Успехи биологической химии, т. 59, 2019, с. 67–102

БЛИЖНЕ-ИНФРАКРАСНЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ БЕЛКИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

©2019 г.
М. М. КАРАСЁВ[1,2], О. В. СТЕПАНЕНКО[1], К. А. РУМЯНЦЕВ[1,3,4], К. К. ТУРОВЕРОВ[1,5] и В. В. ВЕРХУША[2,3]

[1] Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург,
[2] Медикум, Университет Хельсинки, Хельсинки,
[3] Медицинский колледж им. Альберта Эйнштейна, Нью-Йорк,
[4] Московский клинический научно-практический центр им. А.С. Логинова Департамента здравоохранения Москвы, Москва,
[5] Санкт-Петербургский государственный политехнический университет им. Петра Великого, Санкт-Петербург.

I. Введение. II. Ближне-инфракрасные флуоресцентные белки на основе бактериальных фитохромов. III. Особенности молекулярной инженерии ближне-инфракрасных флуоресцентных белков. IV. Применение ближне-инфракрасных флуоресцентных биомаркеров, репортеров и биосенсоров. V. Ближне-инфракрасные флуоресцентные белки в передовых технологиях визуализации. VI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

С развитием новых методов глубокой трехмерной визуализации тканей, органов и всего организма особое значение приобретает разработка ярких высококонтрастных зондов. Наибольшую прозрачность ткани млекопитающих имеют в так называемом «ближне-

Принятые сокращения: BiFC – бимолекулярная флуоресцентная комплементация (bimolecular fluorescence complementation); BiPC – бимолекулярная фотоакустическая комплементация (bimolecular photoacustic complementation);

Окончание принятых сокращений см. на сл. стр

Адрес для корреспонденции: *e-mail*: vladislav.verkhusha@einstein.yu.edu.
Адреса электронной почты: М. М. Карасёв – maksim.karasev@helsinki.fi; О. В. Степаненко – lvs@incras.ru; К. А. Румянцев – k.rumyantsev@mknc.ru; К. К. Туроверов – kkt@incras.ru; В. В. Верхуша – vladislav.verkhusha@einstein.yu.edu.

Работа выполнена при поддержке Национального института здоровья США (гранты NIH R35 GM122567 и U01 NS103573), гранта ERC-2013-ADG-340233 программы EU FP7 и программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

инфракрасном окне прозрачности» (~650 – 900 нм) (рис. 1, *а*) [1, 2]. Поглощение света гемоглобином, водой, липидами и меланином минимально в ближне-инфракрасной (NIR) области спектра. Поэтому свет NIR диапазона по сравнению с видимым светом обладает большей проникающей способностью (рис. 1, *б*). Кроме того, автофлуоресценция биологических тканей и светорассеяние также существенно меньше в NIR спектральной области по сравнению с видимой областью. Это объясняет большой интерес к разработке зондов в NIR области спектра.

Синтезированы экзогенные химические флуоресцентные красители NIR спектрального диапазона, которые доказали свою эффективность в технологиях глубокой *in vivo* визуализации. Для получения контрастного изображения обычно требуется использовать большие концентрации синтетических красителей из-за их неспецифического взаимодействия с белками биологических тканей. Направленная доставка красителей к определенным тканям или органам связана с их модификацией функциональными группами (химические группы, пептиды, белки) и осложняется необходимостью учитывать их фармакокинетические свойства. Это ограничивает возможность применения синтетических красителей для мечения органов и тканей [3]. С другой стороны, экспрессия генетически кодируемых флуоресцентных белков (FP) может быть активирована только в специфичном типе клеток, а их эндогенный синтез дает возможность вести продолжительную неинвазивную визуализацию молекулярно-биологических процессов внутри организма без повторного введения [4–6].

Принятые сокращения, окончание

BphP – бактериальный фитохром (bacterial phytochrome); BV – биливердин IXα (biliverdin IXα); CBD – хромофор-связывающий модуль (chromophore-binding domain); FMT – флуоресцентная молекулярная томография (fluorescence molecular tomography); FP – флуоресцентный белок (fluorescent protein); FRET – Ферстеровский резонансный перенос энергии (Förster resonance energy transfer); HO – гемоксигеназа (heme oxygenase); MSOT – мультиспектральная оптоакустическая томография (multi-spectral optoacoustic tomography); NIR – ближне-инфракрасный спектральный диапазон (near-infrared); OM – эффекторный модуль (output module); PA – фотоакустический эффект (photoacustic effect); PCB – фикоцианобилин (phycocyanobilin); PCM – фотосенсорный модуль (photosensory core module); PET – позитронно-эмиссионная томография (positron-emission tomography); PPI – белок-белковое взаимодействия (protein–protein interactions); SIM – микроскопия структурированного освещения (structured illumination microscopy); siRNA – малые интерферирующие РНК (small interfering RNA); TD – метод измерения кривых затухания флуоресценции (time-domain); XCT – рентгеновская компьютерная томография (X-ray computed tomography).

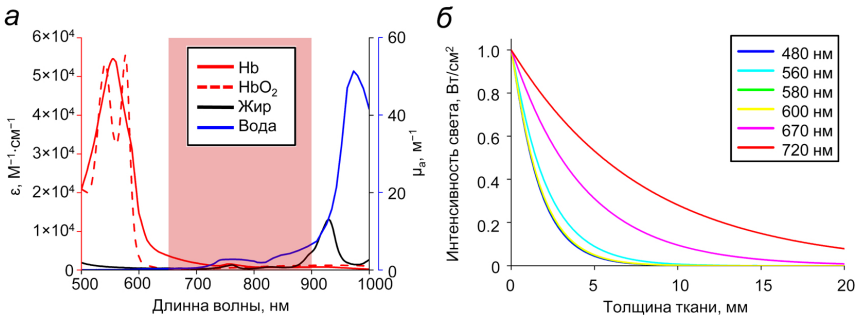

Рис. 1. Распространение света в биологических тканях:

а – зависимость коэффициента молярной экстинкции ε для окси- (HbO_2) и дезоксигемоглобина (Hb) (по данным из https://omlc.org/spectra/hemoglobin/summary.html) и коэффициентов поглощения света μ_a для жира млекопитающих [123] и воды [124, 125] от длины волны падающего света; «ближне-инфракрасное окно прозрачности» биологических тканей млекопитающих отмечено полупрозрачной красной областью;

б – ослабление света различной длины волны в мышечной ткани млекопитающих (адаптировано из [100] с разрешения Nature Publishing Group по международной лицензии Creative Commons Attribution 4.0).

На основе GFP-подобных FP не удалось получить флуоресцентные биомаркеры, которые бы поглощали и флуоресцировали в NIR диапазоне и были бы достаточно яркими для использования в качестве биомаркеров. Ряд GFP-подобных белков, таких как TagRFP675 [7], mNeptune681 и mNeptune684 [8], имеют спектры флуоресценции, попадающие в NIR спектральную область, благодаря большому Стоксову сдвигу между спектрами поглощения и флуоресценции. Однако спектры поглощения этих биомаркеров все еще находятся в дальней красной области (максимум при ≤ 611 нм). Максимум спектра поглощения белка TagRFP657 [9] сдвинут в более длинноволновую область спектра (611 нм), однако этот биомаркер обладает относительно низкой молекулярной яркостью, характерной для дальне-красных GFP-подобных белков.

Наиболее часто используемой основой для разработки NIR FP стали комплексы бактериальных фитохромов (BphP) с их природной простетической группой биливердином IXα (BV), имеющие спектры поглощения в NIR области [10]. За последнее десятилетие в результате интенсивной инженерии BphP были созданы десятки NIR FP. Первые NIR FP имели ряд недостатков, которые осложняли

их использование в качестве биомаркеров: димерная организация этих белков, довольно низкая яркость флуоресценции в клетках млекопитающих, необходимость использования экзогенного кофактора BV. Последующая молекулярная эволюция NIR FP, направленная на устранение этих недостатков, привела к созданию ярких мономерных спектрально различных NIR FP. Сравнение NIR FP с дальне-красными GFP-подобными белками показало преимущество использования NIR FP в качестве биомаркеров *in vivo* [11–13].

II. БЛИЖНЕ-ИНФРАКРАСНЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ БЕЛКИ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ФИТОХРОМОВ

ДИМЕРНЫЕ NIR FP

Первым примером успешного получения NIR FP на основе фитохрома можно считать создание мутантного белка PR-1 на основе цианобактериального фитохрома Cph1 [14], спектр флуоресценции которого имеет максимум при 672 нм. Однако, поскольку хромофором Cph1 является фикоцианобилин (PCB), его применение в качестве биомаркера в животных клетках ограничено необходимостью использования экзогенного PCB или обеспечения его синтеза в клетках. По этой причине в дальнейшем в качестве основы для создания биомаркеров стали использовать BphP, хромофором которых является BV [15]. BV образуется в результате катаболизма гема гемоксигеназой (HO), и присутствует в значительных количествах в клетках эукариот, включая млекопитающих, рыб и насекомых. Это свойство делает возможным применение белков на основе BphP в качестве генетически кодируемых биомаркеров для визуализации клеточных процессов, аналогично GFP-подобным белкам, поскольку не требует использования каких-либо кофакторов или коэкспрессии вспомогательных ферментов [16].

Первый NIR FP получен на основе бактериального фитохрома *Deinococcus radiodurans Dr*BphP в лаборатории Роджера Тсиена, работы которого послужили основой для стремительного развития нового направления в науке, связанного с разработкой генетически кодируемых белковых флуоресцентных маркеров, и создали уникальные методические возможности в молекулярной и клеточной биологии. Вклад Роджера Тсиена в развитие науки был оценен присуждением ему Нобелевской премии по химии в 2008 году. Разработка NIR FP была основана на эволюции хромофор-связывающего модуля (CBD) *Dr*BphP, состоящего из PAS и GAF доменов, и достаточного для взаимодействия с хромофором. В результате инженерии *Dr*CBD,

включающей этапы насыщающего мутагенеза *Dr*CBD в позициях, определенных на основании данных о структуре белка, ДНК рекомбинации получившихся библиотек и нескольких циклов направленной эволюции был получен яркий и стабильный биомаркер IFP1.4, спектр флуоресценции которого имеет максимум при 708 нм [13]. Создание других NIR FP показало, что IFP1.4 обладает далеко не оптимальными фотофизическими характеристиками (низким уровнем молекулярной яркости, низкой аффинностью и специфичностью связывания BV, см. табл.). Тем не менее, применение IFP1.4 *in vivo* подтвердило преимущество NIR FP перед красными флуоресцентными белками (mKate) из-за значительно меньшего поглощения возбуждающего света и света флуоресценции тканями животных в NIR спектральном диапазоне.

С помощью рекомбинации последовательностей ДНК NIR FP IFP1.4 и IFP1.2 (см. рис. 2) и последующего отбора вариантов получившейся библиотеки был получен биомаркер IFP2.0, имеющий более высокую молекулярную яркость по сравнению со своими предшественниками [17]. IFP2.0 был использован для мечения нейронов в личинках *Drosophila* и клеток глиобластомы в мыши. Однако из-за низкой аффинности к BV, свойственной всем белкам серии IFP, требовалось вводить этот хромофор извне или коэкспрессировать HO, что в результате ограничило широкое применение IFP для визуализации клеток и тканей *in vivo*.

На основе *Dr*BphP были получены белки Wi-Phy и Wi-Phy2 [18, 19], свойства которых так и не были охарактеризованы в культуре клеток или *in vivo*. Для этих белков была определена пространственная структура методом рентгеноструктурного анализа и проведен анализ конформации хромофора и его непосредственного аминокислотного окружения, что внесло вклад в понимание фотофизических механизмов NIR флуоресценции маркеров, разработанных на основе BphP.

Практически одновременно была разработана серия спектрально различных NIR FP из бактериальных фитохромов бактерии *Rhodopseudomonas palustris Rp*BphP2 и *Rp*BphP6. Максимумы спектров флуоресценции этих NIR FP, названных iRFP (табл.), перекрывают диапазон от 670 до 720 нм [11, 12]. Первый белок серии – iRFP713 (первоначально названный iRFP) [11], в отличие от IFP1.4, не требует использования экзогенного BV, в результате чего этот маркер имеет высокую яркость в животных клетках. Благодаря этому iRFP713 нашел широкое применение при визуализации различных клеток и тканей *in vivo* и является стандартом для сравнения вновь создаваемых NIR FP (см. табл.). Остальные белки этой серии, iRFP670, iRFP682, iRFP702, iRFP720 [12], также имеют высокое сродство к BV и высокую яркость флуоресценции в клетках, сопоставимую с этими характеристиками

Таблица. **Фотофизические свойства NIR FP**

NIR FP	Матрица	Максимум спектра поглощения (нм)	Максимум спектра флуоресценции (нм)	Коэффициент молярной экстинкции EC ($M^{-1}\cdot см^{-1}$)	Квантовый выход, QY (%)	Молекулярная яркость* vs. iRFP713 (%)	Эффективная яркость† vs. iRFP713 (%)	Ссылка
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
Димерные NIR FP								
IFP1.4	DrBphP	684	708	92000	7.7	114	8	[13]
IFP2.0	DrBphP	690	711	98000	8.1	80	7.9	[17]
smURFP	APC	642	670	180000	18	551	2‡	[20]
BDFP1.1	ApcF2	682	707	68700	5.9	42	6	[22]
iRFP682	RpBphP2	663	682	90000	11.1	162	105	[12]
iRFP713 (iRFP)	RpBphP2	690	713	98000	6.3	100	100	[11]
iRFP720	RpBphP2	702	720	96000	6.0	93	110	[12]
iRFP670	RpBphP6	643	670	114000	12.2	225	119	[12]
iRFP702	RpBphP6	673	702	93000	8.2	124	61	[12]
PAiRFP1	AtBphP2	693#	717	67100	4.8	64	25	[23]
PAiRFP2	AtBphP2	693#	719	63600	4.7	60	25	[23]

Окончание табл. см. на сл. стр.

Окончание таблицы

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Мономерные NIR FP								
Wi-Phy	DrBphP	700	722	118000	6.3	nd	nd	[18]
mIFP	BrBphP	683	704	82000	8.4	74	14	[24]
iBlueberry	BrBphP	644	667	38000	6.9	42	nd	[25]
BDFP1.5	ApcF2	688	711	74000	5.0	38	2	[22]
GAF-FP	RpBphP1	635	670	49800	7.3	59	2	[26]
BphP1-FP	RpBphP1	640	669	60000	13	126	nd	[27]
miRFP670-2	RpBphP6	643	670	103000	13.6	226	227	[28]
miRFP682	RpBphP2	663	682	91000	11.2	165	165	[28]
miRFP702	RpBphP6	673	702	88000	8.1	115	115	[28]
miRFP703	RpBphP1	674	703	90900	8.6	127	37	[29]
miRFP709	RpBphP1	683	709	78400	5.4	69	30	[29]
miRFP713	RpBphP2	690	713	99000	7.0	111	112	[28]
miRFP720	RpBphP2	702	720	98000	6.1	97	116	[30]

* Яркость измеренная для очищенного препарат белка *in vitro*.

† Яркость при экспрессии в клетках млекопитающих.

Данные для белка в фотоактивированном состоянии.

‡ Измерено через 48 часов после трансфекции без использования экзогенного BV [21].

nd – показатель не измерялся.

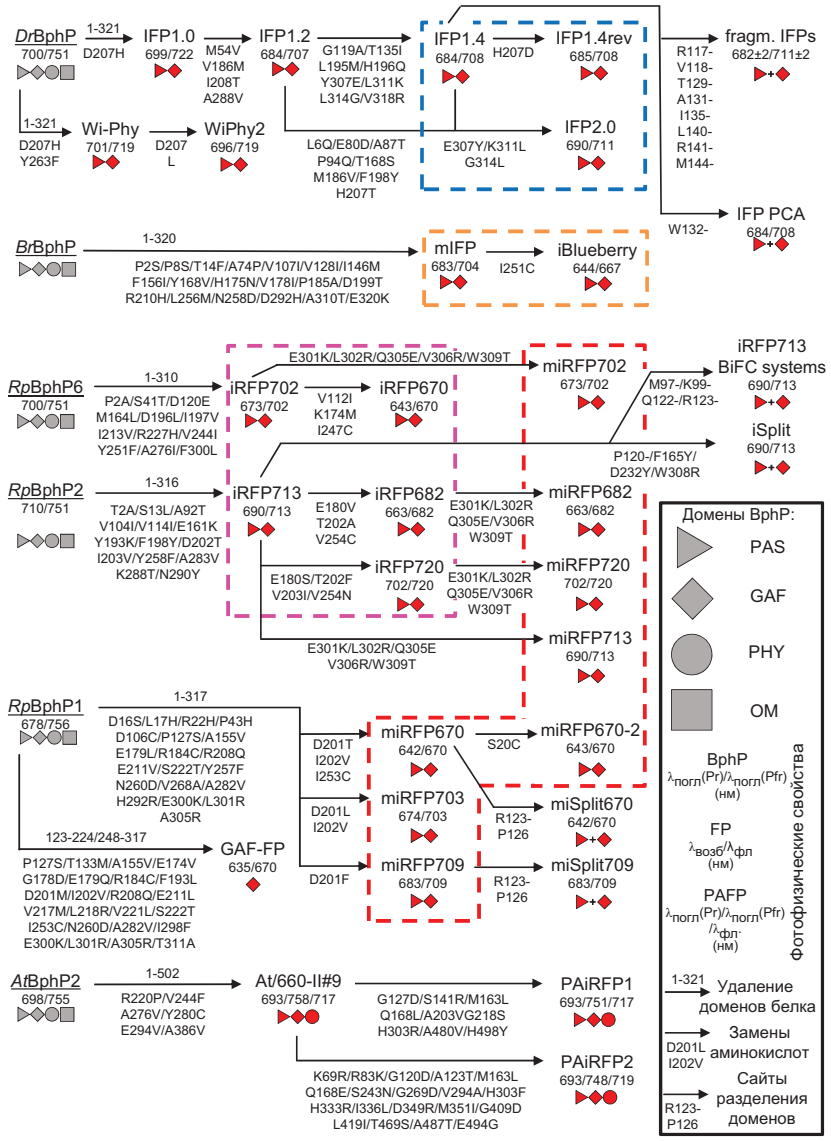

Рис. 2. Молекулярная эволюция NIR FP, полученных из BphP.

Нумерация аминокислотных замен указана согласно последовательности исходного белка (подчеркнуто) в каждом молекулярном филогенетическом дереве. Доменная структура FP показана красным цветом, а нативных BphP – серым. Показаны семейства IFP (пунктирная линия синего цвета), mIFP (пунктирная линия оранжевого цвета), iRFP (пунктирная линия пурпурного цвета), miRFP (пунктирная линия красного цвета).

для iRFP713 (табл.). Использование белков семейства iRFP дало возможность для многоцветного мечения и визуализации клеток и тканей в NIR спектральном диапазоне [12].

Продолжается поиск других белковых матриц для разработки NIR FP. Недавно новый NIR FP был создан на основе аллофикоцианина (cyanobacterial allophycocyanine (APC)) из цианобактерии *Trichodesmium erythraeum*. Нативный APC использует в качестве хромофора PCB. С помощью нескольких раундов случайного мутагенеза и направленной селекции удалось получить белок, названый smURFP, способный связывать BV вместо PCB [20]. Белок smURFP спектрально идентичен iRFP670, но имеет примерно в два раза большую молекулярную яркость. Однако из-за низкой константы связывания BV апоформой белка его яркость при экспрессии в HeLa клетках значительно уступает другим NIR FP и составляет всего около 2% от яркости iRFP713 в тех же условиях [21].

МОНОМЕРНЫЕ NIR FP

Несмотря на широкое применение белков семейств iRFP и IFP для мечения клеток и тканей при исследовании развития раковых опухолей, процессов регенерации тканей и распространения паразитарных инфекций в организме, склонность этих белков к образованию димеров ограничивает их использование при исследовании внутриклеточных процессов, где необходимо мечение отдельных целевых белков. Известно, что димеризация биомаркера может приводить к изменению нормальной функции меченного белка, образованию агрегатов [24], реорганизации органелл [31], и другим артефактам [32]. Мономерная организация биомаркера особенно важна при создании репортеров, использующих механизм ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET) [33], а также других биосенсоров. Дальнейшие усилия при конструировании NIR FP были направлены на создание спектрально различных, ярких и одновременно мономерных белков.

В экспериментах *in vitro* IFP1.4 [13] и его усовершенствованная версия IFP2.0 [17] были охарактеризованы как мономеры, однако позднее была показана их склонность к димеризации [24, 34]. Полученные в то же время белки серии Wi-Phy [18, 19] были также охарактеризованы как мономерные *in vitro*, но поведение этих FP при экспрессии в клетках не изучалось.

Первые мономерные NIR FP: mIFP [24] и iBlueberry [25], удалось получить используя в качестве матрицы бактериальный фитохром *Br*BphP из *Bradyrhizobium*, CBD которого не участвует в формировании димеров полноразмерного белка. NIR FP этой серии имеют низкую аффинность к BV и, как следствие, уступают по яркости в

клетках димерным iRFP (табл.). Использование mIFP и iBlueberry *in vivo* сопряжено с необходимостью использования экзогенного кофактора [21].

На основе фитохрома *Rp*BphP1 из *Rhodopseudomonas palustris*, используя имеющиеся данные о его структуре, были получены три мономерных белка miRFP670, miRFP703 и miRFP709 [29]. Мономеризации CBD фитохрома *Rp*BphP1 удалось достичь с помощью мутагенеза С-концевого α-спирального участка GAF домена, который наряду с α-спиральными участками PHY и эффекторного доменов образует область взаимодействия мономеров в димере нативного белка. На основании результатов успешной эволюции *Rp*BphP1, мономеризующие замены были введены в С-концевую α-спираль GAF домена димерных iRFP, что позволило получить полную линейку мономерных белков, спектрально идентичных димерным вариантам (рис. 2) [28, 30]. Благодаря высокой специфичности и аффинности к BV miRFP сохранили высокую яркость в клетках, характерную для димерных iRFP (табл.), что делает их перспективными для использования в многоцветной микроскопии сверхвысокого разрешения и визуализации молекулярно-биологических процессов в клетке.

Семейство NIR биомаркеров, полученных из *Rp*BphP1, также включает мономерный однодоменный GAF-FP [26], который имеет наименьшую молекулярную массу (19.6 кДа) по сравнению с другими NIR биомаркерами на основе BphP. Спектральные характеристики GAF-FP идентичны характеристикам miRFP670. Молекулярная эволюция GAF-FP негативно повлияла на аффинность и специфичность связывания BV белком. Белок GAF-FP более эффективно связывает PCB, чем BV и имеет низкую яркость при экспрессии в клетках HeLa без использования экзогенного BV.

Несколько мономерных NIR FP, названных BDFP, было получено из основной субъединицы ApcF2 фикобилисомы термофильной цианобактерии *Chroococcidiopsis thermalis* [22]. С помощью молекулярной эволюции удалось изменить природную специфичность ApcF2 к PCB таким образом, что BDFP приобрели способность связывать BV. Разрушение области взаимодействия мономеров в димере исходного белка ApcF2 привело к небольшой потере в яркости мономерных BDFP (см. табл.). BDFP имеют спектральные характеристики близкие к iRFP713, отличаются малым размером (~15 кДа), превосходной фото- и термостабильностью, высокой устойчивостью к денатурирующему воздействию химических агентов и низких значений pH вплоть до 2. Авторы предполагают, что высокая стабильность BDFP позволит использовать эти белки для визуализации молекулярно-биологических процессов в кислых условиях, встречающихся в некоторых

органеллах (лизосомы) и тканях (желудочно-кишечный тракт). BDFP имеют детектируемую флуоресценцию при экспрессии в клетках *Lactobacillus lactis*, культивированных в среде с pH 3. Тем не менее, яркость BDFP при экспрессии в клетках млекопитающих не превышает яркость smURFP (табл.), белки этой серии не были охарактеризованы *in vivo*.

III. ОСОБЕННОСТИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ИНЖЕНЕРИИ БЛИЖНЕ-ИНФРАКРАСНЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ

Фитохромы являются фоторецепторами, которые вовлечены в регуляцию клеточных сигнальных путей под действием света. Фитохромы воспринимают свет с помощью светочувствительного фотосенсорного модуля (PCM), содержащего ковалентно присоединенный хромофор, и передают этот сигнал на эффекторный модуль (OM), который запускает клеточный ответ. Хромофором BphP является линейный тетрапиррол BV, фитохромы цианобактерий и растений образуют комплексы с PCB и фитохромобилином, соответственно [15]. Доменная архитектура PCM BphP довольно консервативна и представлена доменами PAS (Per−ARNT−Sim), GAF (cGMP phosphodiesterase−adenylate cyclase−FhlA), и PHY (phytochrome-specific), соединенными α-спиральными линкерами (рис. 3, *а*) [15, 35, 36]. В BphP их природный хромофор BV ковалентно связан с консервативным цистеиновым остатком в N-концевом участке PAS домена и встроен в карман GAF домена (рис. 3, *б*) [37–39]. Хромофоры фитохромов цианобактерий и растений образуют ковалентную связь с консервативным остатком цистеина в GAF домене [15]. PHY домен, как считается, вовлечен в передачу структурных изменений в белке, которые происходят при фотоизомеризации хромофора под действием света, на OM (рис. 3, *а*) [36, 40].

При поглощении света BphP происходит фотоизомеризация хромофора, которая вызывает ряд изменений в структуре белка и приводит к его активации. Для получения флуоресцирующих белков на основе BphP, прежде всего, требуется блокировка процесса фотоконверсии хромофора, а также других путей безызлучательной дессипации энергии возбуждения хромофора. Разработка NIR FP основана на ингибировании процесса фотоконверсии посредством нарушения ключевого взаимодействия между остатком Asp207 (нумерация аминокислот указана согласно последовательности *Dr*BphP) в консервативном -PXSDIP- участке в GAF домене и консервативным остатком Arg472 в PHY домене, которое можно осуществить путем удаления PHY и OM в BphP [41]. Мутагенез CBD, состоящего из

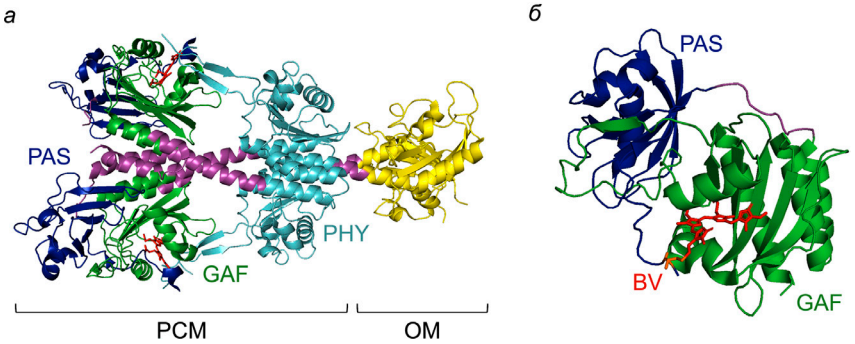

Рис. 3. Пространственная структура (*а*) BphP (XccBphP, PDB: 5akp [126]) и (*б*) NIR FP (miRFP703, PDB: 5vik [45]).

PAS домен выделен синим цветом, GAF домен – зеленым, PHY – голубым, OM – желтым, линкеры соединяющие домены – пурпурным. Хромофор BV, отмеченный красным, находится в кармане GAF домена и связан ковалентной связью с консервативным остатком цистеина (выделен оранжевым цветом) в N-концевом участке PAS домена.

двух доменов, PAS и GAF, показал, что замены аминокислот Asp207, Ile208 и Tyr263, которые входят в микроокружение хромофора NIR FP, необходимы для ингибирования безызлучательной диссипации энергии возбуждения хромофора [18, 42]. Анализ NIR FP на основе *Dr*BphP показал, что увеличение квантового выхода флуоресценции этих белков связано с увеличением жесткости хромофора. Было показано, что введение гидрофобного Leu вместо полярного Asp207 в белке Wi-Phy приводит к уменьшению количества связанной воды в хромофор-связывающем кармане белка, которое оказывает влияние на сеть водородных связей между пиррольными кольцами хромофора и аминокислотными остатками его микроокружения, тем самым ингибируя перенос протонов в возбужденном состоянии хромофора и уменьшая подвижность D-кольца хромофора [19]. С помощью методов молекулярной динамики и на основе данных о пространственной структуре *Dr*CBD и ряда IFP была показана возможность обмена молекул воды между карманом GAF домена, в котором расположен хромофор, и окружающим растворителем, что влияет на сеть водородных связей между хромофором и аминокислотами его микроокружения и на конформацию хромофора [43]. Было показано, что оба остатка – Thr207 с массивной гидрофобной метильной группой и крупный His207, могут эффективно предотвращать доступ воды в хромофор-связывающий карман IFP. При этом имидазольное

кольцо His207 может подвергаться быстрым вращениям, нарушая планарную конфигурацию хромофора. Это объясняет почему IFP2.0 с Thr207 имеет более высокий квантовый выход флуоресценции по сравнению с IFP1.4, содержащим His207 (табл.). Эти данные свидетельствуют о том, что введение остатка His в положение 207 не является необходимым для получения NIR FP с высоким квантовым выходом. Самый большой квантовый выход среди белков IFP имеет IFP1.4rev (8.7%), который содержит обратную замену His207 на Asp [44]. При изучении спектральных свойств мутантных вариантов iRFP713, содержащих замены, обратные тем, которые были введены при разработке этого биомаркера на основе *Rp*BphP2, было показано, что замены аминокислот, пространственно локализованных вдали от хромофора, также влияют на квантовый выход белка [42].

Необходимо отметить, что в случае разработки фотоактивируемых NIR биомаркеров PHY домен необходимо оставлять в составе белка для сохранения его способности к фотоконверсии из неактивного нефлуоресцирующего состояния в флуоресцирующее под действием света. Так на основании фитохрома *At*BphP2 из *Agrobacterium tumefaciens* C58 были получены димерные PAiRFP (табл., рис. 2) [23], фотоактивируемые светом с длинной волны 660 нм.

При разработке NIR FP стало очевидно, что белки, полученные в бактериях в условиях избытка BV, не всегда остаются яркими при экспрессии в клетках млекопитающих (табл.). Одной из причин получения неэффективных вариантов NIR FP может быть снижение их специфичности связывания BV. При исследовании флуоресцентных свойств мутантных форм *Dr*BphP [41] было показало, что белки серии IFP и Wi-Phy, содержащие остаток His207 вместо Asp207, способны связывать не только BV, но и протопорфирин IX, также присутствующий в клетках млекопитающих, в то время как NIR FP на основе *Dr*BphP, содержащие Leu207, способны взаимодействовать с BV с высокой специфичностью [19].

На примере miRFP670 было показано, что специфичность к BV может быть увеличена при помощи замены нескольких остатков Ser на Ala вблизи цистеинового остатка, по которому осуществляется ковалентное присоединение хромофора [45]. Полученный мутантный белок miRFP670/AAANCEA оказался наиболее ярким из созданных miRFP (яркость этого белка при экспрессии в клетках млекопитающих составляет 238% от яркости iRFP713).

Изучение фотофизических свойств NIR FP позволило понять механизмы, отвечающие за их спектральное разнообразие. В первых NIR FP, полученных на основе *Dr*BphP [13] и *Rp*BphP2 [11], BV был ковалентно связан с остатком Cys15 (Cys^{PAS}, рис. 4, а) в N-концевом

участке PAS домена (нумерация аминокислот указана согласно последовательности *Rp*BphP2). Возможно альтернативное ковалентное связывание BV с остатком Cys, введенным в консервативный участок -SPXH- в GAF домене NIR FP (Cys^{GAF}, рис. 4, б), которое приводит к гипсохромному сдвигу спектров поглощения и флуоресценции NIR FP на 30–40 нм по отношению к спектральным характеристикам NIR FP, содержащим консервативный Cys в PAS домене [25, 27, 46]. На основании данных рентгеноструктурного анализа и масс-спектрометрии, полученных для BphP1-FP с остатком Cys только в GAF домене, было показано, что гипсохромный сдвиг спектров поглощения и флуоресценции хромофора, ковалентно связанного с Cys^{GAF} обусловлен более короткой системой π-связей по сравнению с BV-Cys^{PAS} хромофором. На примере BphP1-FP, было показано, что BV может связываться с Cys^{GAF} через $C3^1$ или $C3^2$ атомы углерода боковой цепи пиррольного кольца A, при этом оба производных хромофора спектрально идентичны [27]. Для объяснения высокого квантового выхода NIR FP, спектры флуоресценции которых имеют гипсохромный сдвиг, были высказаны два предположения: хромофор, ковалентно связанный с Cys^{GAF}, имеет более жесткую структуру в связи с ограниченной подвижностью пиррольного кольца A; подвижность кольца A практически не влияет на свойства BV-Cys^{GAF} из-за, того, что оно в данном случае не включено в сопряженную систему π-связей [47]. Взаимодействие хромофора с димерными NIR FP регулируется аллостерическим влиянием мономеров этих белков друг на друга, к которому оказывается чувствительным и ряд спектральных характеристик белков. Было показано, что в димерных NIR FP, содержащих остатки Cys в GAF доменах и не содержащих остатки Cys в PAS доменах, ковалентное связывание BV с Cys в одном мономере белка ингибирует ковалентное связывание BV во втором мономере, поэтому второй мономер димера содержит нековалентно связанный BV [46]. Это приводит к появлению длинноволнового плеча в спектрах поглощения и флуоресценции димерных NIR FP, содержащих остатки Cys только в GAF доменах. В димерных NIR FP, содержащих оба остатка Cys в PAS и в GAF доменах, BV ковалентно связан с Cys^{GAF} в обоих мономерах белка, в результате чего, эти варианты NIR FP имеют высокий квантовый выход флуоресценции и узкие спектры поглощения и флуоресценции. На примере белков серии miRFP было показало, что BV может образовывать две ковалентные связи одновременно с Cys^{PAS} и Cys^{GAF} (рис. 4, в) [45]. Предполагается, что такая сшивка PAS и GAF доменов посредством BV может быть причиной высокой структурной стабильности NIR FP , содержащих оба остатка Cys в PAS и в GAF доменах [48, 49].

Выявлено еще несколько аминокислотных замен, введение которых приводит к изменению спектральных свойств NIR FP. Замена Val186Met в NIR FP, созданных на основе *Dr*BphP, приводит к 10-нм гипсохромному сдвигу спектров поглощения и флуоресценции [44]. Спектры поглощения и флуоресценции miRFP709 и miRFP703, которые отличаются двумя аминокислотными заменами (см. рис. 2) и содержат Phe и Leu в позиции 201, соответственно (нумерация аминокислот указана согласно последовательности *Rp*BphP1), сдвинуты друг относительно друга на 9 и 6 нм, соответственно. Рентгеноструктурные данные, полученные для miRFP709, позволили предположить, что введение ароматических аминокислот в микроокружение хромофора таким образом, чтобы их боковые радикалы могли участвовать в π-стэкинговом взаимодействии с BV, может вызывать батохромный сдвиг спектров поглощения и флуоресценции [45].

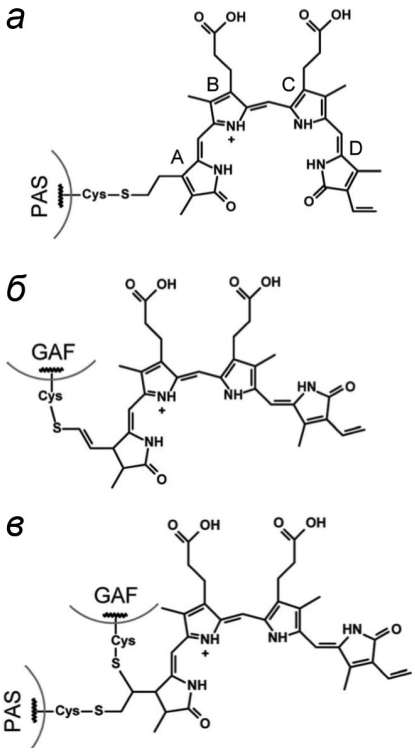

Рис. 4. Химическая структура разных производных хромофора BV (показаны пиррольные кольца A–D) в NIR FP (*а–в*). Адаптировано из [45] с разрешения The Royal Society of Chemistry по лицензии Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0.

При мечении клеточных белков и особенно при исследовании белок-белковых взаимодействий (PPI) часто оказывается критичным использование истинно мономерных биомаркеров. Очевидной стратегией создания мономерных NIR FP является поиск и использование BphP мономерных в нативной форме или переходящих в такое состояние при удалении PHY и OM. Например, при разработке mIFP был осуществлен поиск в базе данных последовательностей с анализом участков белков, гомологичных области взаимодействия мономеров в димере *Dr*BphP. В результате был обнаружен белок *Br*BphP, в котором на месте гидрофобного Leu располагался полярный Thr, что очевидно, исключало возможность образования сильного

гидрофобного взаимодействия между мономерами на данном участке [24]. Получение трех мономерных NIR FP из *Rp*BphP1 [29] стало возможно благодаря тому, что полноразмерный белок имеет область взаимодействия мономеров в димере, сформированную в основном PHY и OM [50]. Поскольку, как было сказано выше, логика получения FP из BphP подразумевает удаление этих доменов, оставшиеся после этого PAS-GAF формы ведут себя как мономеры [29]. Другая стратегия подразумевает мутагенез димерных NIR FP с целью разрушения области взаимодействия мономеров в димере с сохранением фотофизических характеристик. Рациональная эволюция димерного интерфейса iRFP720 привела к получению мономерного NIR FP с наибольшим батохромным сдвигом спектра флуоресценции на сегодняшний день [30]. Уменьшение молекулярной массы NIR FP с 35 кДа, что типично для CBD, до 19.6 кДа удалось достичь при создании GAF-FP [26], состоящего только лишь из GAF домена. Авторы перенесли остаток Cys, необходимый для связывания BV, из N-концевого участка PAS домена в GAF домен, в положение характерное для остатка Cys, с которым ковалентно связан хромофор цианобактериальных и растительных фитохромов. Тем не менее, последующее удаление PAS домена привело к критической дестабилизации структуры белка с образованием видимых агрегатов. Стабилизации структуры удалось достичь удалением петли, участвующей в формировании структуры узла полипептидных цепей PAS и GAF домена в BphP, но которая отсутствует, как было замечено, в стабильных цианобактериохромах [26].

Двухдоменная структура NIR FP на основе BphP существенно облегчает задачу разработки PPI репортеров. Однако необходимо учитывать, что BphP содержат необычный структурный элемент – узел типа восьмерки, в формирование которого вовлечены N-концевой участок PAS домена и неструктурированная петля GAF домена белка [35]. На примере iRFP713 и IFP1.4 было показано, что их расщепление при разработке PPI репортеров допустимо главным образом в N-концевом неструктурированном участке PAS домена, неструктурированной петле между PAS и GAF доменами, прилегающей к этой петле α-спирали GAF домена, и петлях между β-тяжами в PAS домене [51, 52]. NIR FP не допускают круговых перестановок по сайтам в петле GAF-домена, участвующей в образовании узла [52]. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что некоторые PPI репортеры на основе iRFP и IFP при восстановлении из двух частей белка должны сохранять узел в своей структуре, присущий нативному белку. Ряд других факторов противоречат этому предположению. Например, репортер

PPI iSplit (рис. 2), полученный разделением iRFP713 на две части, при их объединении имеет меньшую стабильность по отношению к исходному NIR FP внутри клетки [53]. Было показано, что белки, содержащие узлы в своей структуре могут обладать высокой стабильностью внутри клетки, поскольку узлы являются стерическим препятствием для прохождения белка внутрь поры протеасомы, что замедляет его деградацию [54, 55]. Кроме того, было показано, что IFP PCA – репортер PPI, состоящий из двух частей IFP1.4 (рис. 2), способен к обратимой ассоциации [56]. Белки, содержащие узлы, вряд ли будут легко диссоциировать, поскольку узлы обычно настолько стабильны, что сохраняются даже в белках денатурированных с помощью химических денатурантов [57]. Обратимость же ассоциации составных частей IFP PCA возможно обусловлена нековалентным связыванием BV.

IV. ПРИМЕНЕНИЕ БЛИЖНЕ-ИНФРАКРАСНЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БИОМАРКЕРОВ, РЕПОРТЕРОВ И БИОСЕНСОРОВ

NIR FP были использованы для решения широкого ряда фундаментальных и прикладных задач в биологии и медицине. Благодаря NIR флуоресценции основной областью применения NIR FP стало мечение клеток и тканей организма при визуализации биологических процессов *in vivo*. Одним из наиболее востребованных биомаркеров остается iRFP713 из-за его высокой яркости в клетках, низкой цитотоксичности и стабильной экспрессии в клетках млекопитающих [5, 6, 11, 12, 25, 29, 58–83]. На основе iRFP713 были разработаны высокопроизводительные системы подсчета и анализа клеток в культуре, которые могут использоваться для скрининга веществ с противоопухолевой активностью и терапевтических препаратов [63, 74]. Низкая цитотоксичность iRFP713 позволила получить линии трансгенных мышей и крыс с высоким уровнем экспрессии биомаркера во всех тканях, включая ткани нервной, сердечно-сосудистой и пищеварительной систем [5, 64, 69, 75]. Помимо млекопитающих, список организмов, в которых NIR FP были успешно экспрессированы, включает бактерии (*Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, несколько видов *Lactobacillus*) [11–13, 22, 24, 26, 29, 59], дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae, Kluyveromyces lactis*, *Pichia pastoris*) [56], простейшие (несколько видов *Leishmania*) [60, 73], насекомые (*Drosophila melanogaster*) [17, 24, 64, 84], нематоды (*Caenorhabditis elegans*) [22] и рыбы (*Danio rerio*) [24, 25].

Спектральные свойства NIR FP позволяют использовать их совместно с флуоресцентными маркерами и оптогенетическими инструментами, работающими в видимом спектральном диапазоне [65, 66, 76, 85, 86]. Например, iRFP670 был использован совместно с mCherry и оптогенетическим инструментом OptoSTIM1, позволяющим осуществлять регуляцию внутриклеточного уровня кальция при помощи облучения синим светом [86]. Химерный белок, состоящий из iRFP713 и участка плекстрин-гомологичного домена $PLC_{\delta 1}$, использовали для изучения динамики фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфата на мембране клетки при его дефосфорилировании при помощи оптогенетических инструментов на основе криптохрома CRY2, контролируемых синим светом [65]. С помощью iRFP713 отслеживалось движение ядра при оптогенетической стимуляции сокращения мышечных клеток с помощью ChR2 [76].

Следует отметить, что поскольку подавляющее большинство биосенсоров и оптогенетических инструментов, используемых в молекулярной нейробиологии, оперируют в видимой части спектра, применение NIR FP представляется особенно перспективным в данной области. Однако в связи с низким уровнем BV в нейронах, их визуализация при помощи биомаркеров с невысоким сродством к BV, например, NIR FP серий IFP и mIFP и smURFP, сопряжена с необходимостью введения экзогенного BV или коэкспрессии HO [17, 20, 24, 29]. При использовании NIR FP серий iRFP и miRFP, обладающих относительно высокой аффинностью к BV, для мечения первичных нейронов гиппокампа [29, 87], нейронов сетчатки [88], кортикальных нейронов мышей и крыс *in vivo* [75, 81, 87] не было необходимости вводить экзогенный BV. Необходимо учитывать, что BV в организме участвует в защите клеток от оксидативного стресса [89] и активации сигнальных путей [90–92], влияет на жизнеспособность и пролиферацию клеток [93]. Фермент HO играет ключевую роль в катаболизме гема, и его избыточная экспрессия может влиять на физиологию клетки [94–96]. Таким образом, увеличение концентрации BV выше физиологических значений или ко-экспрессия HO, может приводить к артефактам и нежелательным метаболическим эффектам в культуре клеток и *in vivo*.

Основным преимуществом использования NIR FP для визуализации процессов в тканях и органах животных является эффективное прохождение возбуждающего света вглубь биологических тканей и флуоресценции через биологические ткани, при их низкой автофлуоресценции в NIR области спектра. Стабильность и низкая цитотоксичность NIR FP позволяют использовать данные биомаркеры

для продолжительной визуализации клеток внутри организма и отслеживания их миграции при патологических процессах внутри организма на модельных животных. Экспрессия iRFP713 в клетках-предшественниках кардиомиоцитов дала возможность наблюдать за процессом восстановления мышечной ткани сердца при ишемии у мыши [6]. Гематопоэтические стволовые клетки, меченные iRFP713, были успешно использованы для наблюдения за восстановлением популяции клеток крови у облученных мышей [5]. iRFP713 неоднократно использовали при изучении роста и метастазирования различных опухолей в модельных животных: воспалительного рака молочной железы [58], аденокарциномы молочной железы [83], первичной меланомы [67] и рака простаты [82]. Использование iRFP720 позволило исследовать процесс метастазирования рака простаты в кости в живых мышах [97]. Белки серии iRFP были успешно использованы для визуализации опухолей внутренних органов в живой мыши [11, 12, 68, 79, 98]. Использование фотоактивируемых белков PAiRFP позволяет значительно увеличить контрастность изображения, благодаря регистрации разностного сигнала в двух фотосостояниях PAiRFP, что было продемонстрировано на примере визуализации опухолей на ранней стадии их развития у мыши [23].

iRFP670 был использован при изучении эффективности нового метода доставки малых интерферирующих РНК (siRNA) в раковые клетки внутричерепной глиобластомы в мыши [99]. С этой целью получили клетки глиобластомы, стабильно экспрессирующие химерный белок, состоящий из iRFP670 и белка-мишени siRNA. Таким образом, эффективность доставки и РНК интерференции siRNA количественно и в реальном времени определялась по уменьшению сигнала флуоресценции репортера.

Были получены линии трансгенных мышей [64] и несколько линий трансгенных крыс [75], в которых экспрессия iRFP713 индуцируется под действием Cre рекомбиназы. Было показано, что одного аллеля iRFP713 достаточно для эффективной визуализации [64], что является необходимым для получения производных линий мышей путем скрещивания. Использование подобных линий мышей с индуцируемой экспрессией iRFP713 позволяет получать линии трансгенных мышей для изучения развития рака легких и поджелудочной железы (рис. 5) [64].

Биолюминесцентные методы визуализации из-за низкого фонового сигнала часто являются более чувствительными по сравнению с флуоресцентными методами. Химерные NIR люциферазы iRFP670–

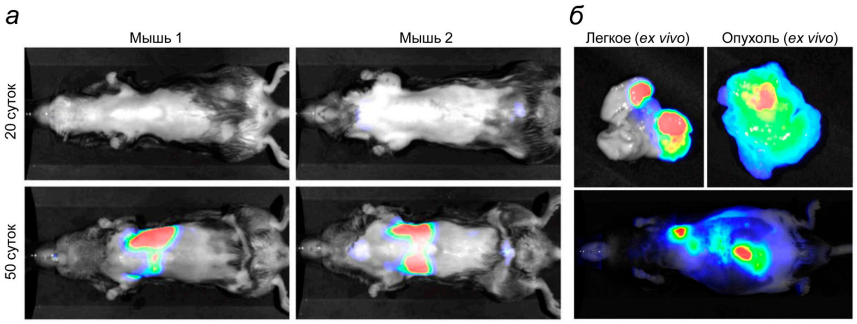

Рис. 5. Визуализация развития опухоли в трансгенных животных с помощью NIR флуоресценции.

а – мышиная модель рака легкого; сигнал флуоресценции iRFP713 измерен через 20 (верхняя панель) и 50 дней (нижняя панель) после интраназального введении аденовирусов, несущих ген Cre рекомбиназы;

б – мышиная модель рака поджелудочной железы с iRFP713 репортером, в легком отчетливо обнаруживаются метастазы (нижняя панель); легкое и опухоль после резекции для подтверждения источника сигнала (верхняя панель). Адаптировано из [64] с разрешения Nature Publishing Group по международной лицензии Creative Commons Attribution 4.0.

RLuc8 и iRFP720–RLuc8, сочетающие в себе преимущества биолюминесценции и NIR-флуоресценции, были использованы для многоцветной визуализации роста и метастазирования аденокарценомы молочной железы *in vivo* (рис. 6) [100]. С помощью химерной люциферазы luc2-iRFP720 была выполнена визуализация миграции человеческих мезинхимальных стволовых клеток после их трансплантации в кору головного мозга мыши [101]. Стабильность и низкая цитотоксичность данного биомаркера вместе с высокой чувствительностью метода позволяли обнаруживать малые количества этих клеток (1×10^5) в течении 7 недель.

Мечение с помощью NIR FP вирусных частиц и паразитических микроорганизмов дает возможность изучать распространение инфекции в модельном организме и потенциально может использоваться для тестирования терапевтических средств. Для изучения патологий разной этиологии в живых мышах были использованы клетки *Leishmania*, экспрессирующие iRFP713 [60, 73], вирусы гриппа А [77] и бешенства [102], в геном которых был внедрен ген iRFP713 или iRFP670 и iRFP720, соответственно.

Спектрально различные NIR FP могут быть использованы для одновременной визуализации нескольких тканей и органов. Было показано, что до пяти клеточных популяций, меченных различными

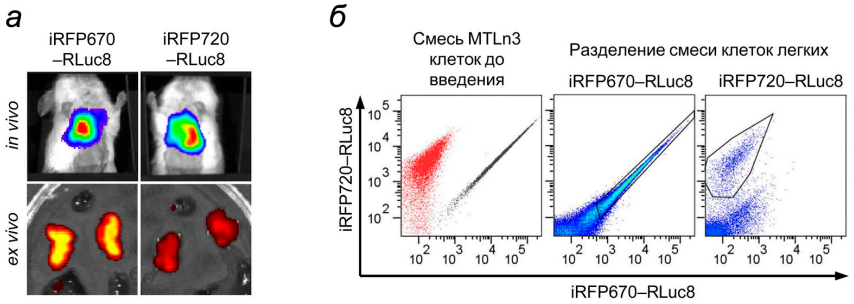

Рис. 6. Визуализация метастазирования клеток аденокарциномы MTLn3, экспрессирующих химерные NIR люциферазы iRFP670–RLuc и iRFP720–RLuc, в мыши: *а* – *in vivo* визуализация сигнала биолюминесценции (верхняя панель) и флуоресценция извлеченных органов (нижняя панель); *б* – проточная цитометрия смеси MTLn3 клеток, использовавшихся для инъекции в молочные железы мыши (слева, сигнал iRFP670–RLuc8 показан красным цветом, iRFP720–RLuc8 – серым), и клеток тканей легкого, извлеченных через 4 недели после инъекции. Адаптировано из [100] с разрешения Nature Publishing Group по международной лицензии Creative Commons Attribution 4.0.

iRFP, может быть разрешено в NIR диапазоне при проведении проточной цитометрии с использованием метода спектральной деконволюции [103]. Одновременная визуализация *in vivo* до пяти подкожно расположенных опухолей, меченных различными iRFP, также возможна с применением специальных алгоритмов обработки сигнала [12]. Использование для мечения пар NIR FP (например, iRFP670 и iRFP713 или miRFP670 и miRFP709), которые имеют спектры флуоресценции с разницей более 35 нм между их максимумами, дает возможность получать многоцветные изображения клеток и органов в NIR диапазоне без сложных процедур обработки сигнала [12, 25, 29, 59].

Создание мономерных NIR FP существенно расширило цветовую палитру маркеров, пригодных для мечения отдельных белков, дополнив мономерные GFP-подобные белки. Мономерные mIFP и белки серии miRFP были использованы совместно с TagGFP2 и mCherry для получения изображений с высоким разрешением с помощью многоцветной микроскопии структурированного освещения (SIM) [24, 29]. Мономерные BDFP [22] также продемонстрировали высокую фотостабильность при использовании их в SIM микроскопии.

РЕПОРТЕРЫ И БИОСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ NIR FP

На базе GFP-подобных белков было разработано множество биосенсоров и репортеров различных молекулярно-биологических процессов. Однако применение этих конструкций в экспериментах *in vivo*

затруднено из-за того, что они флуоресцируют в видимом диапазоне спектра. NIR биосенсоры имеют такие же преимущества, как и NIR биомаркеры, определяющиеся низким рассеянием и поглощением света в NIR диапазоне в тканях животных. Расширение цветовой палитры имеющихся биосенсоров и репортеров также увеличивает возможности многоцветного мечения.

Идентификация PPI дает информацию о функции взаимодействующих белков, их локализации, участии в сигналинге, и формировании белковых комплексов. Репортеры PPI представляют собой две части сенсорного белка, которые в составе химерных конструкций с целевыми белками способны генерировать или изменять выходной сигнал при взаимодействии целевых белков между собой или их колокализации в клетке. Основные подходы к изучению PPI основаны на явлениях бимолекулярной комплементации флуоресценции (BiFC) и FRET. BiFC репортеры состоят из двух нефлуоресцирующих частей флуоресцентного маркера, сближение которых, опосредованное взаимодействием слитых с ними целевых белков, приводит к восстановлению исходной структуры флуоресцентного маркера и появлению флуоресценции [104–106]. В FRET биосенсорах используют FRET пару интактных биомаркеров [107–109].

Двухдоменная организация NIR FP оказалась удобной для разработки BiFC репортеров PPI. Первый NIR PPI репортер, названый iSplit, был получен разделением iRFP713 на отдельные PAS и GAF домены с применением направленного мутагенеза (см. рис. 2) [53]. iSplit имеет высокий контраст BiFC, восстановленная форма iSplit в значительной мере сохраняет фотофизические свойства исходного белка, включая высокое сродство к BV. Позднее было создано несколько iRFP713 BiFC [110] (см. рис. 2) с другим положением сайта расщепления, которые имели меньший контраст *in vivo* по сравнению с iSplit [110]. Процесс сборки iSplit и iRFP713 BiFC, как и большинства PPI репортеров на основе GFP-подобных белков [104], является необратимым.

С использованием данных о структуре *Dr*BphP на основе IFP1.4 были созданы репортеры PPI: IFP PCA (protein complementation assay) [56] и набор фрагментированных IFP (fragmented IFP) [51] (см. рис. 2). Эксперименты в клетках млекопитающих показали, что комплементация флуоресценции IFP PCA обратима. Фрагментированные IFP не были протестированы в клетках млекопитающих. Эти репортеры PPI унаследовали недостатки IFP1.4 – необходимость дополнительного внесения хромофора и низкую яркость при экспрессии в клетках животных.

На основе мономерных белков miRFP670 и miRFP709, с помощью внесения разрыва между PAS и GAF доменами (см. рис. 2), были получены спектрально различные мономерные репортеры PPI, названные соответственно miSplit670 и miSplit709 [29]. Обе системы позволяют детектировать PPI с высоким контрастом комплементации флуоресценции, при этом объединение составных частей системы необратимо. Восстановленные miSplit670 и miSplit709 сохраняют более 40% яркости исходных белков. Преимуществом этих систем по сравнению с iSplit, благодаря более слабой самоассоциации, является их более низкий фоновый сигнал. Системы miSplit670 и miSplit709 имеют в своем составе одинаковый PAS домен, но отличаются GAF доменами, в которые введены мутации, определяющие спектральные свойства восстановленных белков. Поэтому одновременное использование miSplit670 и miSplit709 делает возможным регистрацию взаимодействия белка, меченного PAS доменом, с двумя другими белками, меченными разными GAF доменами, в клетке. Было показано, что miSplit670 и miSplit709 могут использоваться для детекции РНК с высокой чувствительностью, что обусловлено высоким контрастом и низкой автофлуоресценцией этих систем [29].

На основе фотосенсорного модуля белка *Dr*BphP был получен первый сенсор PPI, названный *Dr*Split, объединение двух частей которого, состоящих из PAS и GAF-PHY доменов, соответственно, приводит к образованию сенсорной молекулы, способной к фотоконверсии между двумя фотосостояниями при облучении светом с определенной длиной волны [111]. Поскольку в этом случае выходным сигналом является не флуоресценция, а ультразвуковые волны, явление получило название бимолекулярной фотоакустической комплементации (BiPC). *Dr*Split был протестирован в клетках и *in vivo* в составе белков слияния с парой FRB и FKBP, способных образовывать гетеродимеры в присутствии рапамицина. Использование этого BiPC репортера позволило регистрировать PPI на глубине 9.3 мм в клетках метастазирующей опухоли (рис. 7), а также в печени мыши с достижением пространственного разрешения 125 мкм и пределом чувствительности в 530 клеток [111].

Для регистрации протеазной активности в клетках при апоптозе было создано несколько репортеров. NIR биосенсор протеазной активности, названный iProtease, был получен с помощью рационального дизайна и круговой перестановки последовательности в mIFP. В полученную на основе mIFP конструкцию был введен целевой сайт расщепления таким образом, чтобы не допустить связывания хромофора репортером в нерасщепленной форме [84]. В этой же работе был получен репортер iCasper, активируемый каспазами

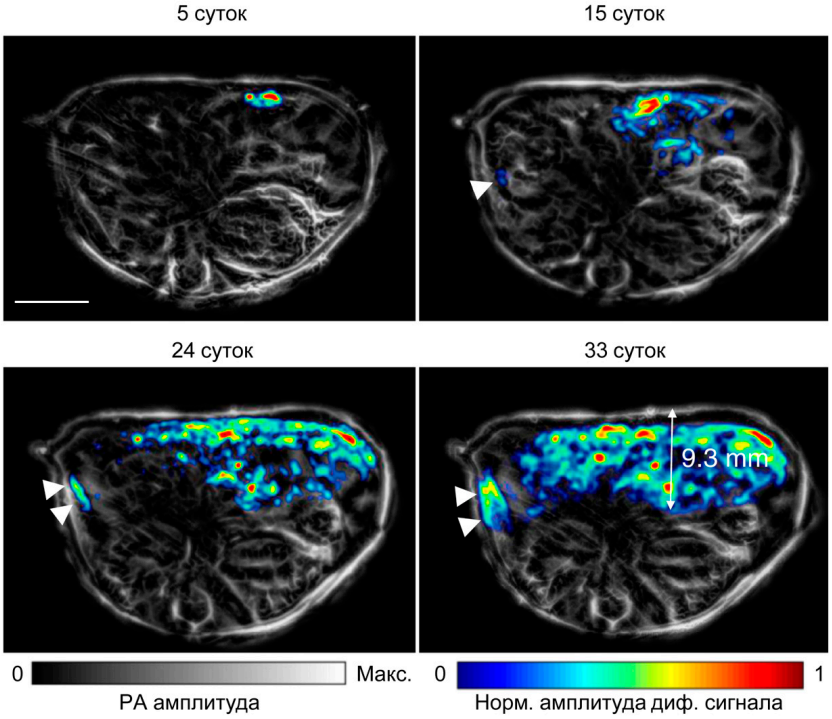

Рис. 7. Визуализация белок-белковых взаимодействий в растущей и метастазирующей опухоли в печени мыши методом RSPACT.

Клетки аденокарциномы, экспрессирующие *Dr*Split сенсор рапамицина, были инъецированы в печень мыши. Перед получением каждого изображения за ~40–44 часа производили инъекцию рапамицина в хвостовую вену мыши. Белые стрелки указывают на появление вторичной опухоли. Анатомическое изображение показано в черно-белой гамме, разница в фотоакустическом сигнале сенсора показана с помощью псевдоцветовой шкалы. Масштаб, 5мм. Адаптировано из [111] с разрешения Nature Publishing Group по международной лицензии Creative Commons Attribution 4.0.

3 и 7, который был использован для визуализации апоптоза при морфогенезе и онкогенезе в личинках *Drosophila*. Для регистрации активности каспаз также были созданы FRET сенсоры апоптоза, состоящие из дальнего красного GFP-подобного белка (mKate2 или eqFP650), соединенного с NIR FP iRFP713 посредством линкера с сайтом расщепления [112].

Мономерные miRFP670 и miRFP720 образуют эффективную FRET пару [30], которая может быть использована для создания FRET

биосенсоров, поглощающих и флуоресцирующих в NIR диапазоне спектра. Пара miRFP670 и miRFP720 была использована в разработке NIR биосенсора на активность Rac1 ГТФазы. Было показано, что данный NIR биосенсор может использоваться вместе с CFP-YFP FRET биосенсорами и оптогенетическими инструментами, активируемыми в сине-зеленом диапазоне спектра [30]. Более того, авторы создали NIR биосенсоры активности киназ PKA и JNK, заменяя донор-акцепторные пары CFP-YFP на miRFP670-miRFP720 в улучшенных версиях сенсоров AKAR и JNKAR [109].

Используя дизайн и принцип работы FUCCI (fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator) сенсоров на основе GFP-подобных белков [113], созданы NIR репортеры клеточного цикла на основании пар miRFP670/miRFP709 [29] и IFP2.0/smURFP [20]. Цикличная деградация белков Gem и Cdt1 и регистрация флуоресценции биомаркеров, которыми они мечены, позволяют визуализировать динамику клеточного цикла в реальном времени. NIR репортеры клеточного цикла были протестированы в клетках млекопитающих [20, 29] и *in vivo* [29].

Химерный белок, состоящий из немодифицированного miRFP703 и ядерного фактора IκBα, который ингибирует фактор транскрипции NF-κB, представляет собой сенсор активации сигнального пути NF-κB в ответ на различные стимулы, такие как присутствие бактериальных и вирусных продуктов, фактора некроза опухолей α и других цитокинов. Активация NF-κB обусловлена фосфорилированием и быстрой деградацией фактора IκBα и, таким образом, может быть зарегистрирована по угасанию флуоресценции miRFP703 [29]. Использование сенсора активации NF-κB *in vivo* продемонстрировало уменьшение флуоресценции биосенсора в три раза в результате острого воспаления печени мыши.

V. БЛИЖНЕ-ИНФРАКРАСНЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ БЕЛКИ В ПЕРЕДОВЫХ ТЕХНОЛОГИЯХ ВИЗУАЛИЗАЦИИ

Появление новых технологий и методов визуализации, как правило, связано с созданием молекулярных инструментов, позволяющих реализовывать данные методы [114]. Появление NIR FP способствовало развитию и расширению возможностей технологий для прижизненной визуализации биологических процессов, происходящих глубоко в тканях организма.

Возможность трехмерной реконструкции организма дают методы флуоресцентной молекулярной томографии (FMT) [115]. В FMT

реконструкция пространственного изображения производится с помощью последовательного сканирования образца. Используя метод FMT было получено двухцветное трехмерное изображение близко расположенных опухоли и печени, меченных разными iRFP [12]. С помощью FMT оценивалась эффективность воздействия терапевтических препаратов на опухолевые клетки, экспрессирующие iRFP720 [116]. Метод FMT с использованием алгоритма спектральной деконволюции позволил одновременно наблюдать за прохождением двух популяций молочнокислых бактерий, экспрессирующих iRFP713 или iRFP682, через желудочно-кишечный тракт мыши [59].

Получение гибридных изображений при использовании FMT совместно с методами рентгеновской компьютерной томографии (XCT) и позитронно-эмиссионной томографии (PET) позволяет более точно определить локализацию целевых клеток внутри организма. Гибридные технологии FMT-XCT и FMT-PET-XCT использовали для визуализации iRFP713-меченных клеток глиомы мозга [61], легочной аденокарциномы [70], и опухоли простаты [71] в живой мыши.

Чувствительность регистрации флуоресцентного сигнала в условиях высокой автофлуоресценции тканей может быть значительно увеличена при помощи метода измерения кривых затухания флуоресценции (TD). Этот подход основан на различии времен жизни флуоресценции биомаркера и флуоресцирующих молекул биологических тканей. Различие времен жизни флуоресценции разных iRFP делает возможным многоцветную визуализацию при использовании метода TD. Высокая чувствительность этого подхода позволила детектировать малые количества раковых клеток (5×10^4), экспрессирующих iRFP720, введенных в легкие мыши [117].

Фотоакустический эффект (PA) представляет собой явление генерирования ультразвуковых волн тканями при термоупругом расширении, вызванном поглощением ультракоротких световых импульсов. Основанные на PA методы визуализации позволяют достичь высокого пространственного разрешения и проводить измерения на большей глубине *in vivo* по сравнению с флуоресцентными методами, благодаря меньшему рассеянию ультразвуковых волн в тканях даже по сравнению со светом NIR спектрального диапазона [118]. С помощью PA томографии, используя iRFP713 для мечения раковых клеток, были получены изображения опухоли молочной железы, расположенной на глубине 4 мм [62], и глиобластомы в мозге мыши с разрешением около 0.1 мм [61, 80]. Метод проточной PA цитофлуориметрии использовали для наблюдения за клетками, меченными iRFP713, в кровеносных сосудах живой мыши [72]. Метод PA томографии позволил

визуализировать две опухоли, экспрессирующие iRFP670 и iRFP720, в мыши на глубине 8 мм с субмиллиметровым разрешением [69].

Мечение раковых клеток двумя зондами, iRFP720 и золотыми, покрытыми диоксидом кремния, наностержнями (silica-coated gold nanorods, GNR), позволило визуализировать их с помощью метода мультиспектральной оптоакустической томографии (MSOT), основанном на PA. При этом визуализация раковых клеток непосредственно после их инъекции в сердце мыши была выполнена при помощи регистрации сигнала GNR, на более поздних сроках (вплоть до 40 дней после инъекции) измеряли сигнал iRFP720 [4]. Метод MSOT позволил в реальном времени изучать превращение клеток белой жировой ткани в бежевые (beige adipocytes) при адренергической стимуляции в мыши и связанное с этим изменение липидного метаболизма [119]. В качестве зонда использовался iRFP720, который доставлялся в жировую ткань с помощью аденовирусного вектора. Об изменении типа адипоцитов судили по увеличению уровня сигнала iRFP720, экспрессия которого находилась под контролем промотора *Ucp1* и коррелировала с экспрессией белка Ucp1, специфичного для бежевых адипоцитов.

Использование способности к переключению между двумя фотосостояниями под действием света, характерной для полноразмерных BphP *Rp*BphP1 [111, 120] и AGP1 [121, 122], а также биомаркеров на основе *Dr*BphP [111], позволило увеличить чувствительность метода PA томографии. Эта модификация PA томографии, названная RSPACT (reversibly switchable photoacoustic computed tomography), основана на построении дифференциальных изображений для уменьшения фонового сигнала тканей. Использование RSPACT с *Rp*BphP1 в качестве биомаркера сделало возможным наблюдение за ростом и метастазированием опухоли на глубине до 10 мм со ~100 мкм разрешением [120]. На основе *Dr*BphP был разработан NIR фотохромный зонд *Dr*BphP-PCM для использования в методе RSPACT [111], который по сравнению с *Rp*BphP1 имеет в два раза меньший размер, быстрее принимает нативную структуру в клетке и обеспечивает более высокий контраст фотопереключения. Благодаря различным характеристикам затухания сигнала *Rp*BphP1 и *Dr*BphP-PCM были использованы одновременно для визуализации двух опухолей в печени мыши с высоким контрастом на глубине 9.1 мм [111]. Использование RSPA микроскопии позволило получить изображение нескольких слоев клеток глиобластомы U87 с аксиальным разрешением около 0.4 мкм и латеральным разрешением около 141 нм [120].

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стремительный рост разнообразия генетически кодируемых NIR биомаркеров и развитие связанных с ними передовых методов визуализации делает возможным наблюдение физиологических и молекулярно-биологических процессов на относительно большой глубине в биологических тканях с высокой точностью и пространственным разрешением. NIR FP обладают большим потенциалом для решения задач визуализации на разных уровнях: от мечения внутриклеточных структур до мечения тканей и органов целого организма. NIR FP уже нашли применение в различных областях, включая фундаментальные исследования клеточных процессов, прижизненные исследования развития заболеваний различной этиологии на животных моделях, доклинические исследования терапевтических препаратов, как на клеточных культурах, так и на животных моделях.

Несмотря на разработку спектрально различных ярких и мономерных NIR биомаркеров остается вопрос, возможна ли дальнейшая оптимизация фотофизических свойств этих белков, существенных для их использования в качестве биомаркеров? Возможно ли с помощью методов молекулярной эволюции получить NIR биомаркеры меньшего размера, с большим квантовым выходом и с большим батохромным сдвигом спектров поглощения и флуоресценции?

Мы ожидаем появление целого ряда NIR биосенсоров на различные ключевые молекулы в сигнальных каскадах, включая Ca^{2+}, цАМФ, ГТФазы и киназы, на основе, ярких и мономерных NIR биомаркеров последнего поколения. Пополнение NIR биосенсорами молекулярного инструментария, включающего биосенсоры на основе GFP-подобных белков и оптогенетические конструкции на основе различных фоточувствительных молекул, работающие в видимом спектральном диапазоне, вследствие увеличения возможного количества меченых биологических молекул для одновременной визуализации, откроет новые возможности изучения сложных и зависимых клеточных процессов при одновременном управлении клеточными функциями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Weissleder, R., and Ntziachristos, V. (2003) Shedding Light onto Live Molecular Targets, *Nature Medicine*, **9**, 123–128.
2. Weissleder, R. (2001) A Clearer Vision for in Vivo Imaging, *Nature Biotechnology*, **19**, 316.
3. Hong, G., Antaris, A.L., and Dai, H. (2017) Near-Infrared Fluorophores for Biomedical Imaging, *Nature Biomedical Engineering*, **1**, 0010.
4. Comenge, J., Sharkey, J., Fragueiro, O., Wilm, B., Brust, M., Murray, P., Levy, R., and Plagge, A. (2018) Multimodal Cell Tracking from Systemic Administration to Tumour Growth by Combining Gold Nanorods and Reporter Genes, *eLife*, **7**, e33140.
5. Tran, M.T.N., Tanaka, J., Hamada, M., Sugiyama, Y., Sakaguchi, S., Nakamura, M., Takahashi, S., and Miwa, Y. (2014) In Vivo Image Analysis Using IRFP Transgenic Mice, *Experimental Animals*, **63**, 311–319.
6. Wang, Y., Zhou, M., Wang, X., Qin, G., Weintraub, N.L., and Tang, Y. (2014) Assessing in Vitro Stem-Cell Function and Tracking Engraftment of Stem Cells in Ischaemic Hearts by Using Novel IRFP Gene Labelling, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **18**, 1889–1894.
7. Piatkevich, K.D., Malashkevich, V.N., Morozova, K.S., Nemkovich, N.A., Almo, S.C., and Verkhusha, V.V. (2013) Extended Stokes Shift in Fluorescent Proteins: Chromophore–Protein Interactions in a Near-Infrared TagRFP675 Variant, *Scientific Reports*, **3**, 1847.
8. Li, Z., Zhang, Z., Bi, L., Cui, Z., Deng, J., Wang, D., and Zhang, X.-E. (2016) Mutagenesis of MNeptune Red-Shifts Emission Spectrum to 681–685 Nm, *PLOS ONE*, **11**, e0148749.
9. Morozova, K.S., Piatkevich, K.D., Gould, T.J., Zhang, J., Bewersdorf, J., and Verkhusha, V.V. (2010) Far-Red Fluorescent Protein Excitable with Red Lasers for Flow Cytometry and Superresolution STED Nanoscopy, *Biophysical Journal*, **99**, L13–L15.
10. Auldridge, M.E., and Forest, K.T. (2011) Bacterial Phytochromes: More than Meets the Light, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, **46**, 67–88.
11. Filonov, G.S., Piatkevich, K.D., Ting, L.-M., Zhang, J., Kim, K., and Verkhusha, V.V. (2011) Bright and Stable Near-Infrared Fluorescent Protein for in Vivo Imaging, *Nature Biotechnology*, **29**, 757–761.
12. Shcherbakova, D.M., and Verkhusha, V.V. (2013) Near-Infrared Fluorescent Proteins for Multicolor in Vivo Imaging, *Nature Methods*, **10**, 751–754.
13. Shu, X., Royant, A., Lin, M.Z., Aguilera, T.A., Lev-Ram, V., Steinbach, P.A., and Tsien, R.Y. (2009) Mammalian Expression of Infrared Fluorescent Proteins Engineered from a Bacterial Phytochrome, *Science (New York, N.Y.)*, **324**, 804–807.
14. Fischer, A.J., and Lagarias, J.C. (2004) Harnessing Phytochrome's Glowing Potential, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101**, 17334–17339.
15. Rockwell, N.C., and Lagarias, J.C. (2010) A Brief History of Phytochromes, *Chemphyschem: A European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry*, **11**, 1172–1180.
16. Chernov, K.G., Redchuk, T.A., Omelina, E.S., and Verkhusha, V.V. (2017) Near-Infrared Fluorescent Proteins, Biosensors, and Optogenetic Tools Engineered from Phytochromes, *Chemical Reviews*, **117**, 6423–6446.
17. Yu, D., Gustafson, W.C., Han, C., Lafaye, C., Noirclerc-Savoye, M., Ge, W.-P., Thayer, D.A., Huang, H., Kornberg, T.B., Royant, A., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Weiss, W.A., and Shu, X. (2014) An Improved Monomeric Infrared Fluorescent Protein for Neuronal and Tumour Brain Imaging, *Nature Communications*, **5**, 3626.
18. Auldridge, M.E., Satyshur, K.A., Anstrom, D.M., and Forest, K.T. (2012) Structure-Guided Engineering Enhances a Phytochrome-Based Infrared Fluo-

rescent Protein, *The Journal of Biological Chemistry*, **287**, 7000–7009.
19. Lehtivuori, H., Bhattacharya, S., Angenent-Mari, N.M., Satyshur, K.A., and Forest, K.T. (2015) Removal of Chromophore-Proximal Polar Atoms Decreases Water Content and Increases Fluorescence in a Near Infrared Phytofluor, *Frontiers in Molecular Biosciences*, **2**, 65.
20. Rodriguez, E.A., Tran, G.N., Gross, L.A., Crisp, J.L., Shu, X., Lin, J.Y., and Tsien, R.Y. (2016) A Far-Red Fluorescent Protein Evolved from a Cyanobacterial Phycobiliprotein, *Nature Methods*, **13**, 763–769.
21. Shemetov, A.A., Oliinyk, O.S., and Verkhusha, V.V. (2017) How to Increase Brightness of Near-Infrared Fluorescent Proteins in Mammalian Cells, *Cell Chemical Biology*, **24**, 758–766.e3.
22. Ding, W.-L., Miao, D., Hou, Y.-N., Jiang, S.-P., Zhao, B.-Q., Zhou, M., Scheer, H., and Zhao, K.-H. (2017) Small Monomeric and Highly Stable Near-Infrared Fluorescent Markers Derived from the Thermophilic Phycobiliprotein, ApcF2, *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1864**, 1877–1886.
23. Piatkevich, K.D., Subach, F.V., and Verkhusha, V.V. (2013) Far-Red Light Photoactivatable near-Infrared Fluorescent Proteins Engineered from a Bacterial Phytochrome, *Nature Communications*, **4**, 2153.
24. Yu, D., Baird, M.A., Allen, J.R., Howe, E.S., Klassen, M.P., Reade, A., Makhijani, K., Song, Y., Liu, S., Murthy, Z., Zhang, S.-Q., Weiner, O.D., Kornberg, T.B., Jan, Y.-N., Davidson, M.W., and Shu, X. (2015) A Naturally Monomeric Infrared Fluorescent Protein for Protein Labeling *in Vivo*, *Nature Methods*, **12**, 763–765.
25. Yu, D., Dong, Z., Gustafson, W.C., Ruiz-González, R., Signor, L., Marzocca, F., Borel, F., Klassen, M.P., Makhijani, K., Royant, A., Jan, Y.-N., Weiss, W.A., Guo, S., and Shu, X. (2016) Rational Design of a Monomeric and Photostable Far-Red Fluorescent Protein for Fluorescence Imaging in Vivo, *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, **25**, 308–315.
26. Rumyantsev, K.A., Shcherbakova, D.M., Zakharova, N.I., Emelyanov, A.V., Turoverov, K.K., and Verkhusha, V.V. (2015) Minimal Domain of Bacterial Phytochrome Required for Chromophore Binding and Fluorescence, *Scientific Reports*, **5**, 18348.
27. Shcherbakova, D.M., Baloban, M., Pletnev, S., Malashkevich, V.N., Xiao, H., Dauter, Z., and Verkhusha, V.V. (2015) Molecular Basis of Spectral Diversity in Near-Infrared Phytochrome-Based Fluorescent Proteins, *Chemistry & Biology*, **22**, 1540–1551.
28. Verkhusha, V.V., Shcherbakova, D.M., and Baloban, M. (2018, February 15) Monomeric Near-Infrared Fluorescent Proteins Engineered from Bacterial Phytochromes and Methods for Making Same. United States Patent Application 20180044383.
29. Shcherbakova, D.M., Baloban, M., Emelyanov, A.V., Brenowitz, M., Guo, P., and Verkhusha, V.V. (2016) Bright Monomeric Near-Infrared Fluorescent Proteins as Tags and Biosensors for Multiscale Imaging, *Nature Communications*, **7**, 12405.
30. Shcherbakova, D.M., Cammer, N.C., Huisman, T.M., Verkhusha, V.V., and Hodgson, L. (2018) Direct Multiplex Imaging and Optogenetics of Rho GTPases Enabled by Near-Infrared FRET, *Nature Chemical Biology*, **14**, 591–600.
31. Snapp, E.L., Hegde, R.S., Francolini, M., Lombardo, F., Colombo, S., Pedrazzini, E., Borgese, N., and Lippincott-Schwartz, J. (2003) Formation of Stacked ER Cisternae by Low Affinity Protein Interactions, *J Cell Biol*, **163**, 257–269.
32. Day, R.N., and Davidson, M.W. (2009) The Fluorescent Protein Palette: Tools for Cellular Imaging, *Chemical Society Reviews*, **38**, 2887–2921.
33. Zacharias, D.A., Violin, J.D., Newton, A.C., and Tsien, R.Y. (2002) Partitioning of Lipid-Modified Monomeric GFPs into Membrane Microdomains of Live Cells, *Science (New York, N.Y.)*, **296**, 913–916.
34. Shcherbakova, D.M., Baloban, M., and Verkhusha, V.V. (2015) Near-Infrared Fluorescent Proteins Engineered from Bacterial Phytochromes, *Current Opinion in Chemical Biology*, **27**, 52–63.

35. Wagner, J.R., Zhang, J., Brunzelle, J.S., Vierstra, R.D., and Forest, K.T. (2007) High Resolution Structure of Deinococcus Bacteriophytochrome Yields New Insights into Phytochrome Architecture and Evolution, *The Journal of Biological Chemistry*, **282**, 12298–12309.
36. Yang, X., Kuk, J., and Moffat, K. (2008) Crystal Structure of Pseudomonas Aeruginosa Bacteriophytochrome: Photoconversion and Signal Transduction, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 14715–14720.
37. Lamparter, T., Michael, N., Caspani, O., Miyata, T., Shirai, K., and Inomata, K. (2003) Biliverdin Binds Covalently to Agrobacterium Phytochrome Agp1 via Its Ring A Vinyl Side Chain, *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 33786–33792.
38. Lamparter, T., Carrascal, M., Michael, N., Martinez, E., Rottwinkel, G., and Abian, J. (2004) The Biliverdin Chromophore Binds Covalently to a Conserved Cysteine Residue in the N-Terminus of Agrobacterium Phytochrome Agp1, *Biochemistry*, **43**, 3659–3669.
39. Wagner, J.R., Brunzelle, J.S., Forest, K.T., and Vierstra, R.D. (2005) A Light-Sensing Knot Revealed by the Structure of the Chromophore-Binding Domain of Phytochrome, *Nature*, **438**, 325–331.
40. Yang, X., Kuk, J., and Moffat, K. (2009) Conformational Differences between the Pfr and Pr States in Pseudomonas Aeruginosa Bacteriophytochrome, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 15639–15644.
41. Wagner, J.R., Zhang, J., Stetten, D. von, Günther, M., Murgida, D.H., Mroginski, M.A., Walker, J.M., Forest, K.T., Hildebrandt, P., and Vierstra, R.D. (2008) Mutational Analysis of Deinococcus Radiodurans Bacteriophytochrome Reveals Key Amino Acids Necessary for the Photochromicity and Proton Exchange Cycle of Phytochromes, *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 12212–12226.
42. Buhrke, D., Escobar, F.V., Sauthof, L., Wilkening, S., Herder, N., Tavraz, N.N., Willoweit, M., Keidel, A., Utesch, T., Mroginski, M.-A., Schmitt, F.-J., Hildebrandt, P., and Friedrich, T. (2016) The Role of Local and Remote Amino Acid Substitutions for Optimizing Fluorescence in Bacteriophytochromes: A Case Study on IRFP, *Scientific Reports*, **6**, 28444.
43. Feliks, M., Lafaye, C., Shu, X., Royant, A., and Field, M. (2016) Structural Determinants of Improved Fluorescence in a Family of Bacteriophytochrome-Based Infrared Fluorescent Proteins: Insights from Continuum Electrostatic Calculations and Molecular Dynamics Simulations, *Biochemistry*, **55**, 4263–4274.
44. Bhattacharya, S., Auldridge, M.E., Lehtivuori, H., Ihalainen, J.A., and Forest, K.T. (2014) Origins of Fluorescence in Evolved Bacteriophytochromes, *Journal of Biological Chemistry*, **289**, 32144–32152.
45. Baloban, M., Shcherbakova, D.M., Pletnev, S., Pletnev, V.Z., Lagarias, J.C., and Verkhusha, V.V. (2017) Designing Brighter Near-Infrared Fluorescent Proteins: Insights from Structural and Biochemical Studies, *Chemical Science*, **8**, 4546–4557.
46. Stepanenko, O.V., Baloban, M., Bublikov, G.S., Shcherbakova, D.M., Stepanenko, O.V., Turoverov, K.K., Kuznetsova, I.M., and Verkhusha, V.V. (2016) Allosteric Effects of Chromophore Interaction with Dimeric Near-Infrared Fluorescent Proteins Engineered from Bacterial Phytochromes, *Scientific Reports*, **6**, 18750.
47. Hontani, Y., Shcherbakova, D.M., Baloban, M., Zhu, J., Verkhusha, V.V., and Kennis, J.T.M. (2016) Bright Blue-Shifted Fluorescent Proteins with Cys in the GAF Domain Engineered from Bacterial Phytochromes: Fluorescence Mechanisms and Excited-State Dynamics, *Scientific Reports*, **6**, 37362.
48. Stepanenko, O.V., Stepanenko, O.V., Kuznetsova, I.M., Shcherbakova, D.M., Verkhusha, V.V., and Turoverov, K.K. (2017) Interaction of Biliverdin Chromophore with Near-Infrared Fluorescent Protein BphP1-FP Engineered from Bacterial Phytochrome, *International Journal of Molecular Sciences*, **18**.
49. Stepanenko, O.V., Stepanenko, O.V., Bublikov, G.S., Kuznetsova, I.M., Verkhusha, V.V., and Turoverov, K.K.

(2017) Stabilization of Structure in Near-Infrared Fluorescent Proteins by Binding of Biliverdin Chromophore, *Journal of Molecular Structure*, **1140**, 22–31.
50. Bellini, D., and Papiz, M.Z. (2012) Structure of a Bacteriophytochrome and Light-Stimulated Protomer Swapping with a Gene Repressor, *Structure (London, England: 1993)*, **20**, 1436–1446.
51. Pandey, N., Nobles, C.L., Zechiedrich, L., Maresso, A.W., and Silberg, J.J. (2015) Combining Random Gene Fission and Rational Gene Fusion to Discover Near-Infrared Fluorescent Protein Fragments That Report on Protein-Protein Interactions, *ACS synthetic biology*, **4**, 615–624.
52. Pandey, N., Kuypers, B.E., Nassif, B., Thomas, E.E., Alnahhas, R.N., Segatori, L., and Silberg, J.J. (2016) Tolerance of a Knotted Near-Infrared Fluorescent Protein to Random Circular Permutation, *Biochemistry*, **55**, 3763–3773.
53. Filonov, G.S., and Verkhusha, V.V. (2013) A Near-Infrared BiFC Reporter for in Vivo Imaging of Protein-Protein Interactions, *Chemistry & Biology*, **20**, 1078–1086.
54. Huang, L., and Makarov, D.E. (2008) Translocation of a Knotted Polypeptide through a Pore, *The Journal of Chemical Physics*, **129**, 121107.
55. Virnau, P., Mirny, L.A., and Kardar, M. (2006) Intricate Knots in Proteins: Function and Evolution, *PLOS Computational Biology*, **2**, e122.
56. Tchekanda, E., Sivanesan, D., and Michnick, S.W. (2014) An Infrared Reporter to Detect Spatiotemporal Dynamics of Protein-Protein Interactions, *Nature Methods*, **11**, 641–644.
57. Mallam, A.L., Rogers, J.M., and Jackson, S.E. (2010) Experimental Detection of Knotted Conformations in Denatured Proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**, 8189–8194.
58. Agollah, G.D., Wu, G., Sevick-Muraca, E.M., and Kwon, S. (2014) In Vivo Lymphatic Imaging of a Human Inflammatory Breast Cancer Model, *Journal of Cancer*, **5**, 774–783.
59. Berlec, A., Završnik, J., Butinar, M., Turk, B., and Štrukelj, B. (2015) In Vivo Imaging of Lactococcus Lactis, Lactobacillus Plantarum and Escherichia Coli Expressing Infrared Fluorescent Protein in Mice, *Microbial Cell Factories*, **14**, 181.
60. Calvo-Álvarez, E., Stamatakis, K., Punzón, C., Álvarez-Velilla, R., Tejería, A., Escudero-Martínez, J.M., Pérez-Pertejo, Y., Fresno, M., Balaña-Fouce, R., and Reguera, R.M. (2015) Infrared Fluorescent Imaging as a Potent Tool for in Vitro, Ex Vivo and in Vivo Models of Visceral Leishmaniasis, *PLoS neglected tropical diseases*, **9**, e0003666.
61. Deliolanis, N.C., Ale, A., Morscher, S., Burton, N.C., Schaefer, K., Radrich, K., Razansky, D., and Ntziachristos, V. (2014) Deep-Tissue Reporter-Gene Imaging with Fluorescence and Optoacoustic Tomography: A Performance Overview, *Molecular imaging and biology: MIB: the official publication of the Academy of Molecular Imaging*, **16**, 652–660.
62. Filonov, G.S., Krumholz, A., Xia, J., Yao, J., Wang, L.V., and Verkhusha, V.V. (2012) Deep-Tissue Photoacoustic Tomography of Genetically Encoded IRFP Probe, *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, **51**, 1448–1451.
63. Hock, A.K., Lee, P., Maddocks, O.D., Mason, S.M., Blyth, K., and Vousden, K.H. (2014) IRFP Is a Sensitive Marker for Cell Number and Tumor Growth in High-Throughput Systems, *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, **13**, 220–226.
64. Hock, A.K., Cheung, E.C., Humpton, T.J., Monteverde, T., Paulus-Hock, V., Lee, P., McGhee, E., Scopelliti, A., Murphy, D.J., Strathdee, D., Blyth, K., and Vousden, K.H. (2017) Development of an Inducible Mouse Model of IRFP713 to Track Recombinase Activity and Tumour Development in Vivo, *Scientific Reports*, **7**, 1837.
65. Idevall-Hagren, O., Dickson, E.J., Hille, B., Toomre, D.K., and De Camilli, P. (2012) Optogenetic Control of Phosphoinositide Metabolism, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, E2316–E2323.
66. Ishii, T., Sato, K., Kakumoto, T., Miura, S., Touhara, K., Takeuchi, S., and

Nakata, T. (2015) Light Generation of Intracellular Ca(2+) Signals by a Genetically Encoded Protein BACCS, *Nature Communications*, **6**, 8021.
67. Jiguet-Jiglaire, C., Cayol, M., Mathieu, S., Jeanneau, C., Bouvier-Labit, C., Ouafik, L., and El-Battari, A. (2014) Noninvasive Near-Infrared Fluorescent Protein-Based Imaging of Tumor Progression and Metastases in Deep Organs and Intraosseous Tissues, *Journal of Biomedical Optics*, **19**, 16019.
68. Kamensek, U., Rols, M.-P., Cemazar, M., and Golzio, M. (2016) Visualization of Nonspecific Antitumor Effectiveness and Vascular Effects of Gene Electro-Transfer to Tumors, *Current Gene Therapy*, **16**, 90–97.
69. Krumholz, A., Shcherbakova, D.M., Xia, J., Wang, L.V., and Verkhusha, V.V. (2014) Multicontrast Photoacoustic in Vivo Imaging Using Near-Infrared Fluorescent Proteins, *Scientific Reports*, **4**, 3939.
70. Lai, C.-W., Chen, H.-L., Yen, C.-C., Wang, J.-L., Yang, S.-H., and Chen, C.-M. (2016) Using Dual Fluorescence Reporting Genes to Establish an In Vivo Imaging Model of Orthotopic Lung Adenocarcinoma in Mice, *Molecular imaging and biology: MIB: the official publication of the Academy of Molecular Imaging*, **18**, 849–859.
71. Lu, Y., Darne, C.D., Tan, I.-C., Wu, G., Wilganowski, N., Robinson, H., Azhdarinia, A., Zhu, B., Rasmussen, J.C., and Sevick-Muraca, E.M. (2013) In Vivo Imaging of Orthotopic Prostate Cancer with Far-Red Gene Reporter Fluorescence Tomography and in Vivo and Ex Vivo Validation, *Journal of Biomedical Optics*, **18**, 101305.
72. Nedosekin, D.A., Sarimollaoglu, M., Galanzha, E.I., Sawant, R., Torchilin, V.P., Verkhusha, V.V., Ma, J., Frank, M.H., Biris, A.S., and Zharov, V.P. (2013) Synergy of Photoacoustic and Fluorescence Flow Cytometry of Circulating Cells with Negative and Positive Contrasts, *Journal of Biophotonics*, **6**, 425–434.
73. Oliveira, J.C., da Silva, A.C., Oliveira, R.A.D.S., Pereira, V.R.A., and Gil, L.H.V.G. (2016) In Vivo Near-Infrared Fluorescence Imaging of Leishmania Amazonensis Expressing Infrared Fluorescence Protein (IRFP) for Real-Time Monitoring of Cutaneous Leishmaniasis in Mice, *Journal of Microbiological Methods*, **130**, 189–195.
74. Paulus-Hock, V., Cheung, E.C., Roxburgh, P., Vousden, K.H., and Hock, A.K. (2014) IRFP Is a Real Time Marker for Transformation Based Assays in High Content Screening, *PLOS ONE*, **9**, e98399.
75. Richie, C.T., Whitaker, L.R., Whitaker, K.W., Necarsulmer, J., Baldwin, H.A., Zhang, Y., Fortuno, L., Hinkle, J.J., Koivula, P., Henderson, M.J., Sun, W., Wang, K., Smith, J.C., Pickel, J., Ji, N., Hope, B.T., and Harvey, B.K. (2017) Near-Infrared Fluorescent Protein IRFP713 as a Reporter Protein for Optogenetic Vectors, a Transgenic Cre-Reporter Rat, and Other Neuronal Studies, *Journal of Neuroscience Methods*, **284**, 1–14.
76. Roman, W., Martins, J.P., Carvalho, F.A., Voituriez, R., Abella, J.V.G., Santos, N.C., Cadot, B., Way, M., and Gomes, E.R. (2017) Myofibril Contraction and Crosslinking Drive Nuclear Movement to the Periphery of Skeletal Muscle, *Nature Cell Biology*, **19**, 1189–1201.
77. Spronken, M.I., Short, K.R., Herfst, S., Bestebroer, T.M., Vaes, V.P., Hoeven, B. van der, Koster, A.J., Kremers, G.-J., Scott, D.P., Gultyaev, A.P., Sorell, E.M., Graaf, M. de, Bárcena, M., Rimmelzwaan, G.F., and Fouchier, R.A. (2015) Optimisations and Challenges Involved in the Creation of Various Bioluminescent and Fluorescent Influenza A Virus Strains for In Vitro and In Vivo Applications, *PLOS ONE*, **10**, e0133888.
78. Stabley, D.R., Oh, T., Simon, S.M., Mattheyses, A.L., and Salaita, K. (2015) Real-Time Fluorescence Imaging with 20 Nm Axial Resolution, *Nature Communications*, **6**, 8307.
79. Tanaka, N., Lajud, S.A., Ramsey, A., Szymanowski, A.R., Ruffner, R., O'Malley, B.W., and Li, D. (2016) Application of Infrared-Based Molecular Imaging to a Mouse Model with Head and Neck Cancer, *Head & Neck*, **38**, Suppl. 1, E1351–1357.
80. Tzoumas, S., Nunes, A., Deliolanis, N.C., and Ntziachristos, V. (2015) Effects of Multispectral Excitation on the

Sensitivity of Molecular Optoacoustic Imaging, *Journal of Biophotonics*, **8**, 629–637.
81. Wang, K., Sun, W., Richie, C.T., Harvey, B.K., Betzig, E., and Ji, N. (2015) Direct Wavefront Sensing for High-Resolution *in Vivo* Imaging in Scattering Tissue, *Nature Communications*, **6**, 7276.
82. Zhu, B., Wu, G., Robinson, H., Wilganowski, N., Hall, M.A., Ghosh, S.C., Pinkston, K.L., Azhdarinia, A., Harvey, B.R., and Sevick-Muraca, E.M. (2013) Tumor Margin Detection Using Quantitative NIRF Molecular Imaging Targeting EpCAM Validated by Far Red Gene Reporter IRFP, *Molecular imaging and biology: MIB: the official publication of the Academy of Molecular Imaging*, **15**, 560–568.
83. Zhu, B., Robinson, H., Zhang, S., Wu, G., and Sevick-Muraca, E.M. (2015) Longitudinal Far Red Gene-Reporter Imaging of Cancer Metastasis in Preclinical Models: A Tool for Accelerating Drug Discovery, *Biomedical Optics Express*, **6**, 3346–3351.
84. To, T.-L., Piggott, B.J., Makhijani, K., Yu, D., Jan, Y.N., and Shu, X. (2015) Rationally Designed Fluorogenic Protease Reporter Visualizes Spatiotemporal Dynamics of Apoptosis in Vivo, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**, 3338–3343.
85. Donnelly, S.K., Cabrera, R., Mao, S.P.H., Christin, J.R., Wu, B., Guo, W., Bravo-Cordero, J.J., Condeelis, J.S., Segall, J.E., and Hodgson, L. (2017) Rac3 Regulates Breast Cancer Invasion and Metastasis by Controlling Adhesion and Matrix Degradation, *J Cell Biol*, **216**, 4331–4349.
86. Kyung, T., Lee, S., Kim, J.E., Cho, T., Park, H., Jeong, Y.-M., Kim, D., Shin, A., Kim, S., Baek, J., Kim, J., Kim, N.Y., Woo, D., Chae, S., Kim, C.-H., Shin, H.-S., Han, Y.-M., Kim, D., and Heo, W.D. (2015) Optogenetic Control of Endogenous Ca(2+) Channels in Vivo, *Nature Biotechnology*, **33**, 1092–1096.
87. Piatkevich, K.D., Suk, H.-J., Kodandaramaiah, S.B., Yoshida, F., DeGennaro, E.M., Drobizhev, M., Hughes, T.E., Desimone, R., Boyden, E.S., and Verkhusha, V.V. (2017) Near-Infrared Fluorescent Proteins Engineered from Bacterial Phytochromes in Neuroimaging, *Biophysical Journal*, **113**, 2299–2309.
88. Fyk-Kolodziej, B., Hellmer, C.B., and Ichinose, T. (2014) Marking Cells with Infrared Fluorescent Proteins to Preserve Photoresponsiveness in the Retina, *BioTechniques*, **57**, 245–253.
89. Satoh, T., Baba, M., Nakatsuka, D., Ishikawa, Y., Aburatani, H., Furuta, K., Ishikawa, T., Hatanaka, H., Suzuki, M., and Watanabe, Y. (2003) Role of Heme Oxygenase-1 Protein in the Neuroprotective Effects of Cyclopentenone Prostaglandin Derivatives under Oxidative Stress, *The European Journal of Neuroscience*, **17**, 2249–2255.
90. Gibbs, P.E.M., and Maines, M.D. (2007) Biliverdin Inhibits Activation of NF-KappaB: Reversal of Inhibition by Human Biliverdin Reductase, *International Journal of Cancer*, **121**, 2567–2574.
91. Miralem, T., Lerner-Marmarosh, N., Gibbs, P.E.M., Tudor, C., Hagen, F.K., and Maines, M.D. (2012) The Human Biliverdin Reductase-Based Peptide Fragments and Biliverdin Regulate Protein Kinase Cδ Activity, *The Journal of Biological Chemistry*, **287**, 24698–24712.
92. Mölzer, C., Pfleger, B., Putz, E., Roßmann, A., Schwarz, U., Wallner, M., Bulmer, A.C., and Wagner, K.-H. (2013) In Vitro DNA-Damaging Effects of Intestinal and Related Tetrapyrroles in Human Cancer Cells, *Experimental Cell Research*, **319**, 536–545.
93. Nuhn, P., Künzli, B.M., Hennig, R., Mitkus, T., Ramanauskas, T., Nobiling, R., Meuer, S.C., Friess, H., and Berberat, P.O. (2009) Heme Oxygenase-1 and Its Metabolites Affect Pancreatic Tumor Growth in Vivo, *Molecular Cancer*, **8**, 37.
94. Chen, K., Gunter, K., and Maines, M.D. (2000) Neurons Overexpressing Heme Oxygenase-1 Resist Oxidative Stress-Mediated Cell Death, *Journal of Neurochemistry*, **75**, 304–313.
95. Song, W., Su, H., Song, S., Paudel, H.K., and Schipper, H.M. (2006) Over-Expression of Heme Oxygenase-1 Promotes Oxidative Mitochondrial Damage in Rat Astroglia, *Journal of Cellular Physiology*, **206**, 655–663.
96. Takeda, A., Perry, G., Abraham, N.G., Dwyer, B.E., Kutty, R.K., Laitinen, J.T., Petersen, R.B., and Smith, M.A. (2000)

Overexpression of Heme Oxygenase in Neuronal Cells, the Possible Interaction with Tau, *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 5395–5399.
97. Honda, M., Yogosawa, S., Kamada, M., Kamata, Y., Kimura, T., Koike, Y., Harada, T., Takahashi, H., Egawa, S., and Yoshida, K. (2017) A Novel Near-Infrared Fluorescent Protein, IRFP720, Facilitates Transcriptional Profiling of Prostate Cancer Bone Metastasis in Mice, *Anticancer Research*, **37**, 3009–3013.
98. Huang, C., Lan, W., Wang, F., Zhang, C., Liu, X., and Chen, Q. (2017) AAV-iRFP Labelling of Human Mesenchymal Stem Cells for near-Infrared Fluorescence Imaging, *Bioscience Reports*, **37**(2), BSR20160556.
99. Sita, T.L., Kouri, F.M., Hurley, L.A., Merkel, T.J., Chalastanis, A., May, J.L., Ghelfi, S.T., Cole, L.E., Cayton, T.C., Barnaby, S.N., Sprangers, A.J., Savalia, N., James, C.D., Lee, A., Mirkin, C.A., and Stegh, A.H. (2017) Dual Bioluminescence and Near-Infrared Fluorescence Monitoring to Evaluate Spherical Nucleic Acid Nanoconjugate Activity in Vivo, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **114**, 4129–4134.
100. Rumyantsev, K.A., Turoverov, K.K., and Verkhusha, V.V. (2016) Near-Infrared Bioluminescent Proteins for Two-Color Multimodal Imaging, *Scientific Reports*, **6**, 36588.
101. Mezzanotte, L., Iljas, J.D., Que, I., Chan, A., Kaijzel, E., Hoeben, R., and Löwik, C. (2017) Optimized Longitudinal Monitoring of Stem Cell Grafts in Mouse Brain Using a Novel Bioluminescent/Near Infrared Fluorescent Fusion Reporter, *Cell Transplantation*, **26**, 1878–1889.
102. Isomura, M., Yamada, K., Noguchi, K., and Nishizono, A. (2017) Near-Infrared Fluorescent Protein IRFP720 Is Optimal for in Vivo Fluorescence Imaging of Rabies Virus Infection, *Journal of General Virology*, **98**, 2689–2698.
103. Telford, W.G., Shcherbakova, D.M., Buschke, D., Hawley, T.S., and Verkhusha, V.V. (2015) Multiparametric Flow Cytometry Using Near-Infrared Fluorescent Proteins Engineered from Bacterial Phytochromes, *PLOS ONE*, **10**, e0122342.
104. Zhang, X.-E., Cui, Z., and Wang, D. (2016) Sensing of Biomolecular Interactions Using Fluorescence Complementing Systems in Living Cells, *Biosensors & Bioelectronics*, **76**, 243–250.
105. Kodama, Y., and Hu, C.-D. (2012) Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC): A 5-Year Update and Future Perspectives, *BioTechniques*, **53**, 285–298.
106. Miller, K.E., Kim, Y., Huh, W.-K., and Park, H.-O. (2015) Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Analysis: Advances and Recent Applications for Genome-Wide Interaction Studies, *Journal of Molecular Biology*, **427**, 2039–2055.
107. Hirata, E., and Kiyokawa, E. (2016) Future Perspective of Single-Molecule FRET Biosensors and Intravital FRET Microscopy, *Biophysical Journal*, **111**, 1103–1111.
108. Hochreiter, B., Pardo-Garcia, A., and Schmid, J.A. (2015) Fluorescent Proteins as Genetically Encoded FRET Biosensors in Life Sciences, *Sensors*, **15**, 26281–26314.
109. Komatsu, N., Aoki, K., Yamada, M., Yukinaga, H., Fujita, Y., Kamioka, Y., and Matsuda, M. (2011) Development of an Optimized Backbone of FRET Biosensors for Kinases and GTPases, *Molecular Biology of the Cell*, **22**, 4647–4656.
110. Chen, M., Li, W., Zhang, Z., Liu, S., Zhang, X., Zhang, X.-E., and Cui, Z. (2015) Novel Near-Infrared BiFC Systems from a Bacterial Phytochrome for Imaging Protein Interactions and Drug Evaluation under Physiological Conditions, *Biomaterials*, **48**, 97–107.
111. Li, L., Shemetov, A.A., Baloban, M., Hu, P., Zhu, L., Shcherbakova, D.M., Zhang, R., Shi, J., Yao, J., Wang, L.V., and Verkhusha, V.V. (2018) Small Near-Infrared Photochromic Protein for Photoacoustic Multi-Contrast Imaging and Detection of Protein Interactions in Vivo, *Nature Communications*, **9**, 2734.

112. Zlobovskaya, O.A., Sergeeva, T.F., Shirmanova, M.V., Dudenkova, V.V., Sharonov, G.V., Zagaynova, E.V., and Lukyanov, K.A. (2016) Genetically Encoded Far-Red Fluorescent Sensors for Caspase-3 Activity, *BioTechniques*, **60**, 62–68.
113. Sakaue-Sawano, A., Kurokawa, H., Morimura, T., Hanyu, A., Hama, H., Osawa, H., Kashiwagi, S., Fukami, K., Miyata, T., Miyoshi, H., Imamura, T., Ogawa, M., Masai, H., and Miyawaki, A. (2008) Visualizing Spatiotemporal Dynamics of Multicellular Cell-Cycle Progression, *Cell*, **132**, 487–498.
114. Chudakov, D.M., Matz, M.V., Lukyanov, S., and Lukyanov, K.A. (2010) Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues, *Physiological Reviews*, **90**, 1103–1163.
115. Stuker, F., Ripoll, J., and Rudin, M. (2011) Fluorescence Molecular Tomography: Principles and Potential for Pharmaceutical Research, *Pharmaceutics*, **3**, 229–274.
116. Zanca, C., Villa, G.R., Benitez, J.A., Thorne, A.H., Koga, T., D'Antonio, M., Ikegami, S., Ma, J., Boyer, A.D., Banisadr, A., Jameson, N.M., Parisian, A.D., Eliseeva, O.V., Barnabe, G.F., Liu, F., Wu, S., Yang, H., Wykosky, J., Frazer, K.A., Verkhusha, V.V., Isaguliants, M.G., Weiss, W.A., Gahman, T.C., Shiau, A.K., Chen, C.C., Mischel, P.S., Cavenee, W.K., and Furnari, F.B. (2017) Glioblastoma Cellular Cross-Talk Converges on NF-KB to Attenuate EGFR Inhibitor Sensitivity, *Genes & Development*, **31**, 1212–1227.
117. Rice, W.L., Shcherbakova, D.M., Verkhusha, V.V., and Kumar, A.T.N. (2015) In Vivo Tomographic Imaging of Deep-Seated Cancer Using Fluorescence Lifetime Contrast, *Cancer Research*, **75**, 1236–1243.
118. Wang, L.V., and Hu, S. (2012) Photoacoustic Tomography: In Vivo Imaging from Organelles to Organs, *Science*, **335**, 1458–1462.
119. Chan, X.H.D., Balasundaram, G., Attia, A.B.E., Goggi, J.L., Ramasamy, B., Han, W., Olivo, M., and Sugii, S. (2018) Multimodal Imaging Approach to Monitor Browning of Adipose Tissue in Vivo, *Journal of Lipid Research*, **59**, 1071–1078.
120. Yao, J., Kaberniuk, A.A., Li, L., Shcherbakova, D.M., Zhang, R., Wang, L., Li, G., Verkhusha, V.V., and Wang, L.V. (2016) Multiscale Photoacoustic Tomography Using Reversibly Switchable Bacterial Phytochrome as a Near-Infrared Photochromic Probe, *Nature Methods*, **13**, 67–73.
121. Dortay, H., Märk, J., Wagener, A., Zhang, E., Grötzinger, C., Hildebrandt, P., Friedrich, T., and Laufer, J. (2016) Dual-Wavelength Photoacoustic Imaging of a Photoswitchable Reporter Protein, *Proceedings of SPIE*, **9708**, 970820.
122. Märk, J., Dortay, H., Wagener, A., Zhang, E., Buchmann, J., Grötzinger, C., Friedrich, T., and Laufer, J. (2018) Dual-Wavelength 3D Photoacoustic Imaging of Mammalian Cells Using a Photoswitchable Phytochrome Reporter Protein, *Communications Physics*, **1**, 3.
123. Veen, R.L.P. van, Sterenborg, H. j c m, Pifferi, A., Torricelli, A., and Cubeddu, R. (2005) Determination of VIS-NIR Absorption Coefficients of Mammalian Fat, with Time- and Spatially Resolved Diffuse Reflectance and Transmission Spectroscopy, *Journal of Biomedical Optics*, **10** (5), 054004.
124. Palmer, K.F., and Williams, D. (1974) Optical Properties of Water in the near Infrared*, *JOSA*, **64**, 1107–1110.
125. Buiteveld, H., Hakvoort, J.H.M., and Donze, M. (1994) Optical Properties of Pure Water, *SPIE*, **2258**, 174–184.
126. Otero, L.H., Klinke, S., Rinaldi, J., Velázquez-Escobar, F., Mroginski, M.A., Fernández López, M., Malamud, F., Vojnov, A.A., Hildebrandt, P., Goldbaum, F.A., and Bonomi, H.R. (2016) Structure of the Full-Length Bacteriophytochrome from the Plant Pathogen Xanthomonas Campestris Provides Clues to Its Long-Range Signaling Mechanism, *Journal of Molecular Biology*, **428**, 3702–3720.