

УДК 577.29

# Механизм тушения флуоресценции белковых фотосенсибилизаторов на основе miniSOG в процессе интернализации рецептора HER2

Е. О. Кузичкина\*, О. Н. Шилова, С. М. Деев

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

\*E-mail: kuzichkinazhenya@mail.ru

Поступила в редакцию 04.08.2018

Принята к печати 04.10.2018

**РЕФЕРАТ** Белковый фотосенсибилизатор miniSOG является перспективным агентом для фотодинамической терапии. Генетически кодируемые фототоксины 4D5scFv-miniSOG и DARPIn-miniSOG способны специфически связываться с онкомаркером HER2, который сверхэкспрессируется на поверхности раковых клеток, а также способствовать его интернализации. Установлено, что попадание белков в комплексе с этим рецептором в эндосомы приводит к падению флуоресцентного сигнала фототоксического модуля. С целью выяснения механизма угасания флуоресценции проанализировано влияние таких факторов, как низкие значения pH, протеолиз, восстановление кофактора и др. Обнаружено, что значимый вклад в изменение флуоресцентных свойств вносит экранирование и поглощение флуоресценции miniSOG флуорофорами клетки, в том числе цитохромом c.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** адресные белковые фотосенсибилизаторы, интернализация, miniSOG, рецептор HER2, флуоресценция.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** HER2 – рецептор 2 эпидермального фактора роста человека; scFv – одноцепочечный вариабельный фрагмент антитела; DARPIn – искусственный белок с анкириновыми повторами (Designed Ankyrin Repeat Protein); FITC – флуоресцеинизотиоцианат; FMN – флавиномононуклеотид; IPTG – изопропил-β-D-тиогактопиранозид; ПААГ – полиакриламидный гель; PBS – фосфатно-солевой буфер; GSH – глутатион.

## ВВЕДЕНИЕ

Направленная доставка противораковых агентов для фотодинамической терапии приобретает все большее значение в современной тераностике. Этот подход позволяет повысить селективное накопление фотосенсибилизатора в опухоли и обеспечить его доставку в желаемый внутриклеточный компартмент [1, 2]. В качестве нацеливающих фрагментов могут использоваться моноклональные антитела, фрагменты антител и другие белки, селективно связывающиеся с опухолевыми антигенами.

Поверхностный клеточный рецептор HER2/neu, также известный как ErbB2, является значимым опухолевым маркером и наиболее изученной мишенью для разработки новых терапевтических агентов, поскольку он сверхэкспрессируется во многих типах опухолей, в том числе в клетках рака молочной железы человека, и ассоциирован с агрессивным фенотипом [3, 4].

Ранее в лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН были получены и охарактеризованы генетически кодируемые адресные фототоксины 4D5scFv-miniSOG [5] и DARPIn-miniSOG [6]. В качестве нацеливающих модулей использовали фрагмент моноклонального антитела 4D5scFv и искусственный белок DARPIn<sub>9-29</sub>, селективно распознающие внеклеточный домен рецептора эпидермального фактора роста человека HER2/neu. В качестве фототоксического модуля в обоих случаях использовали фотоактивируемый флуоресцентный флавопротеин miniSOG [7]. Оба белка показали избирательный фототоксический эффект *in vitro*: для HER2-положительных клеток аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3 IC<sub>50</sub> составила 160 нМ в случае 4D5scFv-miniSOG и 0.8 мМ в случае DARPIn-miniSOG. Также оба белка обладали способностью вызывать рецептор-опосредованный эндцитоз [4–6], однако скорость интернализации DARPIn-

miniSOG в комплексе с HER2 оказалась выше, чем у комплекса с 4D5scFv-miniSOG [8]. Поскольку константы диссоциации фототоксинов и рецептора, определенные с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса, имеют сравнимые значения, был сделан вывод о том, что решающее значение для эффективности данных фотосенсибилизаторов имеет скорость интернализации, определяющая время нахождения токсина на мембране.

Быстрая оценка динамики интернализации данных белков стала возможной благодаря тому, что miniSOG обладает собственной флуоресценцией, интенсивность которой падает при попадании фототоксинов в эндосомы. Однако механизм угасания флуоресценции miniSOG при попадании в клетку до сих пор не был установлен, и, исходя из процессов, происходящих в эндосоме, можно сформулировать несколько гипотез, объясняющих данное явление. Подобное угасание флуоресценции некоторых флуорофоров в эндосоме может быть связано с протонированием при понижении pH. Так, флуоресцеинизотиоцианат (FITC) реагирует на изменение кислотности и используется для изучения интернализации клеточных рецепторов [9]. Основой хромофора miniSOG является флавиномононуклеотид (FMN), который также способен подвергаться протонированию, что может служить причиной падения флуоресценции [9, 10]. Флуоресцентные свойства белка miniSOG определяются его кофактором, поэтому протеолиз в эндосоме или лизосоме считается менее вероятной причиной этого явления. Наконец, падение интенсивности флуоресценции фототоксинов может быть следствием экранирования miniSOG и поглощения его флуоресценции хромофорами цитоплазмы.

Данная работа посвящена изучению причин падения интенсивности флуоресценции белковых фототоксинов 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG. Угасание miniSOG в эндосоме делает этот модуль удобным инструментом для изучения динамики интернализации, однако важно понимать причины этого явления, так как флуоресцентные свойства miniSOG неразрывно связаны с его токсическими свойствами, и физико-химические процессы, происходящие с ним в различных компартментах клетки, должны учитываться при разработке систем доставки фототоксина к терапевтическим мишеням.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Клеточные линии и условия культивирования

Клетки аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, сверхэкспрессирующие поверхностный рецептор HER2, и клетки яичников китайского хомячка CHO (Chinese hamster ovary) культивировали

в среде McCoy's 5A (Life Technologies, США), содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка (FBS) (HyClone, Бельгия) и 2 mM L-глутамин («ПанЭко», Россия) в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C.

### Получение рекомбинантных белков 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG

Белки 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG нарабатывали в бактериях *Escherichia coli* штамм BL21(DE3). Клетки трансформировали плазмидой pET22b, содержащей ген соответствующего белка. Трансформированные бактерии растили в жидкой питательной среде LB (1% триптона, 0,5% дрожжевого экстракта, 1% NaCl) до достижения оптической плотности OD<sub>600</sub> = 0.5. Экспрессию индуцировали 1 mM изопропил-β-D-1-тиогактопиранозидом (IPTG, Merck, Германия), после чего биомассу растили при 25°C в течение 24 ч. Полученную биомассу осаждали центрифугированием (10000g, при 4°C) в течение 10 мин, ресуспендировали в 60 мл 20 mM фосфатного буфера (3.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 16.8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3 M NaCl, pH 7.5) и лизировали при помощи ультразвука на дезинтеграторе VCX120 (Sonic and Materials Inc., США) в импульсном режиме (30 с – импульс, 30 с – охлаждение, амплитуда – 70%) в течение 5 мин. Для разделения растворимой и нерастворимой фракций лизат центрифугировали (50000g, при 10°C) в течение 30 мин, осадок отделяли от супернатанта, из которого выделяли целевые белки.

Из растворимой фракции белки 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG выделяли с использованием металл-хелатной аффинной хроматографии на колонке HisTrap FF 1 мл (GE Healthcare, США), содержащей Ni<sup>2+</sup>-NTA-сефарозу. Элюцию белков проводили ступенчатым изменением концентрации имидазола от 15 до 500 mM в 20 mM фосфатном буфере (pH 7.5) с рабочей скоростью 0.5 мл/мин с использованием УФ-ячейки (RD2:250-280, Reach Devices, США), детектирующей светопоглощение при 260 и 280 нм. После хроматографии белковые фракции анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия по Лэммли. Концентрацию целевых белков определяли биуретовой реакцией в присутствии бицинониновой кислоты при помощи набора Pierce BSA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, США) по протоколу производителя.

### Подтверждение специфичности связывания 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG с рецептором HER2

Присутствие рецептора HER2 на клетках и специфичность связывания с ним белков 4D5scFv-

miniSOG и DARPin-miniSOG анализировали с помощью проточного цитометра BD Accuri C6 (Becton Dickinson, США) со следующими параметрами: мощность лазера 20 мВт, длина волны 488 нм, фильтры 533/30 BP (FL1-канал) для детекции флуоресценции белков и 585/40 BP (FL3-канал) для детекции флуоресценции йодида пропидия. Данные анализировали с использованием программного обеспечения BD Accuri C6 Software и обрабатывали в программе FlowJo. В эксперименте использовали HER2-положительные клетки SK-BR-3 и HER2-отрицательные клетки CHO. На каждую пробу брали  $\sim 10^5$  клеток, инкубировали их с белками 4D5scFv-miniSOG, DARPin-miniSOG, 4D5scFv, конъюгированным с FITC (4D5scFv-FITC), или бета-лактоглобулином, конъюгированным с FITC ( $\beta$ -LG-FITC) (все белки в концентрации 2 мкМ) в PBS, содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина («Диаэм», Россия), в течение 15 мин в темноте на льду. После окрашивания клеточную суспензию дважды отмывали в PBS, содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина. Для исключения из анализа мертвых клеток перед измерением пробу в течение 5 мин инкубировали с йодистым пропидием в концентрации 2.5 мкг/мл. При измерении флуоресценции выделяли популяции одиночных клеток по параметрам светорассеяния (FSC-H/FSC-A), затем среди них выбирали для анализа живые клетки, не окрашенные йодидом пропидия. Для каждого образца собирали не менее  $10^4$  событий.

#### Изучение скорости интернализации DARPin-miniSOG и 4D5scFv-miniSOG

Для оценки скорости рецептор-опосредованной интернализации использовали клетки SK-BR-3, окрашенные DARPin-miniSOG и 4D5scFv-miniSOG. Флуоресценцию образцов измеряли с помощью проточного цитометра BD Accuri C6 (Becton Dickinson, США) как описано выше. Выделяли две группы образцов: первую группу после окрашивания инкубировали при температуре 4°C (условия, при которых отсутствует рецептор-опосредованная интернализация), вторую – при 37°C. Показания снимали в нескольких временных точках: 5, 10, 30 и 60 мин. Для каждого образца собирали не менее  $10^4$  событий.

#### Изучение механизма угасания фототоксинов на основе miniSOG в эндосоме

Влияние pH и воздействия протеаз на DARPin-miniSOG, 4D5scFv-miniSOG и FMN оценивали, измеряя интенсивность флуоресценции, возбуждаемой светом с длиной волны 488 нм и детектируемой при 535 нм, на планшетном спектрофотометре Infinite M1000 (Tecan, Швейцария). Белки в концен-

трации 35 мкМ инкубировали при температуре 37°C в буфере (100 мМ Трис-HCl), доведенном до нужного значения pH, а также с протеолитическими ферментами в концентрации 40 мкМ (трипсин, химотрипсин, пепсин, папаин (Sigma, США)) и восстановителями (дитиотреитол, глутатион (восстановленная форма), аскорбиновая кислота, NADH,  $\text{NaBH}_4$  (Sigma, США)) в концентрации 10 мМ. Показания снимали сразу после добавления белка и через 1 и 2 ч инкубации.

Для оценки влияния присутствия других хромофоров на интенсивность флуоресценции FMN, DARPin-miniSOG в сравнении с DARPin-FITC использовали краситель трипановый синий («ПанЭко», Россия) в концентрации 0.1% и цитохром c в концентрации 300 мкМ (Sigma, США). Интенсивность флуоресценции образцов измеряли на планшетном спектрофотометре Infinite M1000 (Tecan, Швейцария), флуоресценцию возбуждали светом с длиной волны 488 нм и детектировали в диапазоне длин волн 525–545 нм. Показания снимали сразу после добавления хромофоров.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для эффективной работы противоопухолевого агента в фотодинамической терапии важно обеспечить его селективную доставку к мишени. Так, в нашем случае для доставки цитотоксического модуля miniSOG использовали две адресные молекулы: белок неиммуноглобулиновой природы (DARPin<sub>9-29</sub>) и одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) антитела 4D5, нацеленные на поверхностный рецептор HER2. Фототоксический модуль miniSOG является флавопротеином, способным за счет связанного FMN под действием синего света генерировать активные формы кислорода. Для получения рекомбинантных белков клетки *E. coli* BL21(DE3) трансформировали соответствующими плазмидами pET22b-4D5scFv-miniSOG и pDARPin-miniSOG. Из растворимой фракции белки 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG выделяли с использованием металл-хелатной аффинной хроматографии на основе  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA с элюцией растворами имидазола. Для подтверждения активности полученных белковых фотосенсибилизаторов методом проточной цитофлуориметрии оценивали специфичность связывания гибридных белков 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG с рецептором HER2/neu на поверхности клеток аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, сверхэкспрессирующей HER2/neu. Это позволило проверить как селективность связывания адресного модуля DARPin с рецептором, так и функциональность флавопротеина, поскольку токсический модуль miniSOG обладает собственными флуоресцентными свойствами, и его связывание с клетками можно детектировать напрямую [11].

Флуоресценция клеток после окрашивания различными белками. Приведены средние значения трех экспериментов  $\pm$  ошибка среднего

Образец	Интенсивность флуоресценции в канале FL1	
	Клетки SK-BR-3	Клетки CHO
Неокрашенные клетки	3700 $\pm$ 400	3700 $\pm$ 900
+ $\beta$ -LG-FITC	5700 $\pm$ 600	3300 $\pm$ 400
+ 4D5scFv-FITC	$2.7 \times 10^4 \pm 7 \times 10^3$	3200 $\pm$ 500
+ 4D5scFv-miniSOG	$2.3 \times 10^4 \pm 3 \times 10^3$	4600 $\pm$ 400
+ DARPIn-miniSOG	$1.71 \times 10^4 \pm 1.6 \times 10^3$	3000 $\pm$ 400

Наличие на поверхности клеток рецептора HER2/neu было подтверждено их окрашиванием 4D5scFv, конъюгированным с флуоресцеинизотиоцианатом (4D5scFv-FITC). В качестве отрицательного контроля использовали бета-лактоглобулин, конъюгированный с FITC ( $\beta$ -LG-FITC), не связывающийся с HER2 на поверхности клеток. Показано, что HER2-отрицательные клетки CHO не дают флуоресцентного сигнала после инкубации с белками 4D5scFv-FITC,  $\beta$ -LG-FITC и целевыми белками 4D5scFv-miniSOG, DARPIn-miniSOG (таблица).

Таким образом, показано, что адресные рекомбинантные белки 4D5scFv-miniSOG и DARPIn-miniSOG высокоспецифично связываются с поверхностным рецептором HER2/neu на поверхности клеток SK-BR-3 аденокарциномы молочной железы человека.

Обнаружено, что после связывания белков DARPIn-miniSOG и 4D5scFv-miniSOG с рецептором на поверхности клеток SK-BR-3 при температуре +4°C рецептор-опосредованной интернализации белков не происходит. Однако при +37°C комплекс рецептор-белок подвергается интернализации, о чем свидетельствует снижение интенсивности флуоресценции  $\Delta$ MFI (разность между средними значениями флуоресценции окрашенных и неокрашенных клеток) (рис. 1). При этом рекомбинантный белок DARPIn-miniSOG интернализуется в комплексе с рецептором быстрее, чем 4D5scFv-miniSOG, так как  $\Delta$ MFI для DARPIn-miniSOG снижается вдвое по сравнению с начальной точкой в течение первых 10 мин, в то время как для 4D5scFv-miniSOG это занимает 40 мин. Полученные данные согласуются с опубликованными: 4D5scFv-miniSOG проявляет более высокую цитотоксичность по сравнению с DARPIn-miniSOG [5, 6], так как дольше локализован на мембране. Поскольку преимущественным механизмом гибели клеток, облученных в присутствии данных фототоксинов, является некроз, по-

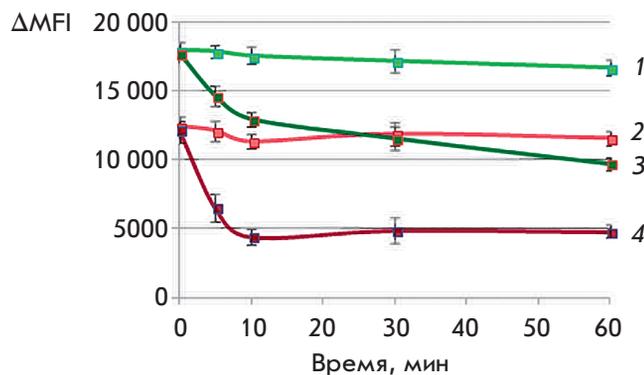


Рис. 1. Изменение интенсивности флуоресценции фототоксичных белков в условиях интернализации в комплексе с HER2 (+37°C) и в условиях, препятствующих интернализации (+4°C). 1 — 4D5scFv-miniSOG, +4°C; 2 — DARPIn-miniSOG, +4°C; 3 — 4D5scFv-miniSOG, +37°C; 4 — DARPIn-miniSOG, +37°C.  $\Delta$ MFI — разница в интенсивности флуоресценции между окрашенными клетками и неокрашенным образцом, инкубированным в тех же условиях

вреждение мембраны вносит решающий вклад в токсичность адресных белков. Однако падение интенсивности флуоресценции miniSOG может свидетельствовать о реакциях с участием хромофора, что также должно повлиять на его эффективность в качестве фототоксина.

Для того чтобы выяснить причины падения интенсивности флуоресценции и токсичности белков на основе miniSOG при их интернализации, мы оценили воздействие разных факторов на флуоресцентные свойства miniSOG. Было выдвинуто предположение, что угасание флуоресценции DARPIn-miniSOG в процессе интернализации может быть связано с изменением pH среды при попадании комплекса рецептор-белок в эндосомы и лизосомы. На рис. 2 показана зависимость интенсивности флуоресценции белков DARPIn-miniSOG и 4D5scFv-miniSOG и флавинового кофактора (FMN) от pH раствора при температуре +37°C. Достоверное и значительное снижение флуоресцентного сигнала (более чем в 2 раза) наблюдалось при pH 3 и менее существенное при pH 4. В то же время известно [12], что в эндосомах и лизосомах минимальное значение pH составляет 4,8, поэтому тушение флуоресценции miniSOG при его интернализации не может объясняться реакцией на закисление среды эндосом. Кроме того, изменение температуры в диапазоне от +4°C до +37°C не является причиной падения интенсивности флуоресценции FMN и DARPIn-miniSOG.

Для проверки гипотезы о возможном влиянии протеолиза в эндосоме на интенсивность флуоресценции DARPin-miniSOG и 4D5scFv-miniSOG были созданы искусственные условия протеолиза такими ферментами, как трипсин, папаин, химотрипсин, подобный эндосомному катепсину G [13], и пепсин, соответствующий по активности катепсинам D и E лизосом [14], при оптимальных для них значениях pH. FMN использовали в качестве контроля. Значительное падение интенсивности сигнала флуоресценции FMN, DARPin-miniSOG и 4D5scFv-miniSOG наблюдалось только при обработке целевых белков пепсином (рис. 3). Однако, основываясь на приведенных выше данных (рис. 2), можно сделать вывод о том, что причиной тушения флуоресценции является низкое значение pH. Эта гипотеза подтверждается и тем, что падение флуоресценции произошло и в реакционной смеси, содержащей вместо белковых фототоксинов FMN, не чувствительный к протеолизу. При этом обработка другими протеазами не привела к снижению флуоресцентного сигнала в 2 или более раз, что наблюдалось при интернализации (рис. 1). Расщепление DARPin-miniSOG и 4D5scFv-miniSOG в экспериментальных условиях подтверждено при помощи электрофореза в 15% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях по методу Лэммли: через 1 ч инкубации наблюдалось полное расщепление белковых фототоксинов.

Еще одной причиной падения интенсивности флуоресценции miniSOG при рецептор-опосредованной интернализации могло быть восстановление кофактора (флаavinмоноклеотида) реакционно-способными молекулами клетки. Известно, что интенсивность флуоресценции FMN падает при его восстановлении [15], и, если при наработке miniSOG в бактериях в белок включается заметная доля окисленной формы кофактора или он легко окисляется при хранении, то восстановление может объяснять угасание флуорофора в клетке. Изучено воздействие на DARPin-miniSOG и 4D5scFv-miniSOG следующих восстановителей: дитиотреитола, глутатиона (восстановленная форма, GSH), аскорбиновой кислоты, NADH, борогидрида натрия ( $\text{NaBH}_4$ ) (рис. 4А,Б) и FMN в отсутствие белковой составляющей (рис. 4В). Установлено, что свободный FMN может быть восстановлен  $\text{NaBH}_4$  и аскорбиновой кислотой, вследствие чего происходит падение флуоресцентного сигнала примерно в 2 раза. В то же время восстановление кофактора флаavinмоноклеотида в составе DARPin-miniSOG происходит только при повышенных концентрациях  $\text{NaBH}_4$  (от 10 мМ). Поскольку физиологически более релевантные восстановители не показали такого эффекта, был сделан вывод о том, что восстановление кофактора не игра-

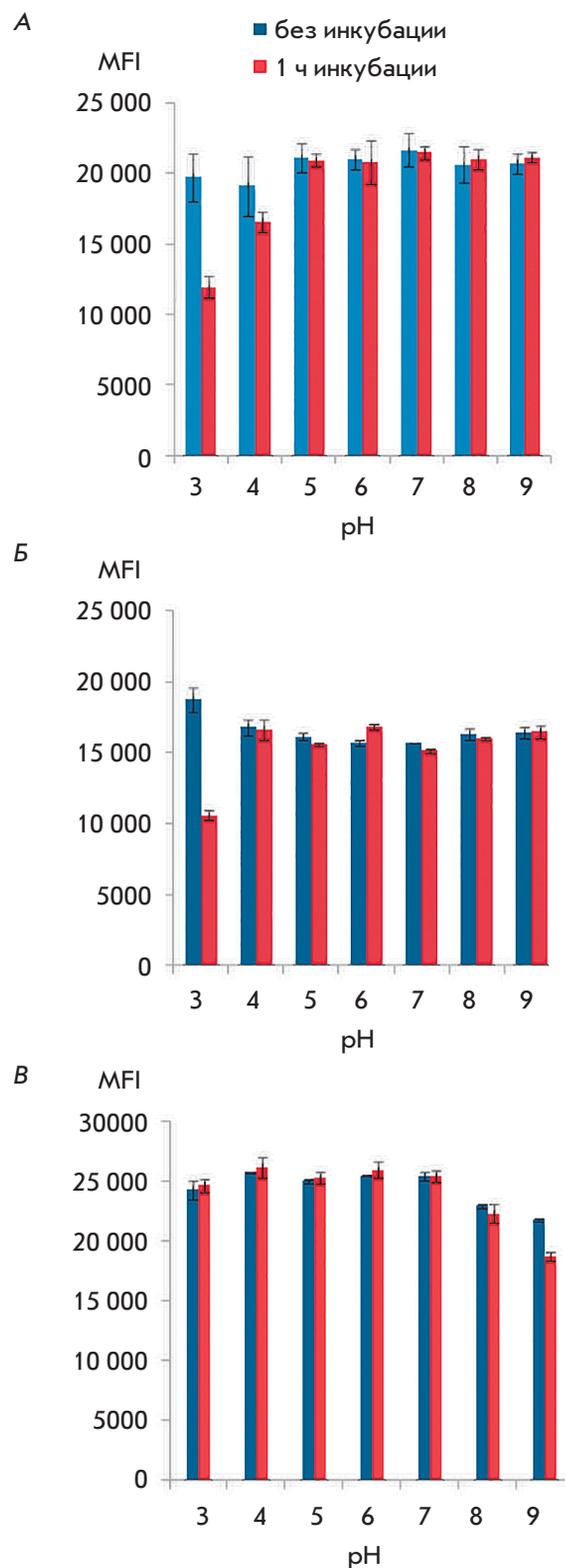


Рис. 2. Зависимость интенсивности флуоресценции 4D5scFv-miniSOG (А), DARPin-miniSOG (Б) и FMN (В) от pH среды при 37°C в течение 1 ч. Здесь и на рис. 3–5 MFI – интенсивность флуоресценции;  $M \pm m$ ,  $n = 3$

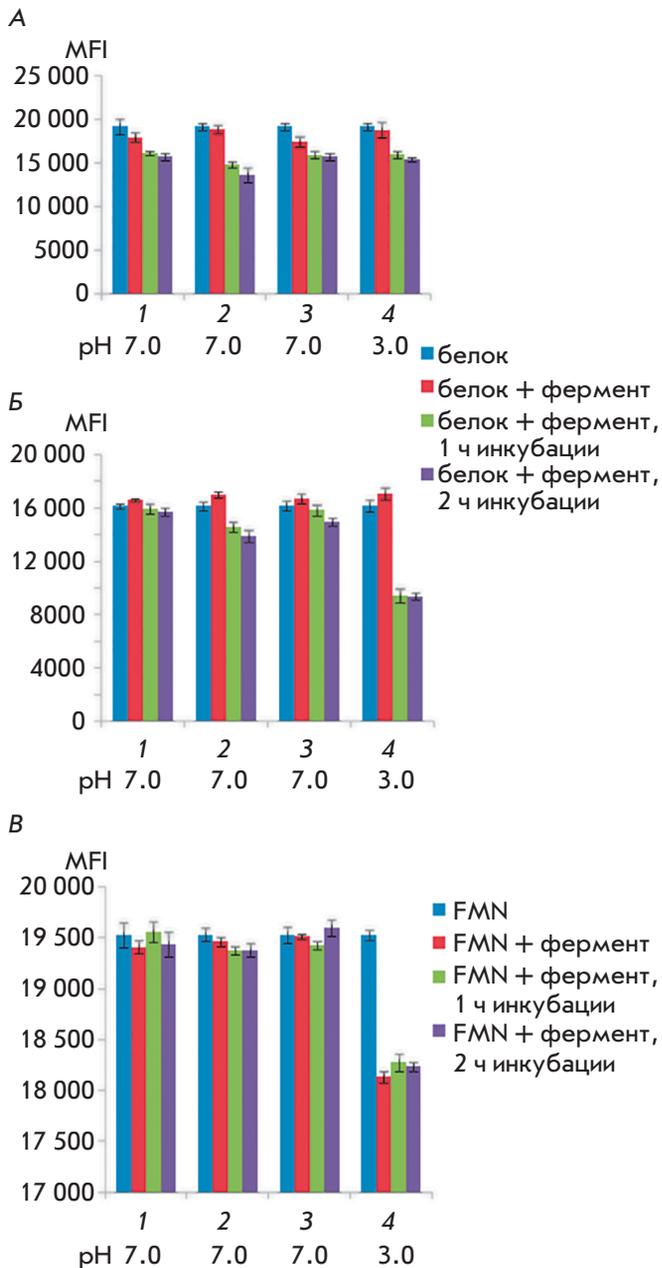


Рис. 3. Зависимость интенсивности флуоресценции 4D5scFv-miniSOG (А), DARPin-miniSOG (Б) и FMN (В) от обработки специфическими протеазами при 37°С в течение 1 ч. 1 – трипсин; 2 – химотрипсин; 3 – папаин; 4 – пепсин

ет значимой роли в изменении интенсивности флуоресценции miniSOG в клетке. Кроме того, оценено воздействие внутриклеточных восстановителей на интенсивность флуоресцентного сигнала DARPin-miniSOG и 4D5scFv-miniSOG после обработки протеазами при оптимальных для данных ферментов значениях pH, что также не повлияло на флуоресцентные свойства белков на основе miniSOG.

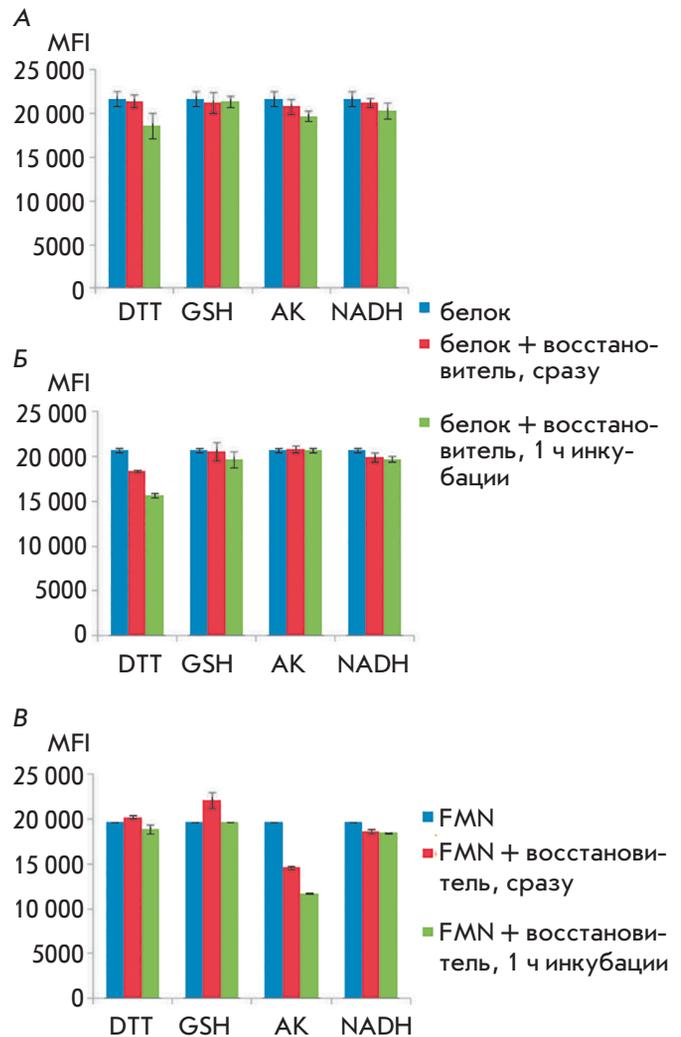


Рис. 4. Зависимость интенсивности флуоресценции 4D5scFv-miniSOG (А), DARPin-miniSOG (Б) и FMN (В) от воздействия внутриклеточных восстановителей при 37°С в течение 1 ч. DTT – дитиотреитол; АК – аскорбиновая кислота

В качестве еще одной гипотезы, объясняющей снижение интенсивности флуоресценции miniSOG в клетке, рассматривали экранирование молекулы белка и поглощение ее флуоресценции хромофорами клетки. В качестве модельной молекулы, способной поглощать флуоресценцию miniSOG *in vitro*, был протестирован краситель трипановый синий, который способствовал полному гашению флуоресцентного сигнала как DARPin-miniSOG, так и 4D5scFv-miniSOG. Нативными перехватчиками излучения miniSOG внутри клетки могут быть гемопротейны, такие, как цитохром с. Показано, что при возбуждении флуоресценции в присутствии

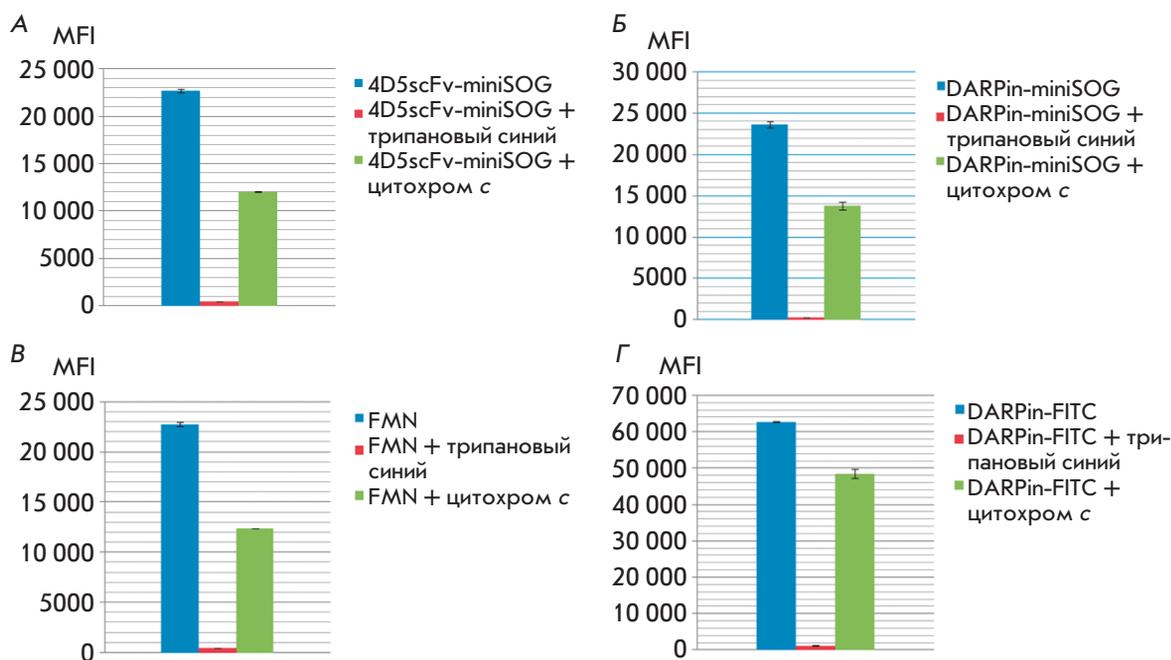


Рис. 5. Влияние разных хромофоров на интенсивность флуоресценции 4D5scFv-miniSOG (А), DARPin-miniSOG (Б), FMN (В) и DARPin-FITC (Г)

цитохрома как в случае FMN, так и в случае целевых белков происходит падение флуоресцентного сигнала в 2 раза, при этом DARPin, конъюгированный с FITC, стандартным флуоресцентным красителем, не показал такого результата (рис. 5).

Стоит отметить, что флуоресценция FITC изменяется также в эндосомах и лизосомах в зависимости от значений pH среды. В настоящее время краситель используется в качестве сенсора для измерения pH эндосом клеток [9, 10]. Цитотоксический модуль miniSOG, как и FITC, может использоваться для детекции интернализации HER2, но при этом причины падения флуоресцентных сигналов разные.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основной причиной снижения интенсивности флуоресценции фототоксинов на основе miniSOG являются их экранирование и поглощение флуоресценции miniSOG флуорофорами клетки. Устойчивость miniSOG внутри клетки делает его перспективным компонентом для создания тераностических агентов, так как спектральные свойства данного фототоксина позволяют использовать его в паре с люциферазой NanoLuc, которая решает проблему экранирова-

ния miniSOG [16]. Нами обнаружено, что цитотоксический модуль miniSOG в составе рекомбинантных белков 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG, как и FITC, может использоваться для детекции интернализации HER2, но при этом причины падения флуоресцентных сигналов разные.

Понимание механизма тушения флуоресценции фотосенсибилизатора позволяет адекватно интерпретировать данные по динамике интернализации тераностических агентов в комплексе с рецептором HER2. Это важно для рационального дизайна фототоксических агентов направленного действия, поскольку установлено [17], что их эффективность зависит от локализации и накопления в раковых клетках. ●

*Работа поддержана грантами РФФИ КОМФИ № 17-00-00121 (получение адресных рекомбинантных белков), РФФИ № 14-24-00106 (исследования на опухолевых клетках).*

*Работа выполнена с использованием ЦКП ИБХ, поддержанного Минобрнауки России, идентификатор соглашения RFMEFI62117X0018.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kuimova M.K., Bhatti M., Deonarain M., Yahioglu G., Levitt J.A., Stamati I., Suhling K., Phillips D. // Photochem. Photobiol. Sci. 2007. V. 6. № 9. P. 933–939.
2. Wu D., Yotnda P. // J. Vis. Exp. 2011. № 57. P. 3357.
3. Green D.R., Llambi F. // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2015. V. 7. № 12. P. a006080.

4. Shilova O.N., Proshkina G.M., Lebedenko E.N., Deyev S.M. // Acta Naturae. 2015. V. 7. № 3. P. 126–132.
5. Mironova K.E., Proshkina G.M., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Lukyanov S.A., Petrov R.V., Deyev S.M. // Theranostics. 2013. V. 3. № 11. P. 831–840.
6. Proshkina G.M., Shilova O.N., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Deyev S.M. // Biochimie. 2015. V. 118. P. 116–122.

7. Shu X., Lev-Ram V., Deerinck T.J., Qi Y., Ramko E.B., Davidson M.W., Jin Y., Ellisman M.H., Tsien R.Y. // *PLoS Biol.* 2011. V. 9. № 4. P. 1–10.
8. Shilova O.N., Proshkina G.M., Ryabova A.V., Deyev S.M., Petrov R.V. // *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2017. V. 475. № 1. P. 256–258.
9. Brabec M., Schober D., Wagner E., Bayer N., Murphy R.F., Blaas D., Fuchs R. // *J. Virology.* 2005. V. 79. № 2. P. 1008–1016.
10. Jin T., Sasaki A., Kinjo M., Miyazaki J. // *Chem. Commun.* 2011. V. 46. № 14. P. 2408–2410.
11. Shilova O.N., Shilov E.S., Deyev S.M. // *Cytometry. Part A.* 2017. V. 91. № 9. P. 917–925.
12. Geisow M.J., Evans W.H. // *Exp. Cell Res.* 1984. V. 150. № 1. P. 36–46.
13. Thomas M.P., Whangbo J., McCrossan G., Deutsch A.J., Martinod K., Walch M., Lieberman J. // *J. Immunol.* 2014. V. 192. № 11. P. 5390–5397.
14. Stoka V., Turk V., Turk B. // *Ageing Res. Rev.* 2016. V. 32. P. 22–37.
15. Benson R.C., Meyer R.A., Zaruba M.E., McKhann G.M. // *J. Histochem. Cytochem.* 1979. V. 27. № 1. P. 44–48.
16. Shramova E.I., Proshkina G.M., Chumakov S.P., Khodarovich Y.M., Deyev S.M. // *Acta Naturae.* 2016. V. 8. № 4. P. 118–123.
17. Shramova E.I., Proshkina G.M., Deyev S.M., Petrov R.V. // *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2017. V. 474. № 1. P. 228–230.