

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В. ЛОМОНСОВА

На правах рукописи



Соловьев Илья Дмитриевич

**ПОЛУЧЕНИЕ МОНОМЕРНОЙ ФОРМЫ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА
SAASoti И ПРИМЕНЕНИЕ ЕГО В МЕТОДАХ СУБДИФРАКЦИОННОЙ И
ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ КОРРЕЛЯЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ**

03.01.04 Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

МОСКВА – 2019

Работа выполнена на кафедре химической энзимологии химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» и в лаборатории физической биохимии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

Научный руководитель: **Савицкий Александр Павлович**
доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Кузьмин Владимир Александрович**, доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией процессов фотосенсибилизации, Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук

Белоусов Всеволод Вадимович, доктор биологических наук, профессор РАН, заведующий лабораторией редокс-регуляции, НИИ Трансляционной медицины "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Смирнов Иван Витальевич, доктор химических наук, главный научный сотрудник, заместитель директора по науке, заведующий лабораторией химии протеолитических ферментов, Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Защита диссертации состоится **«03» декабря 2019 года в 15 часов** на заседании диссертационного совета МГУ.02.08 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 11, ауд. 202.

E-mail: d50100159@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА» <https://istina.msu.ru/dissertations/245080362/>

Автореферат разослан «01» ноября 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат химических наук

И.К. Сакодынская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и разработанность темы исследования. Открытие флуоресцентных белков предоставило новые возможности для развития биологических исследований. От открытия первого флуоресцентного белка из медузы *Aequorea victoria* в 1960-х гг. и до получения последовательности аминокислотных остатков и первого применения в живых организмах в начале 1990-х гг. прошло 30 лет. В следующие 20 лет происходит интенсивное развитие исследований свойств флуоресцентных белков и применение их в качестве генетически кодируемой флуоресцентной метки для наблюдения за живыми организмами. Имеющаяся у некоторых белков способность менять свои спектральные и флуоресцентные свойства под действием облучающего света привела к появлению методов микроскопии, позволяющих преодолеть дифракционный предел разрешения и наблюдать тонкие молекулярные структуры внутри живых клеток. На данный момент ведутся активные поиски новых генов и получение новых мутантных форм флуоресцентных белков, имеющих улучшенные характеристики яркости и фотостабильности и способных быстрее и эффективнее претерпевать фотопревращения для применения в различных методах флуоресцентной микроскопии.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы являлось получение мономерной формы флуоресцентного белка SAASoti и характеристика его физико-химических свойств для последующего применения в качестве уникального инструмента в методах супер-разрешающей флуоресцентной микроскопии. Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

- анализ и модификация интерфейсов взаимодействия внутри тетрамера методами генной инженерии;
- оценка скоростей необратимой фотоконверсии и обратимого фотопереключения и сравнение с известными флуоресцентными белками;
- получение субдифракционного изображения с использованием SAASoti в качестве флуоресцентной метки;
- применение SAASoti в качестве донора флуоресценции в составе FRET-пары сенсора каспазы-3 для проведения *in vivo* измерений методом флуоресцентной корреляционной спектроскопии.

Научная новизна и теоретическая значимость работы. Объектом исследования является флуоресцентный белок SAASoti, выделенный впервые сотрудниками лаборатории физической биохимии (Институт биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН) из коралла

Stylocoeniella armata, найденного в лагуне острова Оти Большого Барьерного рифа в Австралии на глубине порядка 10 метров, как фотоконвертируемый флуоресцентный белок. По скорости фотоконверсии SAASot1 превосходит некоторые известные фотоконвертируемые флуоресцентные белки, что делает его конкурентоспособным для применения в методах субдифракционной микроскопии. Дикий тип белка SAASot1 существует в виде тетрамеров, склонных к образованию агрегатов большей молекулярной массы, что затрудняет его использование в качестве флуоресцентной метки. Поэтому отдельная часть работы была посвящена получению вариантов белка SAASot1, в которых были произведены замены аминокислотных остатков в интерфейсах взаимодействия для получения его в мономерной форме. В ходе данного исследования впервые было обнаружено свойство обратимого фотопереключения (перехода из зеленой флуоресцентной формы в темную под действием света $\lambda=470$ нм), что делает SAASot1 уникальным из описанных к настоящему времени флуоресцентных белков, бифотохромным флуоресцентным белком, так как оба эти свойства изначально присутствуют в белке дикого типа, в то время как остальные бифотохромные белки были получены путем замены аминокислотных остатков в микроокружении хромофора. Таким образом, SAASot1 не вписывается в общепринятые положения о возможных механизмах фотопревращений и требует отдельного изучения. В этой связи в данной работе подробно изучались его фотохимические свойства.

Практическая значимость работы

Разработка флуоресцентной метки, которая характеризуется улучшенными кинетическими параметрами фотопревращений, ведет к увеличению скорости регистрации изображений и, как следствие, к использованию меньших доз облучающего и иногда токсичного света при работе с живыми объектами. Обладая уникальной способностью к двум видам фотопревращений (необратимой фотоконверсии из зеленой в красную форму и обратимому фотопереключению из флуоресцентной в темную форму), SAASot1 имеет высокую практическую значимость для использования в субдифракционных методах флуоресцентной микроскопии. Данные методы представляют собой уникальные научные инструменты и способствуют развитию фундаментальных исследований биологических процессов.

Положения, выносимые на защиту

1. Замена аминокислотных остатков лизина (K145) в зарядовом интерфейсе приводит к получению стабильных тетрамеров, в то время как замена V127T в

гидрофобном интерфейсе – к получению мономерной формы флуоресцентного белка SAASoti.

2. SAASoti превосходит коммерчески доступный фотоконвертируемый флуоресцентный белок Dendra2 по скорости фотоконверсии.
3. SAASoti обладает свойством обратимого фотопереключения из флуоресцентного состояния в темное для зеленой формы и частичного фотопереключения для красной формы. Аминокислотный остаток M164 подвергается окислению при длительном облучении светом $\lambda=470$ нм.
4. SAASoti применим в качестве флуоресцентной метки для метода фотоактивационной локализационной микроскопии (PALM).
5. Флуоресцентный сенсор SAASoti-23-KFP на основе FRET-пары, содержащий флуоресцентный белок V127T SAASoti в качестве донора и флуоресцентный белок KFP в качестве акцептора флуоресценции, соединенные линкером, содержащим аминокислотную последовательность –DEVVD–, позволяет детектировать активацию каспазы-3 при апоптозе в клетках млекопитающих.
6. SAASoti в составе сенсора SAASoti-23-KFP является инструментом для одновременного измерения вязкости и ферментативной активности методом флуоресцентной корреляционной спектроскопии.

Личный вклад автора. Представленные в диссертационной работе экспериментальные данные получены лично автором или при его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование, выполнение экспериментов, сбор и обработку данных, оформление и публикацию результатов.

Степень достоверности. Представленные в данной работе результаты получены с использованием современных физико-химических методов и статистической оценки погрешности результатов.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения эксперимента, выводов, списка используемой литературы. Текст изложен на 106 страницах и включает 41 рисунок, 8 таблиц и 2 приложения. Список литературы содержит 112 ссылок.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены в виде тезисов и докладов на следующих всероссийских и международных конференциях: ADFLIM (Сочи, Октябрь 2016 г.), Saratov Fall Meeting (Саратов, Октябрь 2017 г.), Ломоносов-2018 (Москва, Апрель 2018 г.), Biocatalysis-2019 (Санкт-Петербург, Июнь 2019 г.), Topical Problems of Biophotonics (Нижний Новгород, Июль 2019 г.).

Публикации

По результатам данной работы было опубликовано 4 статьи в журналах, которые индексируются в Web of Science, Scopus и РИНЦ, а также 6 тезисов на международных конференциях.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

Основные сокращения и названия белков, упоминающиеся в работе

Флуоресцентные белки (максимальная длина волны возбуждения/эмиссии, нм):

DendFP – фотоконвертируемый *зеленый* (492/508) - *красный*(557/575)

Dendra2 – усовершенствованная версия *DendFP*

Dronpa – фотопереключаемый *зеленый* (503/518) *флуоресцирующий-темный*

DsRed – *красный* (558/583)

EosFP – фотоконвертируемый *зеленый* (506/516) - *красный*(571/581)

IrisFP – бифотохромный флуоресцентный белок (фотоконвертируемый *зеленый* (488/516) - *красный* (551/580) и фотопереключаемый *флуоресцирующий-темный*), производное *EosFP*

eGFP – *зеленый*(488/507)

Kaede – фотоконвертируемый *зеленый* (508/518) – *красный* (572/580);

KFP – фотопереключаемый *красный* (580/600) *темный-флуоресцирующий*

SAASoti – бифотохромный флуоресцентный белок (фотоконвертируемый *зеленый* (509/519) - *красный* (573/579) и фотопереключаемый *флуоресцирующий-темный*

mTFP0.7 – фотопереключаемый *синий* (453/488) *флуоресцирующий-темный*.

Сокращения:

FRET – Fluorescence Resonance Energy Transfer, флуоресцентный резонансный перенос энергии

MALDI, TOF – matrix-assisted laser desorption/ionization, time of flight. Масс-спектрометрический анализ матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с времяпролетным детектором

PALM – PhotoActivated Localisation Microscopy, фото-активационная локализационная микроскопия

TIRF – Total Internal Reflection Fluorescence метод возбуждения флуоресценции при полном внутреннем отражении пучка возбуждающего света.

Обзор литературы (Глава 1) состоит из двух частей и посвящен: 1) получению мономерных форм флуоресцентных белков для успешного использования в качестве флуоресцентных маркеров; 2) фототрансформируемым (фотоактивация, фотоконверсия, фотопереклучение) флуоресцентным белкам и их применению в методах супер-разрешающей микроскопии.

Методическая часть представлена в Главе 2 диссертационной работы. Подробно описаны методики наработки, выделения и очистки хроматографическими методами мутантных форм рекомбинантного белка SAASoti, проведение аналитической гель-фильтрации для определения олигомерного состояния, протоколы фотохимических и фотофизических превращений (необратимая фотоконверсия, обратимое фотопереклучение). В работе

изложены используемый для подтверждения олигомерного состояния выбранных мутантных форм метод двухфокусной флуоресцентной корреляционной микроскопии (ФКК), фотоактивационной локализационной микроскопии (PALM), флуоресцентной корреляционной спектроскопии для измерений вязкости и ферментативных реакций в эукариотических клетках *in vivo*.

Результаты и обсуждение представлены в Главе 3 диссертационной работы.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Анализ олигомерного состояния и поверхностных аминокислотных остатков флуоресцентного белка SAASoti

На основании известной структуры фотоконвертируемого флуоресцентного белка Kaede (код PDB: 2GW3) была создана 3D-модель тетрамерной структуры SAASoti (Рис. 1). Аминокислотные остатки белка Kaede были заменены на соответствующие в белке SAASoti с помощью *Mutate Residue module* в пакете программ VMD. Рекombинантный белок дикого типа SAASoti был экспрессирован в клетках BL21 (DE3) *E. coli* и очищен хроматографическими методами. Анализ олигомерного состояния дикого типа SAASoti методом гель-фильтрации выявил, что в растворе он находится преимущественно в тетрамерной форме, склонной к образованию агрегатов еще большей молекулярной массы. В флуоресцентных белках различают два типа интерфейсов взаимодействия между субъединицами тетрамера – зарядовый АВ и гидрофобный АС (Рис. 1). Согласно данным 3D-модели, в структуре SAASoti имеются два аминокислотных остатка цистеина (C21 и C117), находящихся на поверхности. Добавление восстанавливающего агента дитиотреитола не влияет на образование тетрамеров, а также агрегатов большей массы, что говорит о природе взаимодействий между субъединицами, не связанной с образованием дисульфидных мостиков.

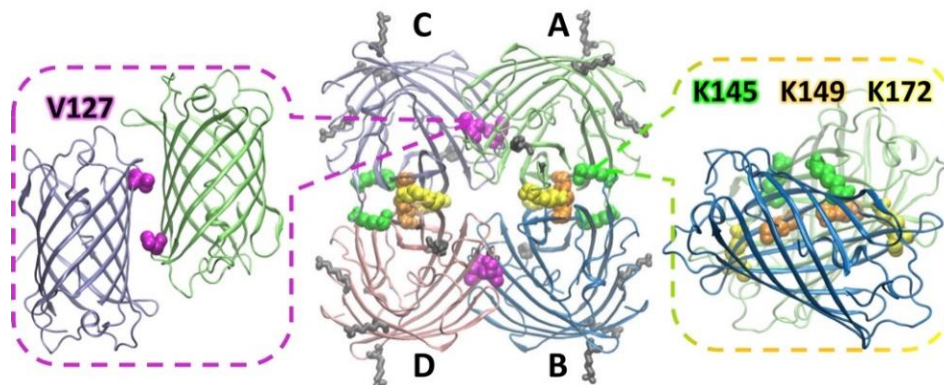


Рисунок 1. Структура тетрамера SAASoti, полученная на основе модели Kaede PDB: 2GW3, и ключевые поверхностные а.о. подвергшиеся замене.

При анализе компьютерной 3D-модели SAASoti (Рис. 1) было обнаружено, что на поверхности SAASoti содержится значительное количество аминокислотных остатков лизина, которые, возможно, способствуют его олигомеризации, образуя солевые мостики в зарядовом интерфейсе. Проверить данное предположение было решено методом химической модификации доступных аминогрупп лизина янтарным ангидридом – сукцинилизацией, что приводит к маскированию положительного заряда и нарушению контактов с соседними субъединицами и белок-белковых взаимодействий. После обработки образца дикого типа SAASoti янтарным ангидридом в молярном соотношении 1:20 во время гель-фильтрации наблюдали полное исчезновение хроматографических пиков, соответствующих массам 247 кДа (октамер) и 104 кДа (тетрамер), и появление мономерной формы (22 кДа).

Для определения аминокислотных остатков лизина, чьи ε-аминогруппы подверглись химической модификации, мономерная фракция после гель-фильтрации была подвергнута трипсинолизу и проанализирована методом MALDI-TOF/TOF масс-спектрометрии. Трипсин катализирует расщепление пептидной цепи после остатков лизина и аргинина, однако в случае химической модификации боковой аминогруппы лизина разрыв пептидной цепи невозможен и наблюдается увеличение массы пептида на 100,7 Да.

Методом MALDI было идентифицировано 29 масс-пиков в итоговой смеси триптических пептидов. Также были идентифицированы пептиды, содержащие один или несколько модифицированных аминокислотных остатков лизина. Так, химической модификации янтарным ангидридом подвергаются остатки: K36, K41, K112, K139, K145, K149, K172 (Рис. 2). Согласно сконструированной модели тетрамера SAASoti, аминокислотные остатки K145, K149 и K172 расположены в зарядовом интерфейсе (Рис. 1), поэтому их модификация и последующая смена заряда с отрицательного на положительный могла повлиять на олигомерное состояние белка.

1	10	20	30	40	50
MALSKQYIPD	DMELIFHMDG	CVNGHYFTIV	ATGKAKPYEG	KQNLKATVTK	GAPLPFSTDI
60	70	80	90	100	110
LSTVMHYGNR	CIVHYPPGIP	DYFKQSFPEG	YSWERTFAFE	DGGFCTVSAD	IKLKDNCFIH
120	130	140	150	160	170
TSMFHGVNFP	ADGPVMQRKT	IQWEKSIKEM	TVSDGIVKGD	ITMFLLEGG	GKRYRCQFHTS
180	190	200	210	220	
YKAKKVVEMP	QSHYVEHSIE	RTNDDGTQFE	LNEHAVARLN	EI	

Рисунок 2. Аминокислотная последовательность белка SAASoti. Пептиды, идентифицированные методом MALDI TOF/TOF, выделены серым цветом. Аминокислотные остатки лизина, подверженные химической модификации янтарным ангидридом, выделены красным, немодифицированные – синим и зеленым, неидентифицированные – желтым.

Сайт-направленный мутагенез для получения мономерной формы SAASoti

Для разрушения контактов между субъединицами тетрамера внутри сильно заряженного интерфейса на первом этапе применяли метод точечной замены аминокислотных остатков лизина. Были получены мутантные формы SAASoti, содержащие следующие точечные замены: K145N, K145E, K149E, K149N и K172N. Данные формы SAASoti были выделены, очищены и проанализированы методами гель-фильтрации (Рис. 3) и двухфокусной флуоресцентной корреляционной спектроскопии. Среди полученных форм SAASoti только одна – K172N – осталась склонной к агрегированию, в то время как остальные белки стали тетрамерами.

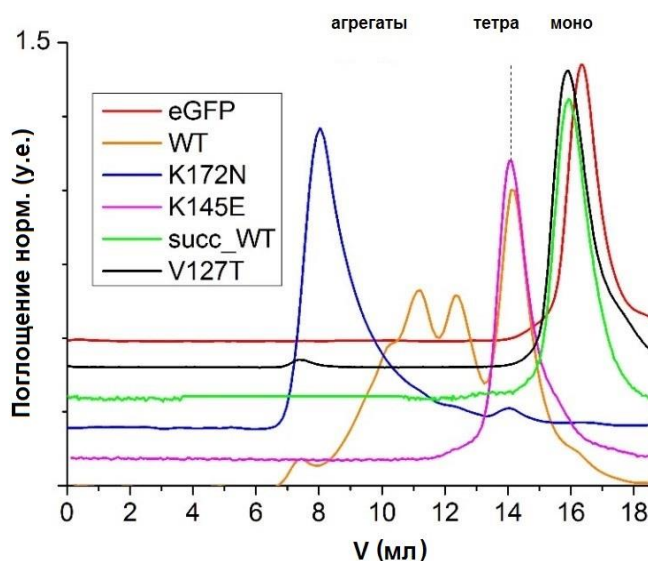


Рисунок 3. Гель-фильтрация образцов SAASoti с заменами в зарядовом интерфейсе. Носитель Superdex 200 10/300 GL, буфер 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4. Детекция по поглощению при $\lambda=509$ нм.

Введение единичных замен аминокислотных остатков в зарядовом интерфейсе АВ не привело к получению мономерной формы флуоресцентного белка SAASoti, поэтому для замены были выбраны аминокислотные остатки в гидрофобном АС-интерфейсе. Выравнивание первичной и третичной структур с фотоконвертируемыми флуоресцентными белками, которые ранее были успешно получены в мономерном состоянии (DendFP, DsRed, EosFP), выявило два наиболее перспективных аминокислотных остатка для замены – V127 и F104. Были получены, очищены и охарактеризованы мутантные формы SAASoti, содержащие замены V127T, F104N и F104T, из которых была выбрана форма V127T, так как вплоть до mM значений концентрации V127T SAASoti находится в растворе в виде мономера (Рис. 3), лишь небольшая его доля димеризована. Примечательно, что частичная димеризация в случае V127T SAASoti при повышенных концентрациях (0,22 mM), скорее всего, обусловлена

образованием сульфидных S-S связей между остатками цистеина двух субъединиц, так как добавление восстанавливающего агента (10 мМ дитиотреитола) разрушает эти взаимодействия, и на профиле элюирования в восстанавливающих условиях геле-фильтрации V127T SAASoti имеет время удерживания, соответствующее мономерной форме. Более того, восстановительная среда в эукариотических клетках будет препятствовать частичной димеризации V127T SAASoti в экспериментах *in vivo*.

Таким образом, путем введения аминокислотной замены V127T в интерфейсе преимущественно гидрофобных взаимодействий была получена мономерная форма флуоресцентного белка SAASoti, которая была выбрана, как наиболее перспективная для дальнейшего изучения ее фото- и физико-химических свойств, а также применения в методах супер-разрешающей микроскопии.

Определение олигомерного состояния вариантов SAASoti методом двухфокусной флуоресцентной корреляционной спектроскопии

Метод двухфокусной флуоресцентной корреляционной спектроскопии является одним из наиболее чувствительных для изучения диффузии белков. Данным методом были определены коэффициенты диффузии (D) для вариантов SAASoti в стандартном водном буфере PBS (pH 7,5), значения составили $D = 68 \pm 1 \text{ мкм}^2/\text{с}$ для (K145E) и $72 \pm 1 \text{ мкм}^2/\text{с}$ для дикого типа SAASoti. Для мутантной формы V127T SAASoti коэффициент диффузии $D = 93 \pm 1 \text{ мкм}^2/\text{с}$. Если рассматривать известные из литературы значения коэффициентов диффузии, полученные методом флуоресцентной корреляционной спектроскопии для искусственно созданных мономерной, димерной и тетрамерной форм eGFP, которые соответствовали $97 \pm 5 \text{ мкм}^2/\text{с}$, $70 \pm 4 \text{ мкм}^2/\text{с}$, $55 \pm 3 \text{ мкм}^2/\text{с}$, можно сделать вывод, что V127T SAASoti находится в мономерной форме.

Физико-химические свойства различных вариантов SAASoti

На следующем этапе исследовали физико-химические свойства полученных мутантных форм белка SAASoti и сравнивали с гомологичным фотоконвертируемым и коммерчески доступным белком Dendra2. Наибольший интерес представляли стабильная тетрамерная форма K145E и полученная мономерная форма V127T SAASoti. Были определены спектральные (Рис. 4) характеристики, а также коэффициенты молярного поглощения и квантовый выход флуоресценции для зеленой и красной форм SAASoti (Таблица 1). Коэффициенты экстинкции были рассчитаны как отношение между величиной поглощения анионной формы при $\lambda=509 \text{ нм}$ и величиной поглощения при $\lambda=280 \text{ нм}$. Измерения проводились с использованием очищенных гомогенных растворов белков (чистота >90 % по ПААГ). Следует отметить, что форма спектров и параметры

(λ_{max} поглощения, возбуждения и эмиссии) полученных мутантных форм SAASoti остались такими же, как для белка дикого типа SAASoti.

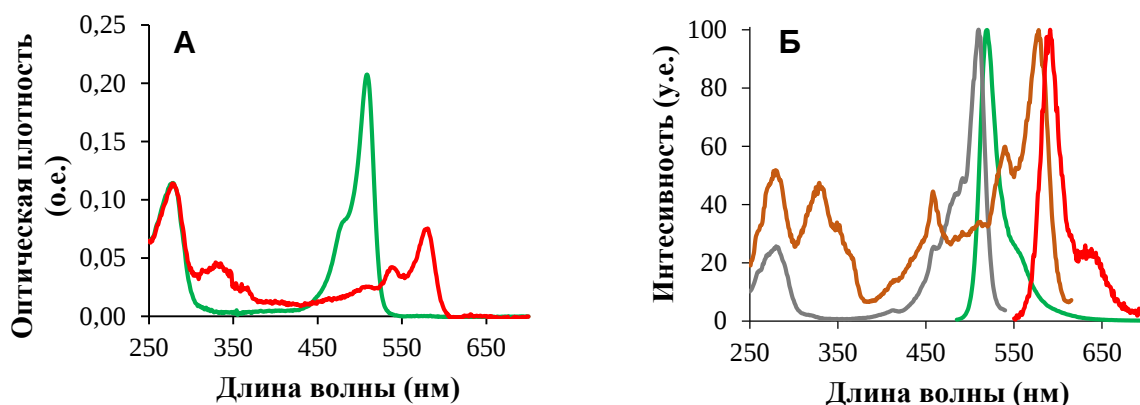


Рисунок 4. Спектры А) поглощения зеленой и красной форм K145E SAASoti; Б) возбуждения/эмиссии зеленой красной форм K145E SAASoti.

Таблица 1. Флуоресцентные свойства (максимумы длин волн возбуждения (λ_{ex}) и эмиссии (λ_{em}) флуоресценции, Φ – квантовый выход флуоресценции, ϵ – коэффициент молярной экстинкции, $\text{яркость} = \epsilon \cdot \Phi$) мутантных форм SAASoti и сравнение с другими фотоконвертируемыми флуоресцентными белками.

флуоресцентн. белок	Форма	$\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$, нм	Φ	ϵ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\epsilon \cdot \Phi$
K145E SAASoti	зеленый	509/519	0,52	66 000	34 320
	красный	573/579	0,34	24 000	8 160
V127T SAASoti	зеленый	509/519	0,59	75 000	44 250
	красный	573/579	0,27	24 000	6 480
Dendra2 *	зеленый	490/507	0,50	45 000	22 500
	красный	553/573	0,55	35 000	19 250
mMaple **	зеленый	489/505	0,74	15 000	11 100
	красный	566/583	0,56	30 000	16 800
mEos2 **	зеленый	506/519	0,43	78 000	33 540
	красный	573/584	0,35	39 000	13 650
* Gurskaya et al., 2006;					
** McEvoy et al., 2012.					

Зеленая форма SAASoti имеет максимумы поглощения и возбуждения $\lambda=509$ нм, в то время как красная форма – $\lambda=573$ нм. В случае K145E SAASoti значение коэффициента экстинкции при $\lambda=509$ нм оказалось равным $66\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$, в то время как для варианта V127T SAASoti – $75\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$. Определение величины коэффициента экстинкции для красной формы ($\lambda=579$ нм) оказалось затрудненным ввиду ее необратимой фотодеструкции во время фотоконверсии при облучении светом $\lambda=400$ нм, и для обеих мутантных форм K145E и V127T SAASoti составило $24\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ (данные значения определены для раствора со значением pH 7,5). В случае зеленой и красной форм флуоресцентного белка Dendra2 коэффициенты экстинкции равны $45\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ и $35\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$, соответственно. Флуоресцентный белок SAASoti обладает значительно большим коэффициентом экстинкции зеленой формы по сравнению с флуоресцентным белком Dendra2. Квантовый выход флуоресценции определяли относительно белка Dendra2, яркость определяли, как произведение квантового выхода и коэффициента экстинкции.

Ввиду того, что только анионная форма как зеленого, так и красного хромофоров является флуоресцентной, по спектрам флуоресценции мутантных форм SAASoti, полученных в растворах с различным значением pH, по уравнению Хендерсона-Хассельбальха были определены соответствующие константы кислотности (Таблица 2). При введении замены (V127T) внутри гидрофобного интерфейса не происходит заметного смещения величины pKa зеленой и красной форм по сравнению с белком дикого типа, в то время как замены аминокислотных остатков лизина (145, 149, 172) в заряженном интерфейсе приводят к значительному изменению величины pKa как зеленой, так и красной формы.

Таблица 2. Значения pKa хромофора, рассчитанные для полученных мутантных форм флуоресцентного белка SAASoti по интенсивности флуоресценции в растворах с различным значением pH.

-	дикий тип	K145E	K145N	K149E	K149N	K172N	V127T	Dendra2
pKa (зеленая форма)	6,4±0,1	6,0±0,1	6,3±0,1	5,7±0,1	5,4±0,1	4,0±0,2	6,3±0,1	6,6±0,1
pKa (красная форма)	6,7±0,1	7,6±0,1	7,6±0,1	7,0±0,1	7,1±0,1	5,7±0,1	6,6±0,1	6,9±0,1

Необратимая фотоконверсия (зеленый→красный) вариантов SAASoti in vitro

Фотохимическое превращение зеленой формы в красную под действием облучающего света $\lambda=400$ нм происходит с участием протонированной формы хромофора и

сопровождается необратимым разрывом пептидной цепи. Раствор белка V127T SAASoti в кювете облучали светом $\lambda=400$ нм и регистрировали изменение интенсивности флуоресценции красной формы во времени (Рисунок 5А). При постоянной мощности облучающего света формально реакция описывается Уравнением 1 как последовательный мономолекулярный процесс (Рисунок 5В).

$$I(t) = I_0 \cdot \frac{k_1}{k_2 - k_1} \cdot (\exp(-k_1 \cdot t) - \exp(-k_2 \cdot t)) + I_- \quad (1)$$

где $I(t)$ – текущая интенсивность флуоресценции, I_0 – максимальная теоретическая интенсивность красной формы, k_1 – константа скорости появления красной формы, k_2 – константа скорости фотодеструкции, I_- – фоновый сигнал.

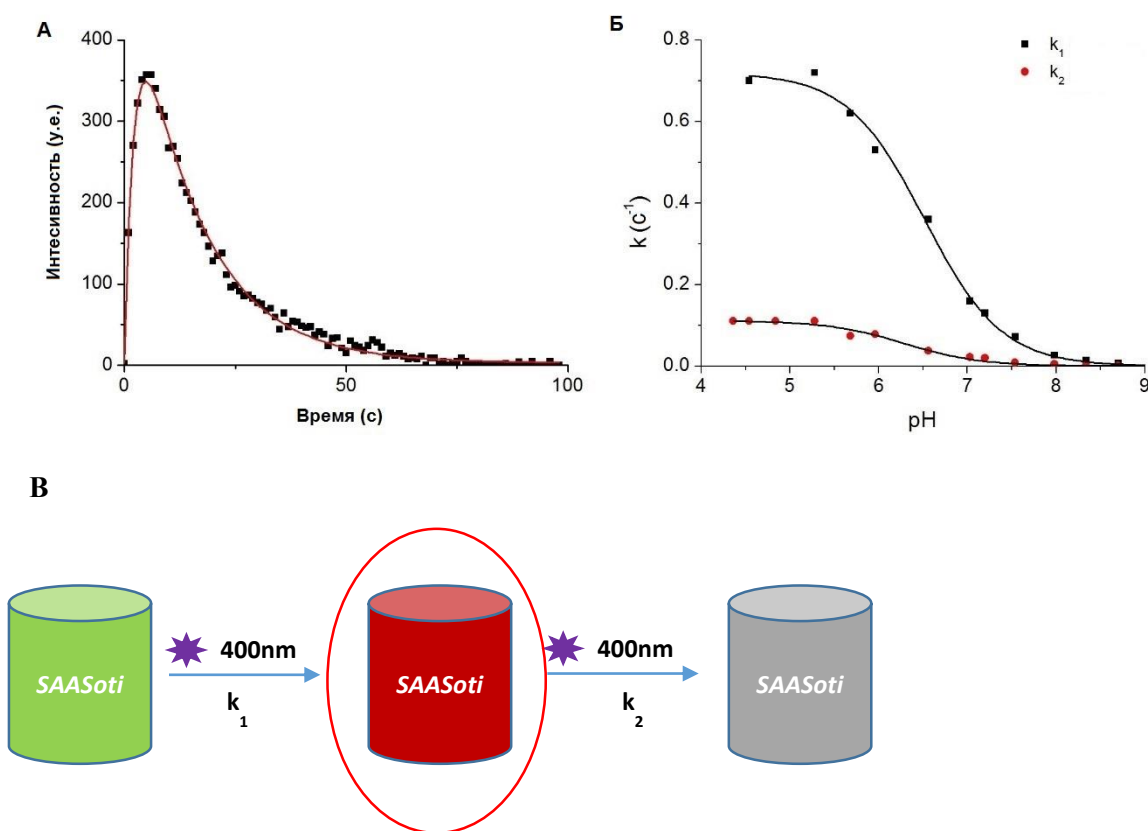


Рисунок 5. А) Зависимость интенсивности флуоресценции красной формы SAASoti на длине волны 580 нм от времени при облучении образца 400 нм, 200 мМ фосфатный буфер, pH 7,5; Б) зависимость констант скоростей образования красной формы (k_1) и ее фотодеструкции (k_2) от значения pH; В) Схема превращений ФБ при фотоконверсии.

При уменьшении значения pH буфера увеличивается доля протонированной формы хромофора и поглощение в области 400 нм, как можно видеть из зависимости спектров поглощения зеленой формы от pH (Рис. 6). Ввиду того, что механизм фотоконверсии включает протонирование хромофора, при низких значениях pH наблюдается рост значений констант скоростей k_1 и k_2 , которые отвечают за образование и тушение красной формы, соответственно (Рис. 5Б).

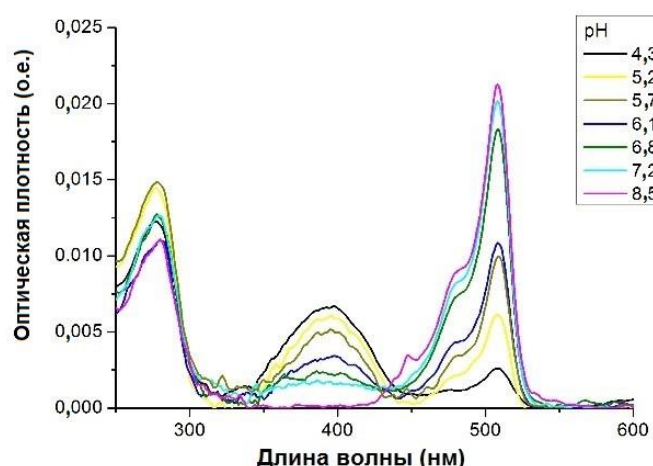


Рисунок 6. Спектры поглощения зеленой формы V127T SAASoti при различных значениях pH.

Константы скоростей при различных значениях pH являются кажущимися, поэтому для сравнения эффективности фотоконверсии флуоресцентных белков V127T SAASoti и Dendra2 использовали максимальные значения констант скоростей образования красной формы при низких значениях pH. На основании анализа зависимостей кажущихся констант скоростей от pH были получены значения максимальных констант скоростей образования красной формы (k_{1max}) и фотодеструкции (k_{2max}), значения pKa групп, контролирующих данные процессы (pKa1 и pKa2, соответственно), для всех мутантных форм белка SAASoti и Dendra2 (Таблица 3).

Таблица 3. Значения максимальных констант скоростей образования (k_{1max}) и фотодеструкции (k_{2max}) красной формы вариантов белка SAASoti и Dendra2 и констант кислотности групп, влияющих на эти процессы (pKa1 - образования и pKa2 - фотодеструкции).

-	дикий тип	K145E	K145N	K149E	K149N	V127T	Dendra2
pKa1	6,4±0,1	6,5±0,1	6,3±0,05	6,3±0,06	5,8±0,06	6,2±0,1	6,9±0,1
pKa2	5,3±0,2	6,30±0,05	5,6±0,1	5,7±0,1	6,1±0,05	6,5±0,1	-
k_{1max}, с⁻¹	0,6±0,1	0,72±0,08	0,7±0,2	0,9±0,1	0,7±0,2	0,7±0,1	0,030 ±0,001
k_{2max}, с⁻¹	0,11±0,06	0,11±0,02	0,10±0,02	0,09±0,02	0,09±0,03	0,08±0,01	-
k_1, с⁻¹ клетки HeLa	-	-	-	-	-	0,33±0,01	0,013 ±0,002
k_2, с⁻¹ клетки HeLa	-	-	-	-	-	0,35±0,1 0,042 ±0,003	0,001 ±0,001

Величина k_{1max} для различных мутантных форм составила от 0,6 до 0,9 с⁻¹, а константа фотодеструкции k_{2max} – от 0,08 до 0,11 с⁻¹. Для Dendra2 максимальное значение k_{1max} определено как 0,03 с⁻¹, что почти на порядок ниже аналогичной величины в случае флуоресцентного белка SAASoti, однако при данных условиях не наблюдается значимой

фотодеструкции красной формы белка Dendra2. Таким образом, красная форма SAASoti образуется быстрее, чем в случае Dendra2, однако является менее фотохимически стабильной при облучении светом $\lambda=400$ нм.

Можно заметить, что значения рКа для фотопревращений часто не совпадают с рКа хромофора красной и зеленой форм из Таблицы 2. Как было описано выше, процесс фотоконверсии происходит с участием протонированной формы хромофора, и на скорость фотоконверсии может влиять не только коэффициент экстинкции хромофора и число поглощенных фотонов, но также протонирование аминокислотных остатков ближайшего окружения хромофора, участвующих в процессе фотоконверсии.

Необратимая фотоконверсия V127T SAASoti (зеленый→красный) в живых клетках

При экспрессии в культуре клеток HeLa белков V127T SAASoti и Dendra2 были определены константы фотопревращений (Таблица 3) при облучении светом $\lambda=400$ нм в широкопольном флуоресцентном микроскопе при одинаковых условиях. Константа скорости фотоконверсии для V127T SAASoti равна $0,33 \text{ с}^{-1}$, в то время как для Dendra2 – $0,013 \text{ с}^{-1}$. Красные формы V127T SAASoti и Dendra2 под действием света $\lambda=400$ нм подвергаются необратимой фотодеструкции. Фотодеструкция красной формы V127T SAASoti описывается двухэкспоненциальной зависимостью с параметрами $k_{21} = 0,4 \text{ с}^{-1}$ и $k_{22} = 0,04 \text{ с}^{-1}$, в то время как для Dendra2 – $k_2 = 0,005 \text{ с}^{-1}$. При использовании V127T SAASoti в клетках млекопитающих скорость образования красной формы также превышает скорость образования красной формы белка Dendra2 практически на порядок. Поэтому при использовании V127T SAASoti в качестве флуоресцентной метки можно использовать меньшие дозы токсичного облучения $\lambda=400$ нм, и увеличить скорость накопления изображений для локализационных методов.

Обратимое фотопереключение (флуоресцирующее→темное)

зеленой формы V127T SAASoti

В ходе исследования оказалось, что SAASoti также обладает способностью к обратимому фотопереключению зеленой формы под действием продолжительного облучения светом $\lambda=470$ нм. Так, во время облучения в течение 10 минут образца V127T SAASoti в кювете наблюдается уменьшение интенсивности флуоресценции (с максимумом $\lambda=519$ нм) во времени. Кинетика затухания флуоресценции описывается биэкспоненциальной зависимостью (Рис. 7Б). Как видно из спектров поглощения образцов до и после облучения (Рис. 7А), максимум поглощения анионной формы ($\lambda=509$ нм) уменьшается, в то время как поглощение протонированной формы хромофора ($\lambda=395$ нм) возрастает, иными словами,

наблюдается фотоиндуцированное протонирование хромофора белка в растворе с заданным значением pH.

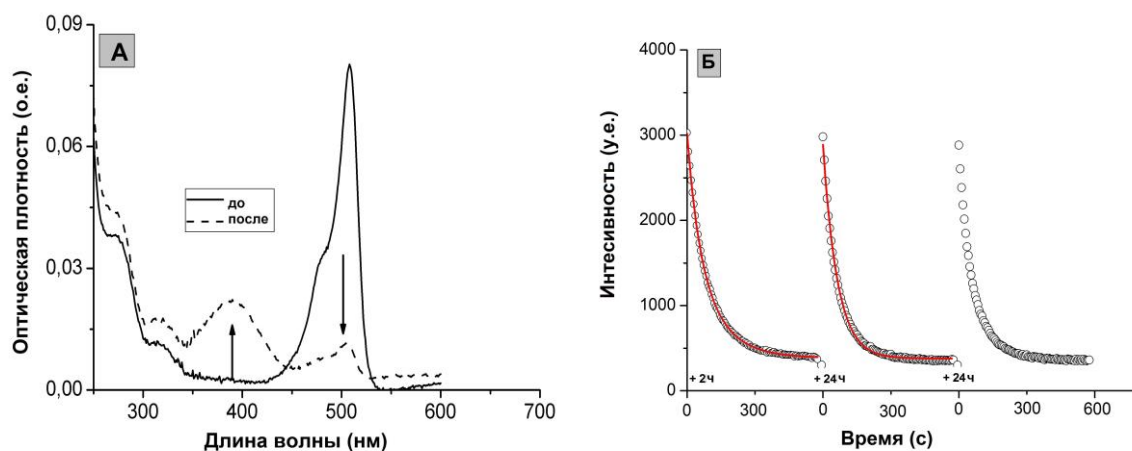


Рисунок 7. А) Спектр поглощения V127T SAASoti до (сплошная линия) и после (пунктирная линия) облучения светом $\lambda=470$ нм в течение 10 мин (150 мВт/см^2); Б) кинетика затухания SAASoti и ее анализ под воздействием света 470 нм. Повторы проводились через сутки с одним и тем же образцом. 20 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, pH 7,4.

Данный эффект наблюдали ранее для ряда GFP-подобных белков и связывали его с фотоиндуцированной *цис-транс* изомеризацией вокруг двойной связи внутри хромофора, сопровождающейся изменением его протонированного состояния. Примечательно, что процесс может быть обращен как термической релаксацией, так и путем быстрого облучения (несколько секунд) потушенной формы белка светом $\lambda=400$ нм. Как видно из Рисунка 7Б, обратимое фотопереключение с последующей термической релаксацией одного и того же образца белка SAASoti можно повторять многократно без значительных потерь исходных значений интенсивности флуоресценции. Анализ данных кинетики фотопереключения и релаксации проводился согласно Уравнению 2:

$$I(t) = C + \sum_{i=1}^n A_i \times \exp(-k_i t) \quad (2)$$

Скорость фотопереключения зависит от мощности облучающего света. Биэкспоненциальная зависимость тушения флуоресценции может быть объяснена существованием двух популяций белка, при этом каждая из них способна к самостоятельному и независимому переходу в «выключенное» состояние. Подобная гипотеза была предложена в нашей лаборатории при исследовании флуоресцентного белка KFP. Зачастую сложно сравнивать данные, полученные ранее для других флуоресцентных белков, из-за существенных приборных различий при проведении экспериментов (интенсивность облучающего света, форма и геометрия пучка облучающего света, концентрация образцов и т.д.). Для того, чтобы рассчитать энергию активации (E_a)

процесса фотопереключения из флуоресцирующей формы в темную, образец V127T SAASoti облучали светом $\lambda=470$ нм в диапазоне температур 20-50 °C и рассчитывали величину E_a по уравнению Аррениуса (3). Значение E_a переключения из флуоресцирующего состояния в темное оказалось равным 47 кДж/моль для обеих популяций белка.

$$k = A * \exp\left(-\frac{E_a}{k_B * T}\right) \quad (3)$$

Кинетику релаксации изучали путем регистрации спектров поглощения предварительно «потушенного» образца V127T SAASoti в течение 90 минут (Рис. 8). Возвращение максимума поглощения зеленой анионной формы хромофора SAASoti ($\lambda=509$ нм) также описывается моноэкспоненциальной зависимостью согласно Уравнению 2.

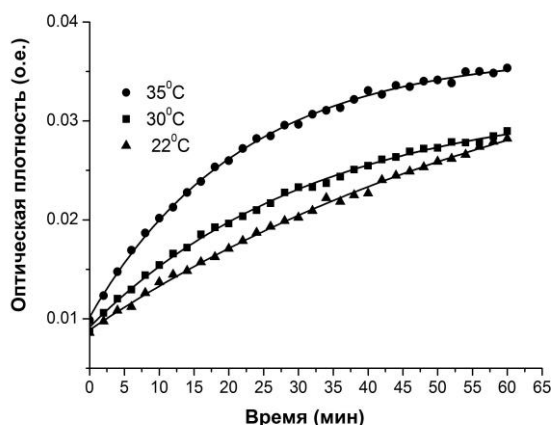


Рисунок 8. Кинетика термической релаксации предварительно «потушенной» ($\lambda=470$ нм, 10 минут) зеленой формы SAASoti из темного состояния во флуоресцирующее, измеренная по восстановлению поглощения при 509 нм при разных температурах.

Рассчитанное значение E_a для процесса релаксации из темного состояния во флуоресцирующее в случае SAASoti составляет 83 кДж/моль, что значительно меньше аналогичной величины для флуоресцентных фотопереключаемых белков mTFP0.7 и Dгопра, для которых величина E_a составила 106 кДж/моль и 109 кДж/моль, соответственно. Для свободного синтезированного хромофора GFP в растворе величина E_a составляет 55 кДж/моль. Флуоресцентный белок KFP, напротив, находится в стабильной *транс*-форме и может релаксировать из флуоресцентной «включенной» *цис*-формы. Рассчитанная методом квантовой механики/молекулярной механики величина E_a для процесса *цис-транс* изомеризации хромофора белка KFP составила 86 кДж/моль, что находится в хорошем соответствии с недавно полученными реальными экспериментальными данными – 71 кДж/моль.

Термическая релаксация флуоресцентных белков зачастую характеризуется параметром $\tau_{1/2}$ – временем, за которое интенсивность флуоресценции (или максимума поглощения зеленой формы) восстанавливается на значение, равное половине исходного. Так, в случае V127T SAASoti $\tau_{1/2}=50$ мин при 22 °С, в то время как для белка mTFP0.7 эта величина составляет 30 мин, а для белков IrisFP и Dronpa– 5,5 и 14 ч, соответственно. Более быстрая кинетика релаксации по сравнению с флуоресцентным белком IrisFP наряду с низким значением величины E_a , возможно, указывает на тот факт, что SAASoti менее стабилен в «выключенной» конформации.

Фотопереключение красной формы V127T SAASoti

Красная форма SAASoti, полученная «классическим» способом – облучением образца SAASoti светом $\lambda=400$ нм в течение 10 минут, не обладает способностью к обратимому переходу из флуоресцентной красной формы в темную. Так, длительное облучение красной формы светом $\lambda=550$ нм в течение 60 минут приводит к полному и необратимому ее выгоранию. Причем падение флуоресценции красной формы описывается двухэкспоненциальной зависимостью (Уравнение 2).

Было предложено получать красную форму из предварительно потушенной зеленой, так как при этом происходит изомеризация и протонирование хромофора, то есть предполагалось, что хромофор и его окружение в таком состоянии будут «подготовлены» к фотоконверсии. Таким образом, эксперимент выглядел следующим образом (Рисунок 9):

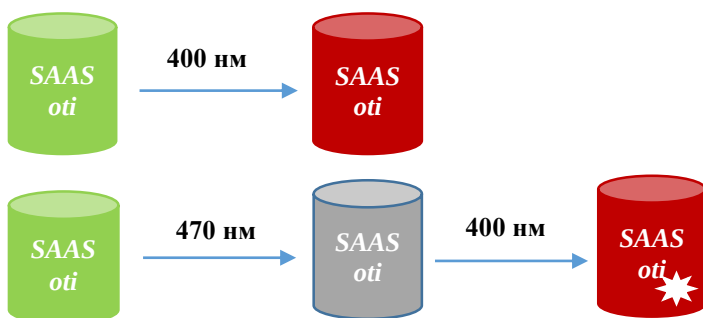


Рисунок 9. Схема получения красной формы V127T SAASoti «классическим» методом (верхняя строка) и с предварительным тушением зеленой формы (нижняя строка). Образец V127T SAASoti в кювете в растворе 20 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl pH 7,4 облучали светом $\lambda=400$ нм (2 минуты) и предварительно 10 минут светом $\lambda=470$ нм (нижняя строка).

Полученная новым способом красная форма при коротком (50 с) облучении зеленым светом $\lambda=550$ нм способна частично фотопереключаться и временно переходить в темное состояние (Рис. 10А, красная линия), при этом релаксация происходит значительно быстрее, чем для зеленой формы (10 минут по сравнению с 90 минут для зеленой формы). Примечательно, что при исследовании фотоконверсии «старого» образца SAASoti (хранение более 6 месяцев при +4 °С без добавления восстанавливающего агента)

образующаяся красная форма также способна к обратимому фотопереключению при быстром (50 с) облучении зеленым светом $\lambda=550$ нм.

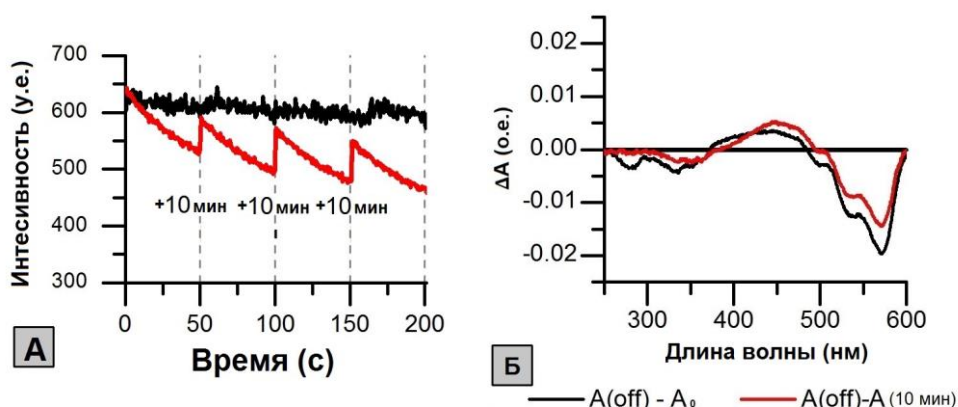


Рисунок 10. А) Циклы обратимого фотопереключения красной формы SAASoti, полученной с (красная линия) и без (черная линия) предварительного облучения светом $\lambda=470$ нм. Зависимости интенсивности флуоресценции красной формы при $\lambda=590$ нм от времени при облучении светом $\lambda=550$ нм (300 мВт/см²). В) Разностные спектры поглощения между флуоресцентным состоянием и частичным переключением в темную форму.

Из спектров поглощения облучаемого белка можно наблюдать увеличение поглощения в области 400-500 нм и уменьшения поглощения в области 570 нм, отличия лучше видны в разностном спектре (Рис. 10Б). Область 400-500 нм может соответствовать протонированному хромофору красной формы белка, что подтверждает явление частичного фотопереключения красной формы. Если сопоставить все результаты, полученные в экспериментах по фотопревращению обеих форм, можно предположить, что при получении красной формы вторым способом на первой стадии при облучении светом $\lambda=470$ нм происходит химическая модификация аминокислотных остатков в ближайшем окружении хромофора, что способствует в дальнейшем конформационной подвижности хромофора красной формы и обуславливает его обратимое переключение. Важно подчеркнуть, что модификации, скорее всего, подвергается лишь небольшая доля белка SAASoti. Чтобы проверить данное предположение был проведен масс-спектрометрический анализ методом MALDI TOF/TOF образцов SAASoti в растворе до и после облучения в течение 10 минут светом $\lambda=470$ нм. В образце после облучения помимо исходного пептида 1450,7 Да в смеси также присутствует пептид массой 1466,7 Да, что говорит о возможном неполном окислении аминокислотных остатков. Исходя из спектра фрагментации пептида массой 1466,7 Да, сдвиг массой 16 Да обусловлен окислением аминокислотного остатка метионина в положении 164. Таким образом, методом масс-спектрометрии удалось идентифицировать одну из возможных фотоиндуцированных химических модификаций флуоресцентного белка SAASoti. Ранее факт окисления данного аминокислотного остатка был установлен при облучении светом $\lambda=488$ нм бифотохромного флуоресцентного белка

IrisFP, причем замена аналогичного аминокислотного остатка (M159A, нумерация по EosFP) в случае фотоконвертируемых белков EosFP и Dendra2 привела к появлению у них дополнительного свойства обратимого фотопереключения.

Таким образом, в ходе данной работы было установлено, что во флуоресцентном белке SAASoti реализуется целый набор различных фотопревращений (Рис. 11). Так, под действием облучающего света $\lambda=400$ нм SAASoti необратимо конвертируется в красную форму с последующей ее фотодеструкцией. Зеленая форма, вероятно, также может подвергаться деструкции при фотоконверсии, то есть при облучении светом $\lambda=400$ нм происходят два параллельных процесса с участием зеленой формы – конверсия в красную форму и фотодеструкция зеленой. Для красной формы белка наблюдается фотодеструкция при длительном облучении светом $\lambda=550$ нм. При длительном облучении светом $\lambda=470$ нм зеленая форма способна обратимо переключается в темную форму, при этом параллельно протекает процесс частичного окисления аминокислотного остатка M164 (Рис. 11, SAASoti с желтой звездочкой), расположенного в ближайшем окружении хромофора, и также процесс фотодеструкции белка. Вероятно, окисление M164 связано с появлением частичного обратимого переключения при кратковременном (секунды) облучении светом $\lambda=550$ нм у красной формы SAASoti, полученной при предварительном переходе зеленой формы в темную.

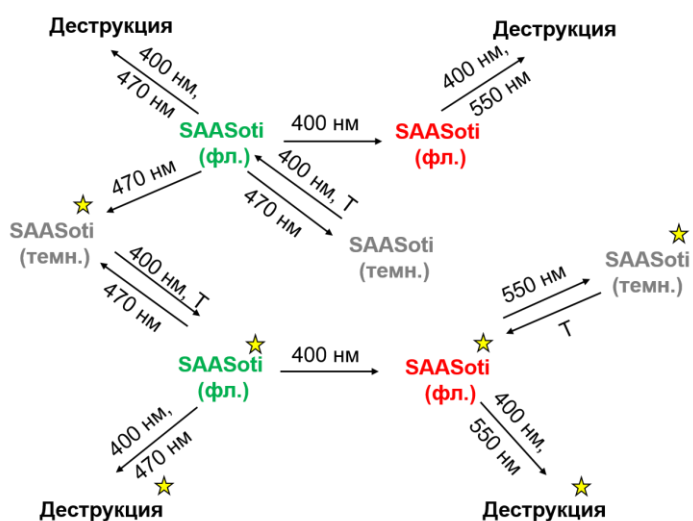


Рисунок 11. Схема установленных фотопревращений флуоресцентного белка SAASoti. Звездочкой отмечена химическая модификация (окисление M164).

Экспрессия в клетках млекопитающих и субдифракционная микроскопия

Для того, чтобы продемонстрировать возможность использования V127T SAASoti в качестве флуоресцентной метки для субдифракционной микроскопии, была создана конструкция, содержащая структурный белок виментин на N-конце, линкер и

флуоресцентный белок V127T SAASoti на С-конце. Клеточная культура Hep-2 была трансфицирована плазмидной ДНК pVimentin-SAASoti. Как видно из Рис. 12, полученного в режиме полного внутреннего отражения (TIRF) на микроскопе Nikon Ti N-STORM, данная конструкция локализуется вокруг ядра ближе к внешней мембране аналогично тому, как это наблюдали ранее при исследовании живых клеток ВНК-21. По сравнению с обычным широкопольным флуоресцентным изображением (Рис. 12А) в субдифракционном режиме фотоактивационной локализационной микроскопии (PALM) после постобработки 500 кадров случайно распределенных флуоресцирующих пятен становятся различимы особенности структуры белка виментина (Рис. 12 Б-Г).

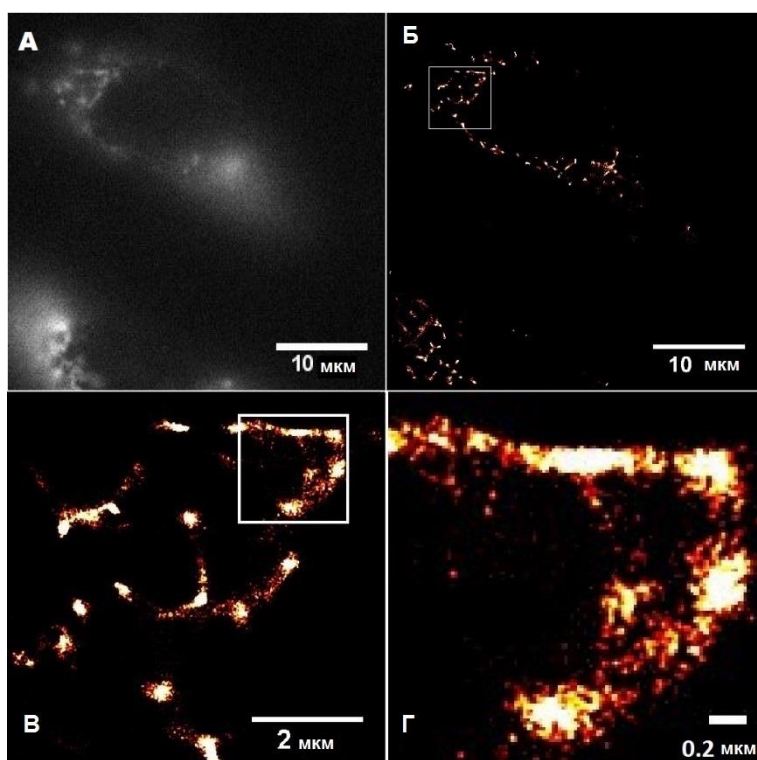


Рисунок 12. А) Флуоресцентное изображение клетки Hep2, трансфицированной pVimentin-SAASoti. Б-Г) Субдифракционное изображение, полученное в режиме PALM, той же клетки в разных масштабах. Изображения получены с помощью микроскопа Nikon Ti N-STORM в режиме TIRF, объектив 100x SR Apo TIRF, CCD камера Andor DU-897 с эффективным разрешением 160 нм/пиксель. Образец последовательно облучали вспышкой 405 нм (активация красной формы) и 3 вспышками 561 нм (1 – регистрация активированных молекул, 2,3 – их фотодеструкция). В сумме провели 500 циклов регистрации. Полученные изображения анализировали с помощью программного пакета ImageJ, плагина ThunderSTORM.

FRET-сенсор на основе флуоресцентного белка SAASoti для изучения активности каспазы-3 после индукции апоптоза в живых клетках

Ранее в нашей лаборатории был разработан и успешно применен FRET-сенсор для каспазы-3 на основе флуоресцентных белков TagRFP и KFP, которые соединены между собой линкером из 23 аминокислотных остатков, содержащем в середине -DEVD-последовательность для расщепления каспазой-3. Время жизни флуоресценции свободного TagRFP составляет 2,4 нс, а при реализации резонансного переноса энергии на KFP, который находится в темной форме и не флуоресцирует, время жизни TagRFP сокращается до 1,8 нс. Внутри клетки, трансфицированной такой конструкцией, во время апоптоза происходит активация каспазы-3 и начинается процесс расщепления сенсора, при этом

регистрируется увеличение времени жизни и интенсивности флуоресценции TagRFP методом FLIM-микроскопии.

Для альтернативного контроля за гидролизом сенсора каспазой-3 было предложено наблюдать за коэффициентом диффузии донора FRET-пары с помощью метода флуоресцентной корреляционной микроскопии. Однако, метод флуоресцентной корреляционной спектроскопии требует использования концентрации флуорофора в диапазоне 10^{-8} – 10^{-9} М, а при исследованиях в живых клетках будет наблюдаться избыточная экспрессии сенсора TagRFP-23-KFP. Контроль экспрессии белков в клетке – сложно решаемая задача. Чаще всего гены белков для экспрессии в клетках млекопитающих помещают под конститутивные промоторы (CMV и пр.), в результате чего происходит их избыточная экспрессия. Поэтому для необходимого контроля за концентрацией флуорофора было предложение заменить донор флуоресценции TagRFP на фотоконвертируемый белок V127T SAASoti. В таком случае можно контролировать концентрацию красной формы флуоресцентного белка, при этом нужно проводить ограниченную фотоконверсию флуоресцентного белка вспышками света 405 нм. Была получена генетическая конструкция SAASoti-23-KFP путем замены флуоресцентного белка TagRFP в конструкции TagRFP-23-KFP в эукариотическом векторе pcDNA3. KFP – тетрамерный белок, а в сумме с мономерным донором образует октамерную (по количеству отдельных молекул в сенсоре) конструкцию, и отщепление мономерного донора при гидролизе сенсора должно явно регистрироваться по изменению коэффициента диффузии.

В клетках млекопитающих вследствие эффекта FRET наблюдалось увеличение времени жизни флуоресценции после индукции апоптоза в клетках с помощью добавления стауроспорина в конечной концентрации 1 мкМ в среде. Среднее время жизни красной формы белка SAASoti при активации апоптоза в клетке изменилось от 2,75 до 3-3,5 нс, что свидетельствует о расщеплении конструкции сенсора и об уменьшении эффекта FRET. Предполагалось, что после расщепления сенсора будет наблюдаться также уменьшение времени диффузии, т.е. увеличение коэффициента диффузии ввиду отщепления мономерного флуоресцентного белка V127T SAASoti от исходно октамерной конструкции сенсора. Однако, если сравнивать распределения (Рис. 13) времен диффузии ($\sim 1/D$) в клетках, экспрессирующих сенсор SAASoti-23-KFP до (синяя линия), после индукции апоптоза (серая линия) и клеток, экспрессирующих свободный белок V127T SAASoti (оранжевая линия), можно отметить, что диффузия расщепленного сенсора после запуска апоптоза сильно затруднена, т.к. времена диффузии SAASoti увеличиваются.

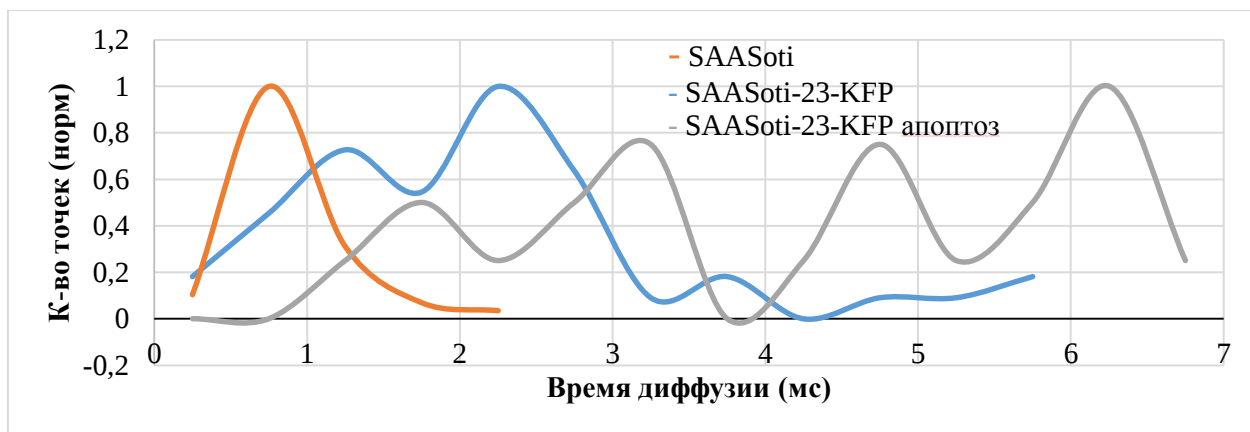


Рисунок 13. Распределение времен диффузии ($\sim 1/D$) для свободного SAASoti (оранжевый) и сенсора SAASoti-23-KFP до (синий) и после (серый) индукции апоптоза и активации каспазы-3.

Апоптоз, наиболее вероятно, сопровождается резким увеличением вязкости внутри клетки. И, как следует из данных, приведенных на Рис. 11, удалось установить, что данный процесс регистрируется уже на стадии активации каспазы-3. Таким образом, использование фотоконвертируемого белка в составе сенсора позволяет одновременно регистрировать активность фермента и проводить контроль изменения вязкости внутри клетки при развитии апоптоза.

ВЫВОДЫ

1. Путем введения единичной замены V127T удалось разрушить взаимодействия в гидрофобном интерфейсе и получить мономерную форму SAASoti. Мономерное состояние V127T SAASoti подтверждено методами гель-фильтрации и двухфокусной флуоресцентной корреляционной спектроскопии.
2. Охарактеризована фотоконверсия флуоресцентных белков SAASoti и Dendra2. Определены кинетические параметры процессов фотоконверсии (k_1) из зеленой формы в красную и фотодеструкции красной формы (k_2), а также значения pK_{a1} и pK_{a2} , влияющие на эти процессы. SAASoti превосходит Dendra2 по скорости образования красной формы, что способствует уменьшению времени набора сигнала для супер-разрешающей микроскопии.
3. Впервые установлено, что SAASoti является бифотохромным белком. Определены физико-химические и кинетические параметры процессов фотопереключения и релаксации (константы скоростей и энергия активации). Подобраны условия, при которых наблюдается частичное фотопереключение красной формы. Установлено окисление M164 при фотопереключении зеленой формы.
4. SAASoti успешно применен в качестве флуоресцентной метки для метода субдифракционной флуоресцентной микроскопии PALM.

5. Получен и успешно использован флуоресцентный сенсор SAASoti-23-KFP, содержащий V127T SAASoti в качестве донора флуоресценции и позволяющий одновременно изучать ферментативную активность (каспаза-3) и изменения вязкости методом флуоресцентной корреляционной спектроскопии.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, РИНЦ

1. **Solovyev I. D.**, Gavshina A. V., Savitsky A. P. / Novel phototransformable fluorescent protein saasoti with unique photochemical properties // International Journal of Molecular Sciences. — 2019. — Vol. 20, no. 14. — P. 3399. (Web of Science, Scopus, IF 4,3).
2. **Solovyev I. D.**, Alexandra V.G., Katti A.S., Chizhik A.I., Vinokurov L.M., Lapshin G.D., Ivashina T.V., Khrenova M.G., Kireev I.I., Gregor I., Enderlein J., Savitsky A.P. / Monomerization of the photoconvertible fluorescent protein SAASoti by rational mutagenesis of single amino acids // Scientific reports. — 2018. — Vol. 8(1). (Web of Science, Scopus, IF 4,5).
3. **Solovyev I.D.**, Gavshina A.V., Savitsky A.P. / Reversible photobleaching of photoconvertible saasoti-fp // Journal of Biomedical Photonics & Engineering. — 2017. — Vol. 3, no. 4. — P. 040303–1–040303–5. (РИНЦ, IF 0,6).
4. Богданов А.А., **Соловьев И.Д.**, Савицкий А.П. / Сенсоры для визуализации протеолитической активности и их применение в моделях болезни человека // Успехи биологической химии. — 2019. — Т. 59. — С. 3–38. (Web of Science, Scopus, IF 1,7)

Опубликованные тезисы конференций

1. Solovyev I.D., Savitsky A.P. «New fast photoconvertible protein SAASoti», ADFLIM 2016, Сочи;
2. Solovyev I.D., Gavshina A.V., Savitsky A.P. «Reversible photobleaching of photoswitchable fluorescent protein SAASoti» Saratov Fall Meeting 2017, Саратов;
3. Соловьев И.Д. «Применение фотоконвертируемого флуоресцентного белка SAASoti для изучения ферментативной активности каспазы-3 методом ФКС» Ломоносов 2018, Москва;
4. Solovyev I.D., Gavshina A. V., Savitsky A. P. «New Photoconvertible Protein for Superresolution Microscopy» International Conference Laser Optics (ICLO) 2018, Санкт-Петербург;
5. Solovyev I.D., Maloshenok L.G., Savitsky A.P. «FCS and FLIM methods combination for caspase-3 FRET sensor», Biocatalysis 2019, Санкт-Петербург;
6. Solovyev I.D., Gavshina A.V., Savitsky A.P. «Some aspects of SAASoti FP photoswitching». Topical Problems of Biophotonics 2019, Нижний Новгород.