

На правах рукописи

МАРЫНИЧ НАДЕЖДА КОНСТАНТИНОВНА

«Изучение FRET-пар с нефлуоресцирующими акцепторами»

специальность:

1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в лаборатории физической биохимии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Научный руководитель: **Савицкий Александр Павлович**

Доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией физической биохимии ФИЦ Биотехнологии РАН

Официальные оппоненты: **Горин Дмитрий Александрович,**

доктор химических наук, профессор, Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Сколковский институт науки и технологий», профессор центра фотоники и фотонных технологий

Субач Оксана Михайловна,

кандидат химических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», старший научный сотрудник лаборатории нейронаук.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук

Защита диссертации состоится «20» февраля 2025 г. в 15:00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.233.01 по защите диссертаций на соискание учёной степени доктора наук, на соискание учёной степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва Ленинский проспект, д. 33 строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы РАН по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33 строение 1 и на сайте <https://www.fbras.ru>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 202_ года.

Ученый секретарь

диссертационного совета 24.1.233.01,

кандидат биологических наук

Орловский А.Ф.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Открытие GFP как генетически-кодируемой метки, получение палитры флуоресцентных белков, применение фототрансформируемых белков в современных методах микроскопии привело к тому, что флуоресцентный имиджинг стал важным подходом в исследовании внутриклеточных процессов. GFP-подобные флуоресцентные белки сами по себе являются интересным объектом исследования, поэтому создание оптимальной метки для применения в требуемом методе является нетривиальной задачей. Явление флуоресцентного резонансного переноса энергии между флуоресцентными белками нашло широкое применение для исследования процессов комплексообразования, фолдинга белков, а также протеазной активности. Создание эффективного, мономерного сенсора для применения во всех компартментах клетки является важной задачей. Обнаружение протеолиза является одним из самых важных применений FRET-сенсоров, поскольку роль различных протеаз в молекулярной онкологии, развитии вирусов (например, SARS-CoV-2), воспалительных процессов находится в стадии тщательного изучения и может способствовать поиску новых лекарственных мишеней.

Степень разработанности темы исследования. Использование FRET сенсоров, в которых в качестве донора выступает красный флуоресцентный белок позволяет работать в области спектра с наименьшим поглощением и автофлуоресценцией тканей животных. Применение в качестве акцептора не флуоресцирующих хромопротеинов исключает необходимость спектрального разделения флуоресценции донора и акцептора, что облегчает детекцию изменения FRET. Такие сенсоры позволяют детектировать ферментативную активность не только спектрофотометрически, но и на основании изменения времени жизни флуоресценции донора.

Цели и задачи исследования. Целью этого исследования являлась разработка методов создания FRET-сенсоров на основе фотоконвертируемого белка SAASot1 и хромопротеина на примере каспазы 3 для последующего применения в методах субдифракционной микроскопии и флуоресцентной корреляционной спектроскопии. Для достижения этой цели ставились следующие задачи:

1. Получение бесцистеинового варианта SAASot1 для применения в окислительных условиях клетки;
2. Подбор и характеристика хромопротеина в качестве акцептора флуоресценции;
3. Оптимизация свойств фотоконверсии SAASot1 для успешного применения его красной формы в качестве донора флуоресценции;
4. Оптимизация созревания при 37 °C SAASot1 для использования его в клетках млекопитающих;
5. Получение кристаллической структуры moxSAASot1 для рационального дизайна белков слияния;
6. Создание слитого белка новой формы SAASot1 и хромопротеина и характеристика его свойств.

Научная новизна. SAASot1 является уникальным бифотохромным флуоресцентным белком. Впервые он был обнаружен как фотоконвертируемый белок, затем были открыты свойства фотопереключения в диком типе белка. Это отличает его от других представителей бифотохромных белков, так как в них эти свойства были введены генно-инженерными методами. Ранее в нашей лаборатории была получена мономерная форма этого белка, успешно применявшаяся в методах PALM и ФКС. В этой работе впервые был получен бесцистеиновый вариант SAASot1, а также оптимизированы его свойства фотоконверсии и созревания при 37 °C. Также подобран и охарактеризован мономерный акцептор флуоресценции – хромопротеин. Получена 3D структура одного из вариантов moxSAASot1.

Теоретическая и практическая значимость работы. Понимание и рациональное управления свойствами ФБ является важным шагом для создания оптимальных генетически-кодируемых флуоресцентных меток. Создание мономерного и эффективного FRET-сенсора для применения в субдифракционной микроскопии и методе ФКС является началом в разработке скрининг системы для анализа динамики внутриклеточных процессов в живых клетках.

Степень достоверности и апробация результатов. Все результаты в этой работе получены с использованием современных физико-химических и биохимических методов. Основные результаты работы были представлены в виде тезисов и докладов на следующих всероссийских и международных конференциях:

- Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2020», секция «Химия», г. Москва. Марынич Н.К., Создание биосенсора на основе FRET-пары TagRFP-хромобелок: подбор оптимального хромобелка.

- VI съезд биохимиков России, Сочи, Дагомыс (3-8 октября 2021), Марынич Н.К., Савицкий А.П., Хренова М.Г. Выбор оптимального хромобелка в качестве акцептора во FRET паре.

- VI съезд биохимиков России, Сочи, Дагомыс (3-8 октября 2021). Меерович И.Г., Марынич Н.К., Грановский И.Э., Фикслер Д., Савицкий А.П. Получение комплексов на основе золотых наночастиц и FRET-сенсоров каспазы 3 на основе флуоресцентных белков.

- XXXIV Международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии, г. Москва, 08-11 февраля 2022 г. Марынич Н.К., Гавшина А.В., Савицкий А.П. moxSAASoti: первый бифотохромный флуоресцентный белок, устойчивый в окислительных условиях, для применения в суперразрешающей микроскопии

- VII съезд биохимиков России, Сочи, Дагомыс (3-8 октября 2022), Хренова М.Г., А.В. Гавшина, И.Д. Соловьев, Марынич Н.К., Савицкий А.П. Влияние динамических свойств фотопереключаемых и фотоконвертируемых белков семейства SAASoti на фотофизические и фотохимические свойства

- OASIS 8. International Conference & Exhibition on Optics & Electro-Optics, Tel-Aviv, Israel 12-13. Тель-Авив, Израиль, 12-13 декабря 2022 г. A Savitsky A.P., Solovyev I.D, Meerovich I.G., Granovsky I.E., Marynich N.K., Tuchina D.K., Konovalov A.B., Vlasov V.V., Tuchin V.V. Multimodal MRI and life-time fluorescence sensors for theranostic applications.

- 13-ая Международная научная конференция «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения» (БИОКАТАЛИЗ - 2023), г. Суздаль, Россия, 25-29 июня 2023. Марынич Н.К., Грановский И.Э., Савицкий А.П. Создание FRET-сенсоров флуоресцентный белок-хромопротеин для детекции активности каспазы 3 in vitro и in vivo

Личный вклад автора. Все результаты в работе были получены лично автором. Математическое моделирование взаимодействий в SAASoti было проведено д.ф.-м.н. Хреновой М.Г. на химическом факультете МГУ им. М.В. Ломоносова. Генетические конструкции хромопротеинов были получены компанией SynBio Technologies (Китай), конструкция pET22b TagRFP-23-Ultramarine получена к.б.н. Грановским И.Э. в ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН. Кристалл moxSAASotiF97M получен к.б.н. Бойко К.М. в лаборатории инженерной энзимологии.

Методология и методы исследования. Все результаты в этой работе получены с использованием генно-инженерных, биохимических и физико-химических методов, подробно описанных в главе 2.

Положения, выносимые на защиту.

1. Получен вариант moxSAASoti с заменами всех пяти аминокислотных остатков цистеина, характеризующийся повышенной скоростью фотоконверсии;

2. Найден оптимальный акцептор FRET пары - мономерный нефлуоресцирующий хромопротеин с высокими значениями интегралов перекрытия с донорами флуоресценции;
3. Замена F97M повысила яркость и фотостабильность красной формы moxSAASoti и позволила получить 3D структуру;
4. Замена H74K улучшила созревание moxSAASoti при 37 ° C;
5. FRET-пары moxSAASotiF97M/H74K-23-Ultramarine и TagRFP -23-Ultramarine позволяют детектировать активность каспазы 3 *in vitro* и могут использоваться в качестве флуоресцентных сенсоров;

Структура и объем работы. Работа написана на 135 страницах, библиография 144 источника. Работа содержит 46 рисунков и 20 таблиц. Начинается с введения, с описанием актуальности и значимости работы. Диссертация содержит такие главы как обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение. Завершается работа заключением, содержащим основные выводы о проделанной работе.

Публикации. По результатам данной работы было опубликовано 4 статьи в журналах, которые индексируются в Web of Science, Scopus и РИНЦ, а также 7 тезисов на международных конференциях.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

В обзоре литературы описываются виды флуоресцирующих и нефлуоресцирующих GFP-подобных белков, явление FRET между этими белками, возможности оптимизации свойств флуоресцентных белков и явление апоптоза.

Материалы и методы

Все мутантные формы белка SAASoti были получены путем сайт направленного или сайт-насыщающего мутагенеза. Синтез генов хромопротеинов и сенсора newmoxSAASoti-23-Ultramarine был осуществлен SynBio Technologies (Китай).

Сайт-направленный и сайт-насыщающий мутагенез был осуществлён методом «Overlap-extension PCR» с использованием ДНК-полимеразы Pfu.

Выращивание трансформированных клеток и индукция биосинтеза белков проводили, используя свежую ночную культуру клеток *E.coli* (BL21(DE3)). Для этого предварительно в жидкую LB-среду с селективным для данного штамма антибиотиком колонию бактериальных клеток *E.coli*, взятых с агаризованной LB и выращивали на качалке при 37°C на 220 об/мин в течение ночи. Ночную культуру обновляли в свежей LB-среде с антибиотиком и выращивали при 37 °C на 220 об/мин до оптической плотности OD₅₅₀=0,6÷0,8. Затем вносили индуктор транскрипции IPTG до конечной концентрации 0,1 мМ, снижали температуру до 20 °C и инкубировали культуру клеток в течение 24 часов при перемешивании 220 об/мин. После клетки осаждали центрифугированием при 4700 об/мин в течение 30 минут.

Выделение белков. К клеткам *E.coli* BL21(DE3), содержащим экспрессированный рекомбинантный белок, добавляли буфер С, раствор П до конечной концентрации 1 мМ и ДНКзу I до конечной концентрации 10 мкг/мл, затем разрушали клетки с помощью ультразвукового гомогенизатора Qsonica Q125 (Qsonica, США) в режиме 10/10(УЗ/пауза), в течение 40 минут при 50% мощности. Полученный клеточный лизат отделяли центрифугированием на 10000 об/мин в течение 30 мин (настольная центрифуга с охлаждением Sigma 3-18K (Sigma Laborzentrifugen, Германия)). Супернатант насыщали (NH₄)₂SO₄ до 50 % и оставляли для осаждения на 16 часов. Высоленные белки отделили

центрифугированием 4700 об/мин. в течение 20 мин (настольная центрифуга с охлаждением Sigma 3-18K (Sigma Laborzentrifugen, Германия)). Окрашенный осадок растворяли в уравнивающем буфере и далее очищали хроматографическими методами.

Гидролиз сенсоров каспазой 3 *in vitro* проводился с использованием PorcCasp3 WT в буфере для расщепления (20 mM HEPES pH 7,4; 2 mM EDTA; 0,1% CHAPS, 5 mM DTT; 1 мг/мл BSA) при 37 °C в течение ночи.

Определение олигомерного состояния методом динамического рассеяния света (ДРС) на DynaPro Titan (Wyatt Technology Corporation, США) при 25 °C в 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4 при лазерном освещении 800 нм в кварцевой кювете 1,5 мм (Hellma, Германия).

Спектры поглощения регистрировали с помощью спектрофотометра (СФ) Cary 60.

Концентрации белков оценивали по закону Бугера-Ламберта-Бера в логарифмическом виде. Молярные коэффициенты поглощения ϵ новых вариантов при pH 7,4 (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl) рассчитывали, используя известные значения ϵ_{280} (на основании последовательности SAASoti с помощью ПО ExPASy ProtParam), D_{280} (по спектру поглощения) и l (характеристика кюветы).

Спектры флуоресценции регистрировали с помощью спектрофлуориметра Cary Eclipse в микрокювете Hellma (Германия), оптический путь 3 мм

Измерения кинетики фотопревращений на колониях и в микрообъемах растворов белков регистрировали на установке на базе микроскопа Olympus BX-43. 4 Thorlabs LEDs были коллимированы ахроматическими конденсорными линзами Thorlabs ACL2520-A и объединены с 3 дихроическими зеркалами Thorlabs DMLP425R, DMLP490R и Edmund Optics #67-078, с отсекающими фильтрами на длине волны возбуждения 458 нм. Спектральные полосы пропускались полосовыми фильтрами Thorlabs MF390/18 и Chroma ET448/19x, ET470/24m, ZET561/10x или ET560/25x. Была использована схема Köhler для получения более гомогенного пучка света после объектива микроскопа. Пучок света после коллиматорных линз фокусировался на задней плоскости объектива ахроматическими линзами (Thorlabs AC254-125-A). Затем ахроматический свет отражался разделителем светового луча 50/50 на объектив. Флуоресцентное изображение проецировалось на CCD камеру после разделителя светового луча через трубчатые линзы после Chroma 500LP и ZET562NF Notch фильтра. Камера использовалась для фокусировки и ориентирования образца. При этом ахроматический объектив фокусировал изображение на входной щели спектрометра Avesta ASP-75 через второй разделитель светового луча 70/30. Светодиоды управлялись с помощью Thorlabs LEDD1B драйвера и собственноручно спроектированный USB DAC с самописным программным обеспечением на базе Python. Это позволяет управлять светодиодами с временным разрешением 1 мс. Полученные световые плотности мощности имели максимальные значения 282.4, 528.4, 706.1, 45.6 (ZET561/10x) мВатт/см² для длин волн 390, 450, 470 и 560 нм соответственно после объектива 20x/0.4 NA Olympus PlanApo.

Разжигание флуоресценции регистрировали для растворов белков с оптической плотностью на длине волны поглощения 0,1 в буфере 20 mM Tris-HCl (pH 7,4) 150 mM NaCl с помощью установки SpectrCluster, источника света Lumencor Spectra X LED в термостатируемой (25 °C) микрокювете Hellma (Германия), оптический путь 3x3 мм. Возбуждение флуоресценции проводилось на длине волны 550±15 нм мощностью 0,5

мВатт/см². Интенсивность флуоресценции регистрировалась для KFP на длине волны 600 нм, Ultramarine 626 нм, anm2CP 597 нм, для gfasCP и spisCP максимум флуоресценции не определен и в эксперименте флуоресценция полностью отсутствовала на длинах волн от 580 до 630 нм.

Интегралы перекрывания были рассчитаны с использованием программного обеспечения ale - UV-Vis-IR Spectral Software 2.2 (FluorTools). Фёрстеровские радиусы вычислялись по стандартной формуле.

Результаты и обсуждение

Подбор оптимального хромопротеина в качестве акцептора во FRET-паре.

Для создания пары «красный флуоресцентный белок-хромопротеин» необходимо выбрать пару с максимальным перекрыванием спектров флуоресценции и поглощения. В качестве донора был выбран яркий красный флуоресцентный белок TagRFP (молекулярная яркость составляет 48 000), который ранее успешно применялся в качестве донора во FRET-сенсорах. На роль нового нефлуоресцирующего акцептора были отобраны несколько хромопротеинов: Ultramarine, anm2CP, gfasCP, spisCP. Ultramarine и anm2CP описываются в литературных источниках как мономерные белки, а gfasCP и spisCP как тетрамерные. Все выбранные белки имеют максимумы поглощения близкие к максимуму эмиссии TagRFP. Все выбранные хромопротеины имеют высокие значения коэффициентов молярного поглощения, а также высокие значения интегралов перекрывания спектров поглощения со спектром флуоресценции TagRFP, количественно демонстрирующие потенциальную эффективность переноса энергии в этих парах. Также для полученных пар рассчитаны ферстеровский радиусы, показывающие расстояние, на котором эффективность переноса энергии будет составлять 50% (Таблица 1).

Таблица 1. Теоретические значения интегралов перекрывания и ферстеровских радиусов для пар TagRFP-хромопротеин

	TagRFP- Ultramarine	TagRFP- gfasCP	TagRFP- anm2CP	TagRFP- spisCP
J(λ), нм⁴/М*см	4,511*10 ¹⁵	1,208*10 ¹⁶	6,233*10 ¹⁵	2,537*10 ¹⁵
R₀, Å	59	69	62	53

Все 4 FRET-пары имеют высокие значение этих параметров, что делает их перспективными кандидатами для создания FRET-сенсоров. Также экспериментально показано, что выбранные хромопротеины не флуоресцируют при возбуждении мощными световыми потоками на длине волны 530 нм, в отличие от ранее применявшегося во FRET-сенсоре с TagRFP белка KFP. Таким образом, ещё одним преимуществом новых FRET-пар является отсутствие фоновой флуоресценции.

Все 4 хромопротеина были экспрессированы в клетках *E. coli*, очищены, их олигомерное состояние охарактеризовано методами гель-фильтрации (ГФ) и динамического светорассеяния (ДСР). Полученные результаты отличались от данных, приведенных в литературных источниках. anm2CP присутствовал в растворе в димерной форме с примесью тетрамерной фракции, белки gfasCP и spisCP имели только димерную форму, Ultramarine – мономерную.

Таким образом, в первую очередь, был получен FRET-сенсор TagRFP-23-Ultramarine (TR-23-U), в котором 23 обозначает гибкий линкер из 23 аминокислот, содержащий сайт распознавания каспазы-3 DEVD. Подобраны условия оптимального созревания сенсора. После добавления индуктора IPTG клетки *E. coli*, экспрессирующие сенсор, инкубировали при 20°C в течение 20 часов для созревания TagRFP, затем при 37°C в течение 4 часов для созревания белка Ultramarine. Сенсор выделили и очистили последовательными гидрофобной и анионообменной хроматографиями как описано ранее. Методами гель-фильтрации и ДСР показано, что полученный сенсор является и оба белка в сенсоре находятся в мономерном состоянии (ГФ V, мл (Mw, кДа)= 15,5(32); ДСР R, нм (Mw, кДа) 2,8±0,2 (37±8)). Свойства новой конструкции в качестве FRET-сенсора были подтверждены на основании измерений времени жизни и интенсивности флуоресценции TagRFP до и после инкубации сенсора с каспазой-3 *in vitro*. Сенсор инкубировали с каспазой-3 в буфере (20 mM HEPES pH 7,4; 2 mM ЭДТА; 0,1% CHAPS, 5 mM дитиотреитола; 1 мг/мл БСА) в течение ночи при 37°C. После инкубации интенсивность флуоресценции TagRFP возросла более чем в 2 раза (рис. 1), что свидетельствует об эффективном гидролизе сенсора каспазой-3.

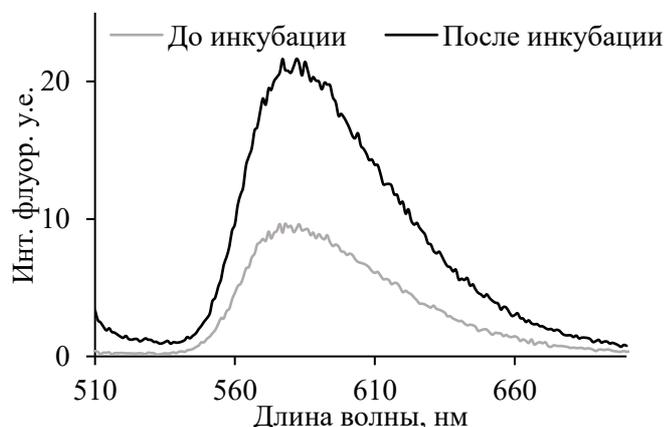


Рисунок 1. Спектры флуоресценции сенсора TR23U до и после инкубации с каспазой-3 в течение ночи

Более чувствительным способом детекции FRET является измерение времени жизни флуоресценции донора. Время жизни TagRFP в сенсоре TR-23-U описывается биэкспоненциальной зависимостью (1):

$$I = I_1 * \exp(-t/\tau_1) - I_2 * \exp(-t/\tau_2) + c \quad (1)$$

где $\tau_1 = 2,4$ нс соответствует времени жизни флуоресценции свободного TagRFP, $\tau_2 = 1,1$ нс характеризует TagRFP в паре с акцептором Ultramarine, поскольку наличие FRET снижает время жизни. Наличие долгоживущей компоненты для TagRFP-23-Ultramarine может свидетельствовать о наличии белковой конформации сенсора с минимальным FRET. Соотношение времени жизни свободного TagRFP и TagRFP-23-Ultramarine, в котором есть FRET, после ночной инкубации с каспазой-3 изменилось более чем в 5,8 раза, а фракции с высоким FRET (I_2 до и после) уменьшилось в 7 раз (Таблица 2).

Таблица 2. Параметры времени жизни флуоресценции белка TagRFP в сенсоре TR-23U до и после инкубации с каспазой-3.

	I₁	τ₁, нс	I₂	τ₂, нс	I₁/I₂
До инкубации	17200	2,4	30200	1,1	0,57
После инкубации	14400	2,4	4300	1,1	3,35

После инкубации интенсивность флуоресценции TagRFP возросла в 2 раза, а соотношение времен жизни флуоресценции свободного и связанного TagRFP изменилось в 5,8 раз в сторону свободного TagRFP. Возрастание этих двух показателей говорит о нарушении FRET между TagRFP и Ultramarine расщеплении сенсора каспазой 3 и возможности детекции не только по интенсивности, но и по времени жизни флуоресценции донора.

Получение бесцистеинового варианта SAASoti для работы в окислительных условиях клетки

Ранее получены варианты mSAASoti с индивидуальными заменами всех пяти а.о. цистеина, а также путем сайт-направленного и случайного мутагенеза получен вариант с одновременной заменой трёх а.о. цистеина mSAASoti-3C (содержит C21N/C71G/C176A). Этот вариант использовали в качестве матрицы для получения полностью бесцистеинового варианта путем введения замен в 105 и 117 положениях. Добавление замен, которые были успешны в одиночном варианте, привело к получению нефлуоресцирующих вариантов белка. Согласно 3D-модели SAASoti остатки в позициях 105 и 117 располагаются на соседних бета-листах бочонка. Вероятно, что объединение двух замен в этих положениях, работающих по отдельности, нарушает взаимодействие бета-листов и разрушает структуру белка, что приводит к нефлуоресцентным вариантам. Поэтому путем сайт-насыщающего одновременного мутагенеза по положениям 105 и 117 была получена библиотека клонов, из которых отобраны два наиболее ярко флуоресцирующих. Эти клоны содержали глицин в положении 105 и треонин или валин в положении 117. Новые варианты SAASoti были экспрессированы в *E. coli* и очищены по стандартной схеме. Новые варианты были названы moxSAASoti-V и moxSAASoti-T, что соответствует различиям только в заменах в положении 117 – валин или треонин, соответственно. Ход введения замен и названия новых вариантов представлены в Таблице 3.

Таблица 3. Ход введения замен в бифотохромный белок SAASoti и названия новых вариантов.

Исходный белок	Замены	Название нового варианта
SAASoti	V127T	mSAASoti
mSAASoti	C21N/C71G/C175A	mSAASoti-3C
mSAASoti-3C	C105G/C117V	moxSAASoti-V
mSAASoti-3C	C105G/C117T	moxSAASoti-T

Поскольку а.о. в положении 117 ориентирован наружу бочонка, его замена может привести к усилению агрегации новой формы белка. Поэтому методом гель-фильтрации было

проанализировано олигомерное состояние новых вариантов. Объемы элюирования для обоих вариантов соответствовали молекулярной массе 25,7 кДа, что соответствовало мономерной форме moxSAASoti. Это может свидетельствовать о том, что остаток 117 не играет существенной роли в олигомеризации вариантов moxSAASoti.

Было проанализировано, как замены влияют на фотохимические и фотофизические свойства. Кинетика фотовыключения зеленой формы белка описывается биэкспоненциальной моделью (уравнение (2)):

$$I = I_1 * \exp(-k_1 t) + I_2 * \exp(-k_2 t) + c \quad (2)$$

Биэкспоненциальное затухание флуоресценции ранее объяснялось существованием двух субпопуляций в возбужденном состоянии, которые затухают с разной скоростью.

Величины констант скорости фототушения новых вариантов имеют близкие значения и выше, чем у mSAASoti-3C и исходного mSAASoti, но при этом фотодеструкция меньше, чем у mSAASoti-3C.

moxSAASoti-T демонстрирует наиболее высокое отношение предэкспоненциальных интенсивностей I_1/I_2 , что свидетельствует о том, что быстропереключающийся компонент (k_1) вносит максимальный вклад в общую кинетику.

Также была проанализирована способность новых вариантов к зелено-красной фотоконверсии. Варианты mox, так же как их ближайший предок mSAASoti-3C, показали высокую скорость фотоконверсии, но низкую интенсивность получаемой красной формы (рис. 2). Возможно несколько причин этого явления: 1) малая яркость и 2) высокая фотохимическая активность красной формы. Это, безусловно, может быть сочетанием обеих причин, что является предметом дальнейших исследований.

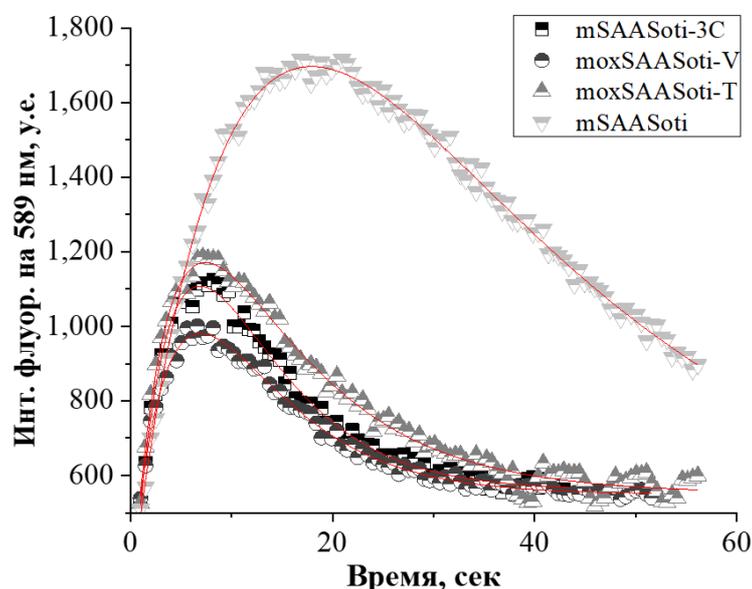


Рисунок 2. Кинетические кривые фотоконверсии вариантов mSAASoti, полученные при облучении 400 нм в сочетании с 550 нм для возбуждения флуоресценции красной формы. Экспериментальные данные представлены точками, аппроксимация — линиями. Буфер 200 мМ Tris-HCl, pH 7,4.

Процесс фотоконверсии регистрировался по изменению интенсивности флуоресценции красной формы ($\lambda_{em}=590$ нм). Он описывается биэкспоненциальной моделью (уравнение (3)):

$$I = -I_1 * \exp(-k_1 t) + I_2 * \exp(-k_2 t) + c \quad (3)$$

где первая компонента отвечает за образование красной формы, а вторая характеризует ее фотодеструкцию, c – фоновый и остаточный сигнал. Соответствующие кинетические параметры (Таблица 4) для вариантов тох близки к исходному mSAASoti-3C, что может свидетельствовать о том, что остатки в положениях 105 и 117 не влияют на фотоконверсию.

Таблица 4. Кинетические параметры фотовыключения и фотоконверсии, рассчитанные для вариантов mSAASoti

Вариант	Параметры фототушения зелёной формы ^а			Параметры фотоконверсии ^б	
	$k_1 * 10^3, c^{-1}$	$k_2 * 10^3, c^{-1}$	I_1/I_2	$k_1 * 10^3, c^{-1}$	$k_2 * 10^3, c^{-1}$
mSAASoti	55,5±1,0	8,3±0,7	1,9	62 ±1	55±1
mSAASoti-3C	95,2±2,0	5,0±0,2	0,7	273±16	106±4
moxSAASoti-T	131,6±0,9	7,5±0,3	3,7	278±16	79±2
moxSAASoti-V	113,6±1,3	7,3±0,4	2,9	270±14	107±4

^а параметры получены при анализе кинетики согласно уравнению (2)

^б параметры получены при анализе кинетики согласно уравнению (3)

Основываясь на параметрах фотопревращений новых вариантов, в качестве основного moxSAASoti был выбран вариант moxSAASoti-T, так как у него выше скорость фотовыключения, более полное восстановление флуоресценции после фотовыключения и выше скорость фотоконверсии, чем у moxSAASoti-V.

Были измерены и проанализированы основные физико-химические и спектральные свойства (максимумы возбуждения/испускания $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$, значения рКа хромофора, молярный коэффициент экстинкции (ϵ) и квантовый выход (ϕ)) moxSAASoti и других вариантов mSAASoti с заменами а.о. цистеинов (Таблица 5). Максимумы возбуждения и эмиссии для зеленой и красной форм не изменились. Молярный коэффициент экстинкции уменьшился, однако для зеленой формы он по-прежнему остается одним из самых высоких среди цистеиновых вариантов mSAASoti, а пониженное значение коэффициента экстинкции для красной формы может быть связано со снижением ее стабильности. Квантовый выход флуоресценции зеленой формы также снизился на 0,1, а молекулярная яркость нового варианта практически совпадает с C117S и C21N/C175A mSAASoti. Интересно, что наибольшее влияние новые замены оказывают на рКа красной формы moxSAASoti. Ранее все цистеиновые замены приводили к более высоким значениям рКа (за исключением mSAASoti C117S, который имеет такое же значение рКа mSAASoti). Мы предполагаем, что это может быть аллостерический эффект от T117, потому что предыдущий вариант с одной заменой C117S показал самую низкую рКа красной формы всех других мутантов с одиночными заменами цистеиновых остатков.

Таблица 5. Физико-химические и спектральные характеристики вариантов mSAASoti

	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	pKa	$\epsilon \cdot 10^{-3},$ $M^{-1} \cdot$ cm^{-1}	ϕ	Яркость ($\phi \cdot \epsilon$)
mSAASoti	509/519	6.3±0.1	75.0	0.59±0.02	44.3
	573/579	6.6±0.1	24.0		
mSAASoti-3C	509/519	6.4±0.1	83.8	0.60±0.02	50.3
	577/589	7.2±0.2	14.8		
moxSAASoti	509/519	6.1±0.1	71.8	0.50±0.02	35.9
	577/589	6.3±0.1	11.3		

Получение варианта moxSAASoti с яркой и стабильной красной формой

При анализе литературы было обнаружено, что замены в положениях 32, 97 и 170 значительно увеличивают яркость красной формы фотоконвертируемых флуоресцентных белков.

На основании выравнивания последовательностей в moxSAASoti были введены соответствующие замены T32E и F97M. Новые варианты были экспрессированы, выделены и очищены. При анализе кинетик фотоконверсии на очищенных препаратах белков также видно, что более интенсивная и стабильная флуоресценция красной формы образуется для варианта с заменой F97M. (Рис. 3).

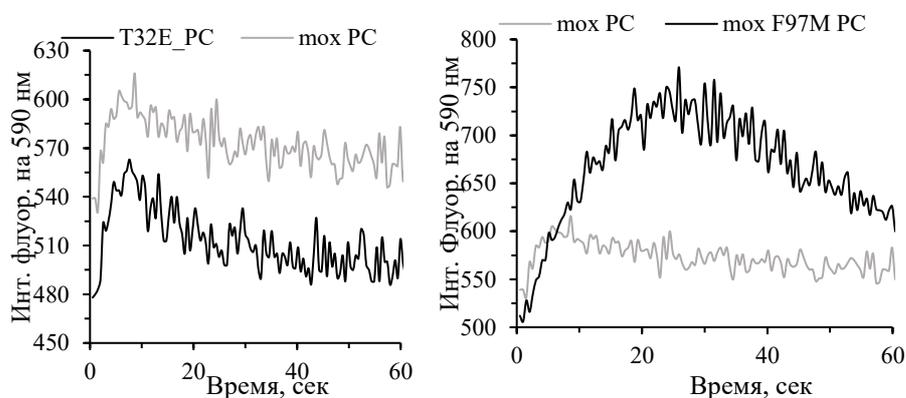


Рисунок 3. Кинетики фотоконверсии moxSAASoti и его вариантов с заменами T32E и F97M. Регистрация велась на длине волны 590 нм. Облучение проводилось одновременно светом 400 нм для фотоконверсии и 560 нм для возбуждения флуоресценции красной формы. Буфер 250 mM Tris-HCl, pH 7,4

Дальнейшая характеристика проводилась для варианта moxSAASoti^{F97M} как для более перспективного варианта. Для moxSAASoti^{F97M} характерны возрастание коэффициента экстинкции зелёной формы более чем на 20000 и квантового выхода на 0,1, а также возрастание коэффициента экстинкции красной формы почти в два раза и квантового выхода в 4 раза (Таблица 6).

Таблица 6. Физико-химические и спектральные характеристики вариантов *toxSAASoti*

	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	pK _a	$\epsilon, M^{-1} \text{ cm}^{-1}$	ϕ	Яркость ($\phi \cdot \epsilon$)
<i>toxSAASoti</i> (зел.)	509/519	6.1±0.1	71800	0.50±0.02	35900
<i>toxSAASoti</i> (красн.)	577/589	6.3±0.1	11300	0,10 ± 0,03	1130
<i>toxSAASoti</i>^{F97M}(зел.)	509/519	6,1±0,1	95360	0,61±0,02	58170
<i>toxSAASoti</i>^{F97M}(красн.)	578/590	6,5±0,1	20000	0,40±0,01	8000

Также показано, что новая форма имеет высокую фотостабильность красной формы. При облучении возбуждающим светом интенсивность флуоресценции не снижается в течение 5 минут. Был проведен сайт-насыщающий мутагенез по 97 положению. В результате анализа колоний были отобраны два клона – 16 и 19 - с отличающимися кинетикой фотоконверсии – наблюдалась стабильная и яркая красная форма. Секвенированием показано, что варианты содержат замены F97V и F97L, соответственно. Новые варианты были выделены и очищены. Для варианта F97L характерна одна из самых быстрых скоростей образования красной формы (быстрее только для исходного *toxSAASoti*), а также визуально более высокая интенсивность флуоресценции красной формы, а для варианта F97V наименьшая скорость фотодеструкции (Рис. 4).

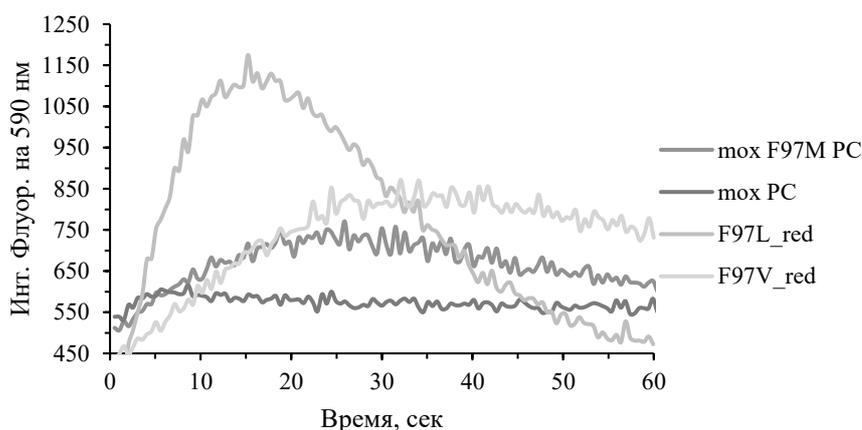


Рисунок 4. Кинетика фотоконверсии *toxSAASoti* и его вариантов с заменами F97M, F97L и F97V. Регистрация велась на длине волны 590 нм. Облучение проводилось одновременно светом 400 нм для фотоконверсии и 560 нм для возбуждения флуоресценции красной формы. Буфер 250 мМ Tris-HCl, pH 7,4

Также были охарактеризованы параметры фотопереключения новых вариантов. Константы скоростей фотопереключения новых вариантов близки к *toxSAASoti*^{F97M}, однако глубина фототушения варианта F97V значительно ниже. Также для всех вариантов *toxSAASoti* сохраняется моноэкспоненциальность во втором цикле тушения. Очевидно, что а.о. в положении 97 оказывает значительное влияние на не только на параметры фотоконверсии, но и на параметры фотопереключения *toxSAASoti*. Путем варьирования аминокислотного остатка в этом положении возможен подбор оптимальных свойств белка для соответствующих приложений.

Улучшение созревания moxSAASoti при 37°C

Созревание флуоресцентных белков – сложный процесс, объединяющий экспрессию, фолдинг белка и трехэтапное автокаталитическое формирование хромофора. Поскольку все известные на сегодняшний день GFP-подобные белки выделены из морских организмов (кораллов или медуз), для большинства из них нормальная физиологическая температура созревания порядка 20°C. Согласно литературным данным замены в положениях 15, 74, 78 улучшили созревание белков при 37°C. При анализе выравнивания последовательностей moxSAASoti и других фотоконвертируемых и бифотохромных белков было отмечено, что у большинства в положениях 15 и 74 находятся лизины, поэтому для этих положений в качестве замен выбраны N15K, E74K, для 78 - H78N.

Были индивидуально введены замены I15K и H74K, G78N в последовательность moxSAASoti. Для анализа созревания ДНК новых форм были трансформированы в *E.coli* BL21(DE3) и высеяны на агаризованную среду с индуктором транскрипции ИПТГ. Колонии инкубировались при 37°C в течение ночи, а затем анализировалась интенсивность флуоресценции колоний на 520 нм. Показано, что флуоресценция появилась только у варианта с заменой H74K (Рис. 5).

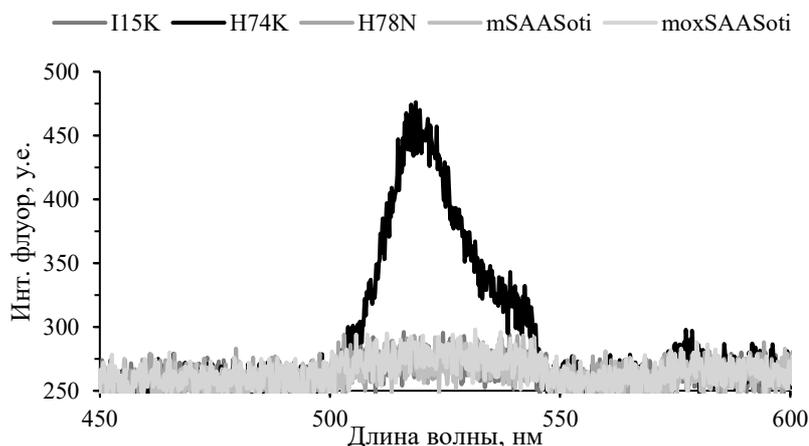


Рисунок 5. Спектры флуоресценции колоний вариантов SAASoti. Спектры регистрировались при возбуждении светом 470 нм.

Также было проанализировано влияние новых замен на фотоконверсию и фотопереключение. Новые формы сохранили свойство фотопереключения, фотоконверсия не улучшилась по сравнению с moxSAASoti. Наиболее перспективным вариантом был выбран moxSAASoti^{H74K}. Был проведен сайт-насыщающий мутагенез по положению 74. Получено 62 колонии, которые были пересеяны на среду с ИПТГ и инкубировались в течение ночи при 37°C. Измерялась интенсивность флуоресценции на длине волны 520 нм при возбуждении на 470 нм. (Рис. 6)

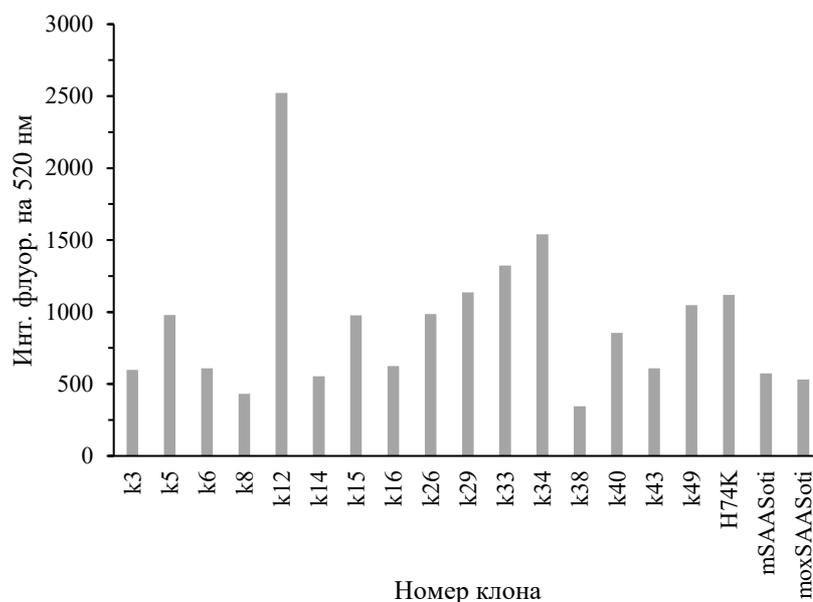


Рисунок 6. Интенсивности флуоресценции на 520 нм колоний, содержащих клоны *moxSAASoti* со случайной заменой в 74 положении.

Наиболее высокая интенсивность флуоресценции характерны для клона 12, более чем в 2 раза превышающая интенсивность для варианта H74K. Секвенирование ДНК показало, что этот клон содержит замену H74A. Для нового варианта выше контраст фотопереключения и фотоконверсии. Возможно, замена в этом положении улучшает фолдинг белка, однако очевидно, что аминокислотный остаток в положении 74 оказывает влияние на созревание *moxSAASoti*.

Также было обнаружено положение 125, замена в котором может приводить к улучшению созревания. Было решено проверить является ли это положение «горячей точкой» и у *moxSAASoti*. Клетки *E. coli*, экспрессирующие *moxSAASoti*^{H125Y} был пересеяны на твердую среду с добавлением индуктора транскрипции IPTG и инкубировались в течение ночи при 37°C. На следующий день были проанализированы интенсивности флуоресценции белка в клетках. Для варианта *moxSAASoti*^{H125Y} характерно многократное возрастание флуоресценции клеток по сравнению с предыдущими вариантами (Рис. 7).

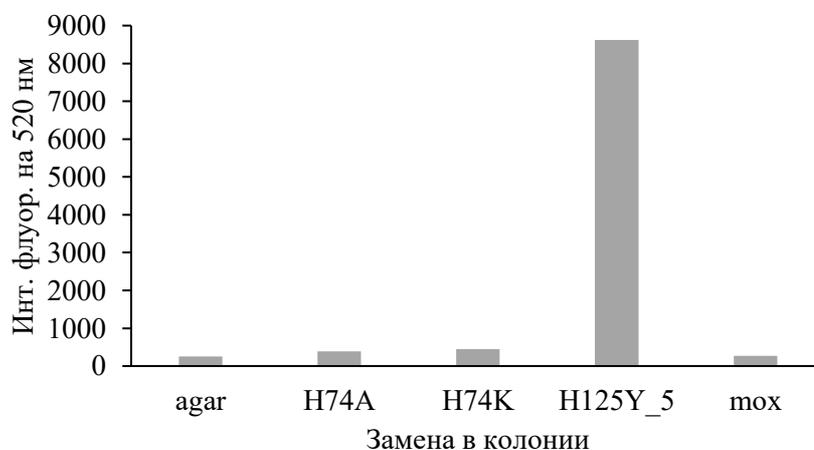


Рисунок 7. Интенсивность флуоресценции колоний, содержащих варианты *moxSAASoti*.

Объединение замен путем случайного одновременного мутагенеза

Было решено объединить замены в положениях 97, 74, 125 путем одновременного случайного мутагенеза по этим положениям. Получено и проанализировано около 500 колоний, флуоресценция была обнаружена у 12. Колонии облучались светом 470 нм для анализа наличия флуоресценции. Затем облучались одновременно светом 400+560 нм для определения наличия фотоконверсии. По кинетике фотоконверсии отобраны варианты, у которых кривые выходят на плато, то есть красная форма наиболее стабильна. Это 5 вариантов: клоны 1_2, 1_7, 1_6, 2_4, 2_8. Все клоны флуоресцировали после инкубации в течение ночи при 37°C, однако клон 2_8 имел низкую интенсивность флуоресценции, также как и низкую эффективность фотоконверсии, по сравнению с остальными вариантами (Рис. 8). Этот клон было решено исключить из выборки.

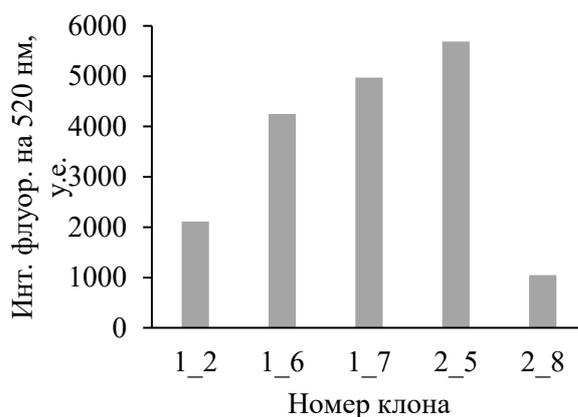


Рисунок 8. Интенсивность флуоресценции колоний со случайными заменами в положениях 74, 97 и 125.

По результатам секвенирования все клоны содержат одинаковые замены в положениях 74 – это H74K и 97 – это F97M. В положении 125 замен не обнаружено. Новая форма была выделена и охарактеризована. Для нее характерны повышенные значения pKa и сниженная молекулярная яркость красной формы по сравнению с F97M moxSAASoti (Табл. 7).

Таблица 7. Спектральные и физико-химические характеристики вариантов moxSAASoti

	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	pKa	$\epsilon, M^{-1} cm^{-1}$	ϕ	Яркость ($\phi \cdot \epsilon$)
moxSAASoti F97M(зел.)	509/519	6,1±0,1	95360	0,61±0,02	58170
moxSAASoti F97M (красн.)	578/590	6,5±0,1	20000	0,40±0,06	8000
moxSAASoti F97M/H74K(зел.)	509/519	6,5±0,1	73260	0,60±0,01	43956
moxSAASoti F97M/H74K(красн.)	576/589	7,0 ±0,1	17615	0,33±0,07	5812

Однако при фотоконверсии результирующая интенсивность красной формы выше, однако наблюдается фотодеструкция при постоянном облучении светом 400+560 нм (Рис. 9А). По-видимому, причиной фотодеструкции является облучение светом с длиной волны 400 нм, поскольку при облучении только светом 560 нм красная форма демонстрирует высокую фотостабильность (Рис. 9Б).

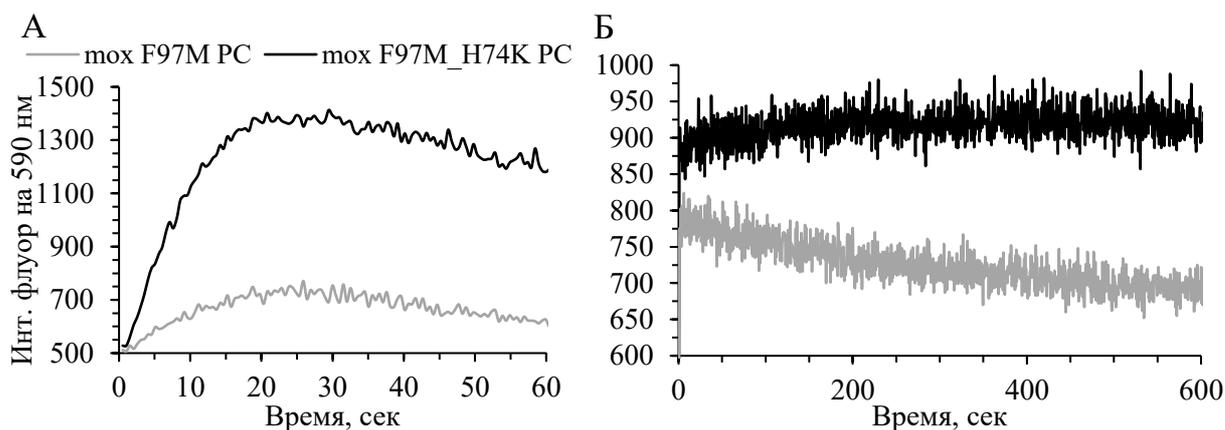


Рисунок 9. Кинетика фотоконверсии вариантов *moxSAAsoti* F97M и F97M_H74K.

Новую форму было решено назвать *newmoxSAASoti*. Планировалось применение нового белка в качестве донора во FRET-паре с хромопротеином и использование сенсора в методе ФКС.

Создание сенсора *newmoxSAASoti*-хромопротеин и кристаллизация *moxSAASoti*

Создана конструкция и подобраны оптимальные условия биосинтеза и созревания белка слияния *newmoxSAASoti*-23-Ultramarine. Общее количество сенсора относительно других бактериальных белков оказывалось ниже, однако в очищенной фракции наблюдались пики поглощения обоих белков, что говорит об успешном фолдинге и созревании хромофоров (Рис. 10).

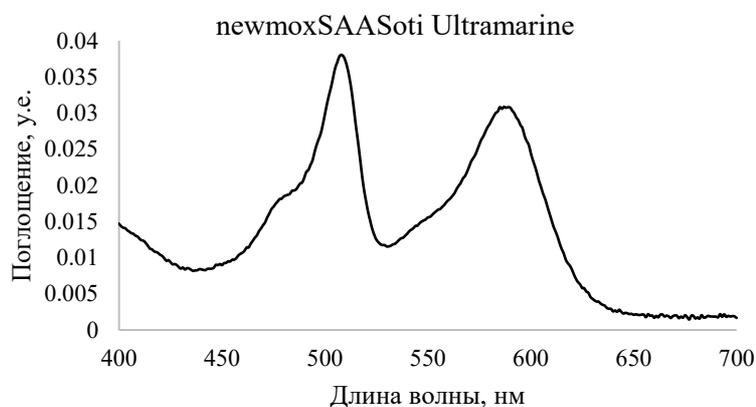


Рисунок 10. Спектр поглощения очищенной фракции белка слияния *moxSAAsoti*^{F97M/H74K}-23-Ultramarine

Полученную фракцию фотоконвертировали (100 % 400 нм, 3 мин) и определили эффективность FRET путем измерения времен жизни флуоресценции свободного *moxSAAsoti*^{F97M/H74K} и в белке слияния (Таблица 8).

Таблица 8. Значения времен жизни и эффективности FRET для *moxSAASoti*^{F97M/H74K}

	Время жизни флуоресценции
<i>newmoxSAASoti</i> (красная форма)	3,3 нс
<i>newmoxSAASoti-23-Ultramarine</i>	2,7 нс
Эффективность FRET	18%

Затем был проведен гидролиз сенсора каспазой 3 для оценки эффективности сенсора как субстрата. Через час инкубации при 37°C время жизни *moxSAASoti*^{F97M/H74K} возросло с 2,7 нс до 3,3 нс, что говорит об эффективном гидролизе.

Свободный белок и сенсор были экспрессированы в клетках HeLa для дальнейшего анализа.

Кристаллизация *moxSAASoti* F97M *in cellulo*

При экспрессии вариантов *moxSAASoti*^{F97M} и *moxSAASoti*^{F97M/H74K} в клетках HeLa было обнаружено, что обе эти формы олигомеризуются в клетках необычным образом, образуя структуры, напоминающие игольчатые кристаллы, ярко флуоресцирующие и постепенно увеличивающиеся в размерах (Рис. 11А, Б). Для GFP-подобных белков известны два случая кристаллизации белка непосредственно в клетке. В одном случае, удалось наблюдать ромбовидные кристаллы непосредственно в материнском коралле флуоресцентного белка *Zoanthus*, в другом случае удалось получить крупный ромбовидный кристалл фотоконвертируемого белка *mKikGR* в клетках HEK293.

Анализ анизотропии флуоресценции структур белка в клетке показал, что величина этого параметра сильно зависит от ориентации «иглы» белка и плоскости поляризации возбуждающего света (Рис. 11 В, Г). Можно предположить, что структура высокоупорядоченная в одном направлении и с высокой долей вероятности кристаллическая.

Учитывая, что *moxSAASoti* полностью мономерен, что было подтверждено результатами гель-фильтрации и ДСР, на склонность к агрегации повлияла именно замена F97M. А. о. 97 ориентирован внутрь бочонка, из чего можно сделать вывод, что он не напрямую участвует в агрегации, а каким-то образом изменяет динамику бета-цепей бочонка (Рис. 12).

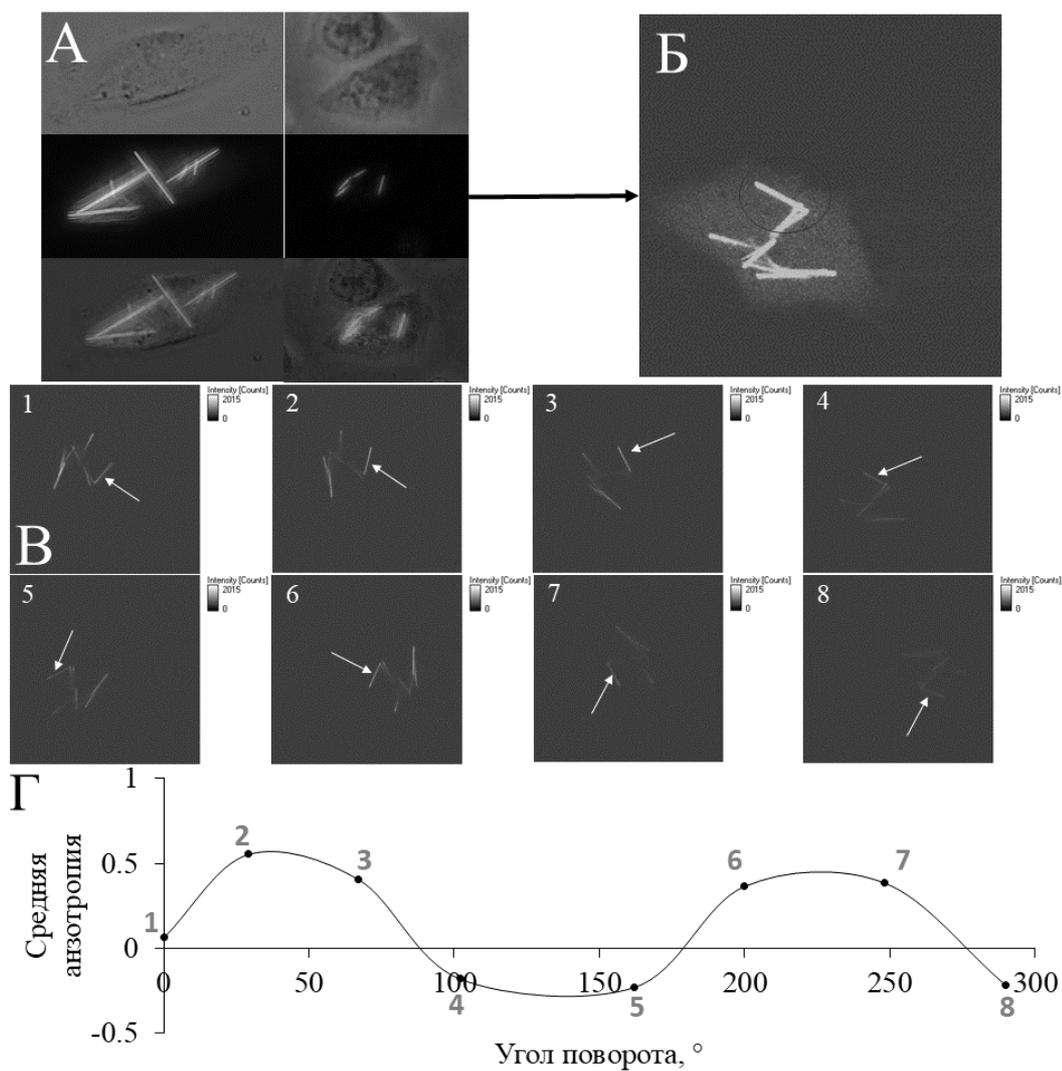


Рисунок 11. А - Контрастные (верхняя линия), флуоресцентные (средняя линия) и слитые (нижняя линия) изображения клеток HeLa, экспрессирующих вариант toxSAASoti^{F97M} , через 48 часов после трансфекции. Б - Флуоресцентное изображение клетки HeLa, выбранной для измерения анизотропии. В - Положения внутриклеточного кристалла toxSAASoti^{F97M} , для которых были зарегистрированы значения анизотропии. Кристалл, для которого рассчитывалась анизотропия, указан стрелкой. Клетки помещали на стекло чашки Петри, которую вручную вращали против часовой стрелки. Г - Зависимость среднего значения анизотропии от угла поворота кристалла (в качестве точки отсчета использовалась первая позиция).

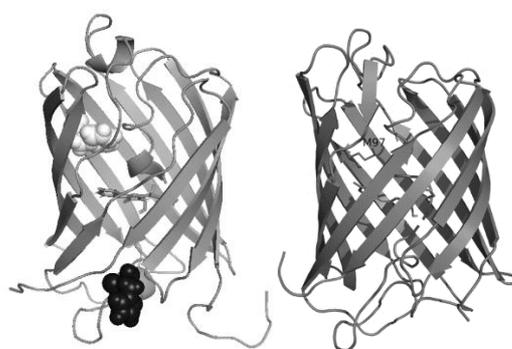


Рисунок 12. Слева - 3D-модель SAASoti. Белыми сферами обозначен а.о. F97, черными – H74. Справа – реальная структура toxSAASoti^{F97M} , M97 также ориентирован внутрь бочонка

Склонность нового варианта к формированию кристаллов в клетках позволила предположить, что в растворе белок также сможет сформировать кристаллическую структуру. Таким образом удалось получить кристаллы $\text{toxSAASoti}^{\text{F97M}}$, которые характеризовались высокой скоростью роста по сравнению с вариантом $\text{mSAASoti}^{\text{C21N}}$ (несколько дней против примерно двух месяцев). Структура $\text{toxSAASoti}^{\text{F97M}}$ была получена с разрешением 1,9 Å в орторомбической пространственной группе (3,0Å и гексагональная пространственная группа для $\text{mSAASoti}^{\text{C21N}}$) и напоминает классический β-бочонок с хромофором 66HYG68, погруженным в центр α-спирали, пронизывающей бочонок (рис. 13 А). Асимметричная единица $\text{toxSAASoti}^{\text{F97M}}$ содержала две белковые молекулы, аналогичные таковым в $\text{mSAASoti}^{\text{C21N}}$. Однако контактный анализ кристаллов выявил серьезные различия (рис. 13А, Б), отражающие разные пространственные группы.

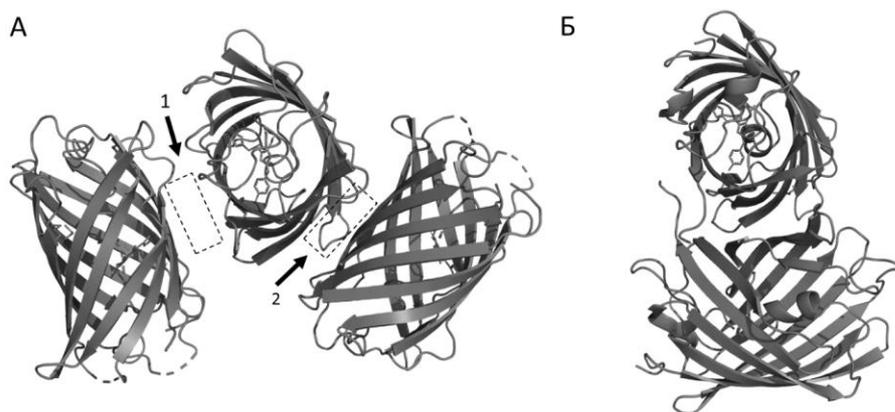


Рисунок 13. Кристаллическая упаковка $\text{toxSAASoti}^{\text{F97M}}$ (А) и $\text{mSAASoti}^{\text{C21N}}$ (Б). Одна субъединица из асимметричной единицы показана по центру на панели А и сверху на панели Б и на обеих панелях представлена в одинаковой ориентации.

Как и предполагалось, М97 располагается вблизи поверхности белка, а его боковая цепь ориентирована внутрь β-цилиндра, поэтому он вряд ли принимает непосредственное участие в межсубъединичных взаимодействиях, которые могут влиять на упаковку кристаллов. Однако, по сравнению с $\text{mSAASoti}^{\text{C21N}}$, конформации некоторых поверхностных аминокислотных остатков вблизи М97 в $\text{toxSAASoti}^{\text{F97M}}$ претерпели изменения (рис. 46), что потенциально может привести к образованию новых (по сравнению со структурой $\text{mSAASoti}^{\text{C21N}}$) кристаллических контактов и усилению кристаллизации в новой пространственной группе. Видно, что остатки Е39, К145, S198 и Н214 образуют сеть водородных связей с Q142, Е200 и N212 в интерфейсе 1, что может облегчить упаковку кристалла (рис. 46, левая панель). Кроме того, было замечено, что боковая цепь F104 имеет четкую ориентацию, что позволяет осуществлять стэкинг-взаимодействие с Н178 в интерфейсе 2 в кристалле (рис. 46, правая панель).

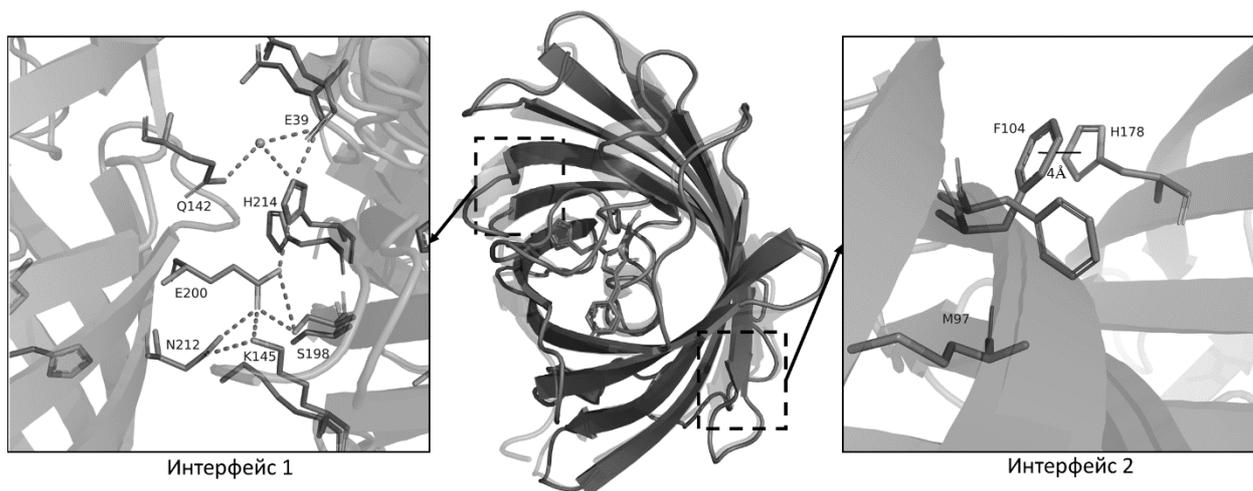


Рисунок 14. Изменения в кристаллической упаковке moxSAASoti^{F97M} (темный) в области интерфейса 1 (левая сторона) и в области интерфейса 2 (правая сторона) по сравнению с кристаллическим пакетом mSAASoti^{C21N} (светлый), в котором отсутствуют оба этих интерфейса. Критические изменения в положении H214 в интерфейсе 1 и F104 в интерфейсе 2 показаны в соответствии с схемой moxSAASoti^{F97M} аналогично рис. 50A, mSAASoti^{C21N} окрашен в прозрачный синий цвет. Полярные контакты показаны пунктиром. Молекулы воды показаны сферами.

Поскольку ранее уже наблюдались аллостерические эффекты других замен на общие свойства белка SAASoti, можно предположить, что замена F97M может косвенно влиять на динамику поверхностных остатков, приводя к альтернативной кристаллической упаковке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Флуоресцентные белки стали мощным инструментом для детекции внутриклеточных процессов в качестве генетически-кодируемых меток. Мутагенез аминокислотных остатков цистеина позволил получить более инертный вариант moxSAASoti , так же повысив его устойчивость к окислительным условиям. Рациональный и сайт-насыщающий мутагенез по положениям 74 и 97 позволил не только улучшить практические свойства moxSAASoti , но и получить фундаментальные представления о «горячих точках» у флуоресцентных белков. Получение новой кристаллической структуры moxSAASoti^{F97M} имеет ценность для дальнейшего рационального мутагенеза белка. Не менее важную роль во FRET-паре является выбор акцептора, в данной работе необходим был мономерный хромопротеин с высоким интегралом перекрытия с TagRFP и красной формой moxSAASoti : этим требованиям отвечал белок Ultramarine, который и был выбран и использован в двух FRET сенсорах в качестве акцептора. Новые FRET-пары можно использовать для создания сенсоров на различные протеазы.

ВЫВОДЫ

1. В работе впервые был получен бесцистеиновый вариант moxSAASoti с заменами всех пяти аминокислотных остатков цистеина, характеризующийся возросшей скоростью фотоконверсии

2. В качестве нефлуоресцирующего акцептора флуоресценции для FRET сенсора выбран хромопротеин Ultramarine, поскольку он имеет высокие значения интегралов перекрывания с SAASoti и TagRFP и мономерен. Сенсор TagRFP-23-Ultramarine имеет эффективность FRET 54% и гидролизуетея каспазой 3.
3. Введение замены F97M, привело к возрастанию молекулярная яркость и фотостабильность красной формы moxSAASoti. Замена F97V повысила фотостабильность moxSAASoti при возбуждении светом 400 нм.
4. Замены в 74 положении (лизин или аланин) улучшают созревание moxSAASoti при 37°C.
5. Объединение замен в положениях 97 и 74 привело к получению варианта moxSAASoti^{F97M/H74K} с яркой и стабильной красной формой и улучшенным созреванием при 37°C.
6. Замена F97M аллостерически повлияла на взаимодействие бета-цепей в бочонке и образованию новых интерфейсов взаимодействия, что привело к быстрой кристаллизации белка как в растворе, так и в клетках млекопитающих. Новое свойство позволило получить структуру с разрешением 1,9 Å.
7. Показано, что белок слияния moxSAASoti^{F97M/H74K}-23-Ultramarine имеет эффективность FRET 18% и гидролизуетея каспазой 3.

Список работ, опубликованных автором по теме диссертации.

1. Marynich N. K., Khrenova M. G., Gavshina A. V., Solovyev I. D., Savitsky A. P., First biphotochromic fluorescent protein moxSAASoti stabilized for oxidizing environment // Scientific Reports. – 2022 – Vol. 12(1). – P. 7862. IF 3,8
2. Марынич Н.К., Грановский И.Э., Савицкий А.П. Новые FRET-пары флуоресцентных белков для определения активности каспаз in vitro // Прикладная биохимия и микробиология – 2022. – Т. 58(6). – С. 592-597. IF 1,7
3. Марынич Н.К., Савицкий А.П. Определение «горячих точек» для улучшения созревания флуоресцентного белка moxSAASoti при 37 °C // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2024. Т. 65. № 3. С. 255–261. IF 0,78
4. Marynich N.K., Boyko K.M., Matyuta I.O., Minyaev M.E., Khadiyatova A.A., Popov V.O., Savitsky A.P. Single-point substitution F97M leads to in cellulo crystallization of the biphotochromic protein moxSAASoti // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2024. – V. 732 (). – P. 150419. IF 2,5

Тезисы конференций

1. **Марынич Н.К.**, Создание биосенсора на основе FRET-пары TagRFP-хромобелок: подбор оптимального хромобелка. //Материалы XXVII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2020», секция «Химия» – М.: Издательство «Перо» – 2020. – С. 1568
2. **Марынич Н.К.**, Гавшина А.В., Савицкий А.П. moxSAASoti: первый бифотохромный флуоресцентный белок, устойчивый в окислительных условиях, для применения в суперразрешающей микроскопии. // Сборник тезисов XXXIV Международной зимней

молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии – М.: ИБХ РАН – 2022. – С. 27

3. **Марынич Н.К.**, Савицкий А.П., Хренова М.Г. Выбор оптимального хромобелка в качестве акцептора во FRET паре. // Научные труды. VI съезд биохимиков России, Сочи, Дагомыс (3-8 октября 2021) – М.:Издательство «Перо». – 2021. – Т. 2. – С. 296.

4. Меерович И.Г., **Марынич Н.К.**, Грановский И.Э., Фикслер Д., Савицкий А.П. Получение комплексов на основе золотых наночастиц и FRET-сенсоров каспазы 3 на основе флуоресцентных белков. // Научные труды. VI съезд биохимиков России, Сочи, Дагомыс (3-8 октября 2021) – М.:Издательство «Перо». – 2021. – Т. 2. – С. 292.

5. Хренова М.Г., А.В. Гавшина, И.Д. Соловьев, **Марынич Н.К.**, Савицкий А.П. Влияние динамических свойств фотопереключаемых и фотоконвертируемых белков семейства SAASot1 на фотофизические и фотохимические свойства. // Научные труды. VII съезд биохимиков России, Сочи, Дагомыс (3-8 октября 2022) – М.:Издательство «Перо». – 2022. – Т. 3. – С. 74.

6. Savitsky A.P., Solovyev I.D, Meerovich I.G., Granovsky I.E., **Marynich N.K.**, Tuchina D.K., Konovalov A.B., Vlasov V.V., Tuchin V.V. Multimodal MRI and life-time fluorescence sensors for theranostic applications. // OASIS 8. International Conference & Exhibition on Optics & Electro-Optics, Tel-Aviv, Israel 12-13 December 2022. Digital Abstract Book – 2022. – P. 52

7. **Марынич Н.К.**, Грановский И.Э., Савицкий А.П. Создание FRET-сенсоров флуоресцентный белок-хромопротеин для детекции активности каспазы 3 in vitro и in vivo. // Тезисы докладов 13-ой Международной научной конференции «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения» (г. Суздаль, 25-29 июня 2023 г.) – М.: Издательство «Адмирал принт». – 2023. – С. 107