., Hilliard M.A., Hammarlund M. (2013) Rapid and permanent neuronal inactivation in vivo via subcellular generation of reactive oxygen with the use of KillerRed. *Cell Rep*. **5**(2):553-63

184. Wojtovich AP, Foster TH (2014) Optogenetic control of ROS production. *Redox Biol*. **2**:368-76.

185. Xie J Wang C, Virostko J, Manning HC, Pham W, Bauer J, Gore JC (2013) A novel reporter system for molecular imaging and high-throughput screening of anticancer drugs. *Chembiochem* **14**(12):1494-503.

186. Xu X, Gerard A L, Huang B C, Anderson D C, Payan D G, and Luo Y (1998) Detection of programmed cell death using fluorescence energy transfer. *Nucleic Acids Res* **26**(8): 2034–2035

187. Yan H, He L, Zhao W, Li J, Xiao Y, Yang R, Tan W (2014) Poly β -cyclodextrin/TPdye nanomicelle-based two-photon nanoprobe for caspase-3 activation imaging in live cells and tissues. *Anal Chem* **86**(22):11440-50.

188. Yan L, Kanada M, Zhang J, Okazaki S, Terakawa S (2015) Photodynamic Treatment of Tumor with Bacteria Expressing KillerRed. *PLoS One* **10**(7):e0131518.

189. Yokota T, Ikeda H, Inokuchi T, Sano K, Koji T (2000) Enhanced cell death in NR-S1 tumor by photodynamic therapy: possible involvement of Fas and Fas ligand system. *Lasers Surg. Med*. **26**:449–460

190. Yuan Y, Kwok RT, Tang BZ, Liu B (2014) Targeted theranostic platinum(IV) prodrug with a built-in aggregation-induced emission light-up apoptosis sensor for noninvasive early evaluation of its

therapeutic responses in situ. *J Am Chem Soc* **136**(6):2546-54.

191. Yuzhakova DV, Shirmanova MV, Serebrovskaya EO, Lukyanov KA, Druzhkova IN, Shakhov BE, Lukyanov SA, Zagaynova EV (2015) CT26 murine colon carcinoma expressing the red fluorescent protein KillerRed as a highly immunogenic tumor model. *J Biomed Opt.* **20**(8):88002.

192. Zappavigna S, Luce A, Vitale G, Merola N, Facchini S and Caraglia M (2013) Autophagic cell death: A new frontier in cancer research. *Advances in Bioscience and Biotechnology* **4**:250-262.

193. Zhang J, Wang X, Cui W, Wang W, Zhang H, Liu L, Zhang Z, Li Z, Ying G, Zhang N, Li B (2013) Visualization of caspase-3-like activity in cells using a genetically encoded fluorescent biosensor activated by protein cleavage. *Nat Commun.* **4**:2157

194. Zhao X, Wang D, Zhao Z, Xiao Y, Sengupta S, Xiao Y, Zhang R, Lauber K, Wesselborg S, Feng L, Rose TM, Shen Y, Zhang J, Prestwich G, Xu Y (2006) Caspase-3-dependent activation of calcium-independent phospholipase A2 enhances cell migration in non-apoptotic ovarian cancer cells. *J Biol Chem* **281**(39):29357-68

195. Zhao Y, Lei M, Wang Z, Qiao G, Yang T, Zhang J (2014) TCR-induced, PKC- θ -mediated NF- κ B activation is regulated by a caspase-8-caspase-9-caspase-3 cascade. *Biochem Biophys Res Commun* **450**(1):526-31.

196. Zhou S, Zheng T, Chen Y, Zhang J, Li L, Lu F, Zhu JJ (2014) Toward therapeutic effects evaluation of chronic myeloid leukemia drug: electrochemical platform for caspase-3 activity sensing. *Biosens Bioelectron* **61**:648-54.

197. Ziegelhoffer EC, Donohue TJ (2009) Bacterial responses to photo-oxidative stress. *Nat Rev Microbiol* **7**(12):856-63

198. Zondervan R, Kulzer, F., Kol'chenko, M.A. and Orrit, M. (2004) Photobleaching of rhodamine 6G in poly(vinyl alcohol) at the ensemble and single-molecule levels. *J. Phys. Chem. A* **108**, 1657–1665 – цитировано по Carpentier P., Sebastien V., Laurent B., Bourgeois D. (2009) Structural basis for the phototoxicity of the fluorescent protein KillerRed. *FEBS, Letters* **583** 2839–2842

Приложение

Полученные генно-инженерными методами конструкции (кодирующая часть)

mKate2-DEVD-iRFP (клонирован в плазмиды pQE-30, N1, pLVT):

```
atgagaggatcgcacaccatcaccatcacggatccatggtgagcagctgattaaggagaacatgcacatgaagctgtacatggagggcaccgtgaac
aaccaccactcaagtgcacatccgagggcgaaggcaagccctacgagggcaccagaccatgagaatcaaggcggcggagggcggccctctccc
ttcgccttcgacatcctggctaccagctcatgtacggcagcaaaaccttcaaccacaccagggcacccccgactctttaagcagtcctccccgag
ggcttcacatgggagagagtcaccacatacgaagacggggggcgtgctgaccgctaccaggacaccagcctccaggacggctgcctcatctacaacg
tcaagatcagaggggtgaactcccacccaacggccctgtgatgcagaagaaaactcggctgggagggcctccaccgagaccctgtaccccgtgac
ggcggcctggaaggcagagccgacatggccctgaagctcgtggcggggggccacctgatctgcaactgaagaccacatacagatccaagaacc
gctaagaacctcaagatgcccggcgtctactatgtggacagaagactggaaagaatcaaggaggccgacaagagacctacgtcagcagcacgagg
tggctgtggccagatactgcgacctccctagcaaacctggggcacagagagctcggtagcgaattcgggtggtctggttctgatgaagttgataagcttgg
ggttctggttctatggctagcatgactggtggacagcaaatgggtcgggatctgtacgacgatgacgataaggatccgagctcagatctatgacagaag
gatccgtcggcaggcagcctgacctctgacctgcgacgatgagccgatccatccccggcgtccatccaaccgcatggactgctgctcggcctcggc
ccgacatgacgatcgttggcggcagcgacaacctcccgaactaccggactggcgcgatcggcgcctgatcggccgctctcggccgatgtcttcgact
cgggagcgcacaaccgtctgacgatcgccttggccgagcccggggcggccgtcggagcaccgatcactgtcggcttcacgatgcgaaaggacgcag
gcttcatcggctcctggcagcagcctgatcagctcatcttctcagctcagcctccccagcgggacgtcggcagccgcagggcttctccggccgac
caacagcggccatccggcggcctgcaggccggcgaaccttggaaagcgcctgcgccggcggcggcgaagaggtgcggaagattaccggcttcgatc
ggtgatgatctatcgttcgctccgacttcagcggcgaagtatcgcagaggatcgggtgcgccgaggtcagtgcaaaactaggcctgactatcctgcc
tcaaccgtgccggcgcaggcccgtcggctctataccatcaaccgggtacggatattcccgatataattatcgccgggtcgggtcaccagacctca
atccggcaccggggcggccgattgatcttagcttcgcatcctgcgcagcgtctcggccgtccatctggaattcatcgcgaacataggcatgcacggc
gatgtcgtatcctgatttgcgcggcagcgcactgtggggattgatcgtttgccatcaccgaacgccgtactacgtcgtatcctgatggccgccaagcctgc
agctagtcgccaggttctggcctggcagatcggcgtgatggaagag
```

FP650-DEVD-iRFP (клонирован в плазмиды pQE-30, N1, pLVT):

```
atgagaggatcgcacaccatcaccatcacggatccatgggagaggatagcagctgatctccgagaacatgcacatgaaactgtacatggagggcacc
cgtgaacggccaccactcaagtgcacatccgagggcgaaggcaagccctacgagggcaccagaccgctaagatcaagtggtcggagggcggccc
tctccccttcgcttcgacatcctggctaccagcttcatgtacggcagcaaaaccttcaaccacaccagggcacccccgactctttaagcagtccttc
ctgagggcttcacatgggagaggatcaccacatacgaagacggggggcgtgctgaccgctaccaggacaccagcctccagaacggctgcctcatcta
caactcaagatcaacggggtgaactcccacccaacggccctgtgatgcagaagaaaactcggctgggagggcagcaccgagatgctgtacccc
ctgacagcggcctgagagggccatagtcagatggccctgaagctcgtggcgggggctacctgactgctccctcaagaccacatacagatccaagaaa
cccgctaagaacctcaagatgcccggcttacttctgtgacaggaactggaaagaatcaaggaggccgacaagagacctacgtcagcagcacg
agatggctgtggccaggtactgcgacctgcctagcaaacctggggcacagcagctcggtagcgaattcgggtggtctggttctgatgaagttgataagctt
ggtggttctggttctatggctagcatgactggtggacagcaaatgggtcgggatctgtacgacgatgacgataaggatccgagctcagatctatgacag
aaggatccgtcggcaggcagcctgacctctgacctgcgacgatgagccgatccatccccggcgtccatccaaccgcatggactgctgctcggcctc
ccggccgacatgacgatcgttggcggcagcgacaacctcccgaactaccggactggcgcgatcggcgcctgatcggccgctctcggccgatgtcttc
gactcggagacgcacaaccgtctgacgatcgccttggccgagcccggggcggccgtcggagcaccgatcactgtcggcttcacgatgcgaaaggac
gcaggcttcatcggctcctggcagcagcctgatcagctcatcttctcagctcagcctccccagcgggacgtcggcagccgcagggcttctccggc
gcaccaacagcggccatccggcggcctgcaggccggcgaaccttggaaagcgcctgcgccggcggcggcgaagaggtgcggaagattaccggcttcg
atcgggtgatgatctatcgttcgctccgacttcagcggcgaagtatcgcagaggatcgggtgcgccgaggtcagtgcaaaactaggcctgactatcc
tgctcaaccgtgccggcgcagggcccgtcggctctataccatcaaccgggtacggatattcccgatataattatcgccgggtcgggtcaccagac
ctcaatccggtcaccggggcggccgattgatcttagcttcgcatcctgcgcagcgtctcggccgtccatctggaattcatcgcgaacataggcatgcacgg
cacgatgtcgtatcctgatttgcgcggcagcgcactgtggggattgatcgtttgccatcaccgaacgccgtactacgtcgtatcctgatggccgccaagcct
gcgagctagtcgccaggttctggcctggcagatcggcgtgatggaagag
```

FP670-DEVD-iRFP (клонирован в плазмиды pQE-30, N1):

atgagaggatcgcaccatcaccatcacggatccatgggagaggatagcgagctgatctccgagaacatgcacacgaaactgtacatggaggggcac
cgtgaacggccaccacttcaagtgcacatccgagggcgaaggcaagccctacgagggcaccagacctgtaagatcaagggtgctcagggcggccc
tctccccttcgcttcgacatcctggctaccagcttcatgtacggcagcaaaactttatcaaccacaccaggggcatccccgacttctttaagcagtcctcc
ctgagggcttcacatgggagaggatcaccacatacgaagacggggcgtgctgaccgctaccaggacaccagcctcagaacggctgcctcatcta
caactgcaagatcaacggggtgaacttcccatacgaacggccctgtgatgcagaagaaaactcggctgggagggccaacaccgagatgctgtaccccg
ctgacagcggctctgagaggccataatcagatggccctgaagctcgtgggcgggggctacctgactgctcccctcaagaccacatacagatccaagaaa
cccgctaagaacctcaagatgcccggcttctacttcgtggaccgtaaactggaaagaatcaaggaggccgacaaaagagacctacgtcagcagcacga
gatggctgtggccaggtactgcgacctgcctagcaactggggcacagcgagctcggctaccgaattcggctggttctggttctgatgaagtgataagctg
gtggttctggttctatggctagcatgactggtggacagcaaatgggtcgggatctgtacgacgatgacgataaggatccgagctcagatctatgacagaa
ggatccgtcggcaggcagcctgaccttgcacctgcgacgatgagccgatccatccccgggtccatccaaccgcatggactgctgctcgcctcggc
ggcagatgacgatcgttggcggcagcgacaaccttcccgaactcaccggactggcgatcggcgccctgatcggcgctctcggcgccgatgtcttga
ctcggagacgcacaaccgtctgacgatcgccttggccgagcccggggcggcctcggagcaccgatcactgctggcttccagatgcaaaaggacgca
ggcttcatcggctcctggcatcgccatgatcagctcatcttctcagctcagcctccccagcgggacgtcggcagccgacggcgttcttccggcga
ccaacagcggcatccggcctgcaggccggcgaaccttggaaagcctgcggccggcgcaagaggtgagggaagattaccggcttcgac
gggtgatgatctatcgttccctccgacttaccggcgaagtgatcgcagaggatcgggtgcggcaggtcagtgcaaaactaggcctgcaatctctgc
ctcaaccgtgcccggcgaggcccgctggctctatacctcaaccggctacggatcattcccgatataattatcggccgggtcggcgtcaccacagacctc
aatccggcaccggcggcggcattgatcttagcttcgcatcctgcgcagcgtctcggcgtccatctggaattcatgcgaacataggcatgcacggca
cgatgctgatctcgatttgcggcgagcgactgtggggattgatcgttgcacaccgaacggcgtactacgtcgtatctcgatggccgcaagcctgc
gagctagtcggcagggttctggcctggcagatcggcgtgatggaagag

KillerOrange-мем (клонирован в плазмиду N1):

atgctgtgctgtatgagaagaaccaaacagggtgaaaagaatgatgaggacaaaagatctccgagtgccggccccgcctgttccagagcgacatgacc
tcaaaatcttcatcgacggcgagggtgaacggccagaagttcaccatcgtggccgacggcagcagcaagttccccacggcgacttcaactgacgc
cgtgtgcgagaccggcaagctgcccagctgagctggaagcccacttgcacactgatccagtgggggcagcccttcttcgcccgtaccacggcgcacatca
gccatttcgcccaggagtgttccccgagggcctgagcatcgaccgaccgtgcgcttcgagaacgacggcaccatgaccagccaccacactacga
gctgagcgacacctgctggtgagccgcatcaccgtgaactgcgacggcttccagcccagcggccccatcatgcgagaccagctggtggacatcctgc
ccagcgagaccacatgttccccacggccccaacgctgcgaccgctggccttcatcggcttaccaccgcccagcggcggcctgatgatgggcca
cctcgacagcaagatgacctcaacggcagccgcccacatcgatccccggccacacttctgacctatcaccgaagcagatgaggggacaccagc
gacaagcgcgaccacgtgtgcccagcgcgaggtggccacgcccacagcgtgccccgcatcaccagcggcctcggtagcgaccaggat

KillerOrange-dMito (клонирован в плазмиду N1):

atgtccgtcctgacggcgtgctgctcggggcttgacaggctcggcccggcggctcccagtcccgcgcgccaagatccattcgttgggggatctgtcc
gtcctgacggcgtgctgctcggggcttgacaggctcggcccggcggctcccagtcccgcgcgccaagatccattcgttgggggatccaccggtcgc
cacctccgagtgccggccccgcctgttccagagcgacatgacctcaaaatcttcatcgacggcgaggtgaacggccagaagttcaccatcgtggccga
cggcagcagcaagttccccacggcgacttcaactgacgcccgtgtgcgagaccggcaagctgcccagctgagctggaagcccacttgcacactgatcc
agtggggcgagcccttcttcgcccgtaccacggcagcagcatttcccaggagtgttccccgagggcctgagcatcgaccgaccgtgcgc
ttcgagaacgacggccatgaccagccaccacactacgagctgagcgacacctgctggtgagccgcatcaccgtgaactgcgacggcttccagc
ccgacggccccatcatgcgagaccagctggtggacatcctcccagcgagaccacatgttccccacggccccaacgcccgtgcgaccgctggcctt
catcggcttaccaccgcccagcggcggcctgatgatgggcccactcgacagcaagatgacctcaacggcagccgcccacatcgatccccggccca
cacttctgacctatcaccgaagcagatgagggacaccagcgacaagcgcgaccacgtgtgcccagcgcgaggtggccccacggccacagcgtgccc
cgcatcaccagcggcctcggtagcgaccaggat

SuperNova-мем (клонирован в плазмиду N1):

Atgctgtgctgtatgagaagaaccaaacaggttgaagaatgatgaggaccaaaagatctcagaggtcggccccgccctgtccagagcgacatgac
cttcaaatcttcatcgacggcgaggtgaacggccagaagttcacctcgtggccgacggcagcagcaagttccccacggcgacttcaacgtgcacg
ccgtgtgcgagaccggcaagctgccatgagctggaagccatctgccacctgatccagtacggcgagcccttcttcgccgctaccccgacggcatc
agccatttcgccagagtgcttccccgagggcctgagcatcgaccgacccgtgccttcgagaacgacggcaccatgaccagccaccacactacg
agctggacgacacctgcgtggtgagccgcatcaccgtgaactgcgacggcttccagcccgacggccccatcatgcgcgaccagctggtggacatcctg
cccagcgagaccacatgttccccacggccccaacgccgtgcgcagaccgccaccatcggcttaccaccgccgacggcgcaagatgatgggc
cacttcgacagcaagatgacctcaacggcagccgcgcatcgagatccccggccccacacttcgtgaccatcatccaagcagacgaggggacactag
cgacaagcgcgaccacgtgtgccagcgcgaggtggcctacgccacagcgtgccccgcatcaccagcgccatcggtagcgacgaggat

SuperNova-dMito (клонирован в плазмиду N1):

atgtccgtcctgacgccgctgctgctcggggcttgacaggctcggccccggcggtcccagtgccgcgcgccaagatccattcgttgggggatctgtcc
gtcctgacgccgctgctgctgcggggcttgacaggctcggccccggcggtcccagtgccgcgcgccaagatccattcgttgggggatccaccggtcgc
cacctcagaggtcggccccgccctgttccagagcgacatgacctcaaaatcttcatcgacggcgaggtgaacggccagaagttcacctcgtggccga
cggcagcagcaagttccccacggcgacttcaactgacgccgtgtgcgagaccggcaagctgccatgagctggaagccatctgccacctgatcc
agtacggcgagcccttcttcgccgctaccccgacggcatcagccatttcgccaggagtgttccccgagggcctgagcatcgaccgaccgtgcgct
tcgagaacgacggcaccatgaccagccaccacactacgagctggacgacacctgcgtggtgagccgcatcaccgtgaactgcgacggcttccagcc
cgacggccccatcatgcgcgaccagctggtggacatcctgccagcgagaccacatgttccccacggccccaacgccgtgcgccagaccgccac
catcgcttaccaccgccgacggcggaagatgatgggcccacttcgacagcaagatgacctcaacggcagccgcgccatcgagatccccggcccc
cacttcgtgaccatcatccaagcagacgaggggacactagcgacaagcgcgaccacgtgtgccagcgcgaggtggcctacgccacagcgtgccc
cgcatcaccagcgccatcggtagcgacgaggat

SuperNova-2-мем (клонирован в плазмиду N1):

atgctgtgctgtatgagaagaaccaaacaggttgaagaatgatgaggaccaaaagatctcagaggtcggccccgccctgttccagagagacatgacc
tcaaatcttcatcgacggcgaggtgaacggccagaagttcacctcgtggccgacggcagcagcaagttccccacggcgacttcaactgacgc
cgtgtgcgagaccggcaagctgccatgagctggaagccatctgccacctgatccagtacggcgagcccttcttcgccgctaccccgacggcatca
gccatttcgccaggagtgttccccgagggcctgagcatcgaccgaccgtgcgcttcgagaacgacggcaccatgaccagccaccacactacga
gctggacgacacctgcgtggtgagccgcatcaccgtgaactgcgacggcttccagcccgacggccccatcatgcgcgaccagctggtggacatcctgc
ccagcgagaccacatgttccccacggccccaacgccgtgcgcgaccagccaccatcggcttaccaccgccgacggcggaagatgatgggccc
acttcgacagcaagatgacctcaacggcagccgcgccatcgagatccccggccccacacttcgtgaccatcatccaagcagacgaggggacactagc
gacaagcgcgaccacgtgtgccagcgcgaggtggcctacgccacagcgtgccccgcatcaccagcgccatcggtagcgacgaggat

SuperNova-2-dMito (клонирован в плазмиду N1):

atgtccgtcctgacgccgctgctgctcggggcttgacaggctcggccccggcggtcccagtgccgcgcgccaagatccattcgttgggggatctgtcc
gtcctgacgccgctgctgctgcggggcttgacaggctcggccccggcggtcccagtgccgcgcgccaagatccattcgttgggggatccaccggtcgc
cacctcagaggtcggccccgccctgttccagagagacatgacctcaaaatcttcatcgacggcgaggtgaacggccagaagttcacctcgtggccga
cggcagcagcaagttccccacggcgacttcaactgacgccgtgtgcgagaccggcaagctgccatgagctggaagccatctgccacctgatcc
agtacggcgagcccttcttcgccgctaccccgacggcatcagccatttcgccaggagtgttccccgagggcctgagcatcgaccgaccgtgcgct
tcgagaacgacggcaccatgaccagccaccacactacgagctggacgacacctgcgtggtgagccgcatcaccgtgaactgcgacggcttccagcc
cgacggccccatcatgcgcgaccagctggtggacatcctgccagcgagaccacatgttccccacggccccaacgccgtgcgccagaccgccac
catcgcttaccaccgccgacggcggaagatgatgggcccacttcgacagcaagatgacctcaacggcagccgcgccatcgagatccccggcccc
cacttcgtgaccatcatccaagcagacgaggggacactagcgacaagcgcgaccacgtgtgccagcgcgaggtggcctacgccacagcgtgccc
cgcatcaccagcgccatcggtagcgacgaggat