

УДК 577.345+57.037+57.013+57.014

## НОВЫЕ FRET-ПАРЫ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ КАСПАЗ *IN VITRO*

© 2022 г. Н. К. Марынич<sup>1</sup>, И. Э. Грановский<sup>1, 2</sup>, А. П. Савицкий<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”  
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

<sup>2</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН,  
Пушино, Московской области, 142290 Россия

\*e-mail: [apsavitsky@inbi.ras.ru](mailto:apsavitsky@inbi.ras.ru)

Поступила в редакцию 29.04.2022 г.

После доработки 20.06.2022 г.

Принята к публикации 04.07.2022 г.

Получен мономерный сенсор на эффекторную каспазу-3 TagRFP-23-Ultramarine (TR-23-U). Рассчитаны интегралы перекрытия новых пар красного флуоресцентного белка TagRFP с четырьмя хромобелками. Методами гель-фильтрации и динамического рассеяния света подтверждено мономерное состояние белка Ultramarine и сенсора TR-23-U. Инкубация с каспазой-3 показала возможность применения нового белка слияния в качестве FRET-сенсора для детекции апоптоза.

**Ключевые слова:** флуоресцентные белки, хромобелки, FRET-сенсоры, апоптоз, каспаза-3

**DOI:** 10.31857/S0555109922060083

Детекция процессов, происходящих в организме и отдельной клетке играет ключевую роль в создании лекарств и терапии различных заболеваний [1]. Целью многих лекарственных препаратов является инициация апоптоза. Каспаза-3 хорошо известна своей ролью в осуществлении специфического расщепления многих клеточных белков при запрограммированной гибели клеток, а также в регуляции клеточного гомеостаза [2, 3]. Явление ферстеровского резонансного переноса энергии внутри пары флуоресцентных белков широко применяется в FRET-сенсорах для определения активности каспазы-3, благодаря возможности их непосредственной экспрессии в живой клетке [4, 5].

Ферстеровский резонансный перенос энергии (Förster resonance energy transfer, FRET) – это процесс взаимодействия двух хромофоров, при котором происходит безызлучательный перенос энергии возбужденного состояния от донора к акцептору. При таком переносе происходит снижение интенсивности и уменьшение времени жизни флуоресценции донора. В случае флуоресцирующего акцептора при FRET одновременно происходит возбуждение флуоресценции акцептора. Наиболее важные параметры, определяющие эффективность резонансного переноса это:

- 1) степень перекрытия спектров эмиссии флуоресценции донора и поглощения акцептора;
- 2) расстояние между хромофорами во FRET-паре, поскольку эффективность переноса энер-

гии обратно пропорциональна расстоянию в шестой степени [6].

Использование сенсоров, в которых в качестве донора выступает красный флуоресцентный белок позволяет работать в области спектра с наименьшим поглощением и автофлуоресценцией тканей животных [7]. Использование в качестве акцептора не флуоресцирующих хромобелков исключает необходимость спектрального разделения флуоресценции донора и акцептора, что облегчает детекцию изменения FRET [8, 9]. Использование таких сенсоров позволит детектировать активность каспазы 3 не только спектрофотометрически, но и на основании изменения времени жизни флуоресценции донора. Обнаружение протеолиза является одним из самых важных применений FRET-сенсоров, поскольку роль различных ферментов в молекулярной онкологии при прогрессировании опухоли находится в стадии тщательного изучения. Практическим применением таких сенсоров является скрининг новых противоопухолевых препаратов, направленных на активацию апоптоза.

Цель работы – проанализировать эффективность переноса энергии в новых FRET-парах красного флуоресцентного белка TagRFP с хромобелками путем расчета интегралов перекрытия, получить мономерный сенсор TagRFP-23-хромобелок и показать возможность применения

нового белка слияния в качестве FRET-сенсора для детекции апоптоза.

### МЕТОДИКА

**Молекулярное клонирование.** Последовательности ДНК хромобелков (gfasCP [10], spisCP [10], anm2CP [11], Ultramarine [12]) были синтезированы компанией “Synbio Technologies” (Китай) и клонированы в вектор pET29a (NdeI/Sall) (плазмида любезно предоставлена И.Э. Грановским, Пушкинский научный центр биологических исследований РАН). Конструкция pTR23U-22b была получена на основе конструкции pTR23K, созданной в работе [13] (на основе вектора pET-22b, плазмида любезно предоставлена И. Э. Грановским): ген акцепторного хромобелка KFP [14] замещен на ген акцепторного белка Ultramarine [12] NcoI/Sall.

**Экспрессия в *Escherichia coli*, выделение и очистка белков из клеточного лизата.** Экспрессию хромобелков и биосенсора проводили в клетках *E. coli* BL21(DE3). Штамм впервые получен в работе [15] и был любезно предоставлен Ивашиной Т.В. (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН). По окончании экспрессии клетки осаждали центрифугированием при 5000 g на центрифуге (Optima XPN-100 Ultracentrifuge, “Beckman Coulter”, Германия), разрушали с помощью ультразвука и отеляли лизат с целевым белком центрифугированием при 15000 g (Optima XPN-100 Ultracentrifuge, “Beckman Coulter”, Германия). Очистку хромобелков и биосенсора проводили хроматографическими методами, как описано для флуоресцентного белка SAASoti [16]. Для нового биосенсора подобраны время и температура инкубации клеток *E. coli* после добавления индуктора транскрипции изопропил-β-тиогаалактозида (ИПТГ): 20 ч при 20°C и 4 ч при 37°C.

**Определение олигомерного состояния.** Определение олигомерного состояния проводили методом гель-фильтрации на носителе Superdex 200 100/20 GL, (“GE Healthcare”, Германия), как описано ранее [17] с использованием метода динамического рассеяния света (ДРС) на анализаторе молекулярной массы и размера частиц 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).

**Измерение спектральных характеристик.** Спектры поглощения хромобелков и биосенсора регистрировали на спектрофотометре Cary 60 (“Agilent”, США) при постоянной температуре 22°C в кварцевой кювете 3 мм (“Hellma”, Германия) в буфере 20 mM Tris-HCl с 150 mM NaCl, pH 7.4.

Спектры испускания флуоресценции регистрировали на флуоресцентном спектрофотометре Cary Eclipse (“Varian”, США) при комнатной тем-

пературе в кварцевой кювете диаметром 3 мм (“Hellma”) в 20 mM Tris-HCl буфере с 150 mM NaCl, pH 7.4.

**Определение эффективности гидролиза белка слияния TR-23-U каспазой-3.** Гидролиз сенсора TR-23-U ферментом каспазой-3 PorcCasp3 WT (любезно предоставлен И.Э. Грановским) в 20 mM HEPES буфере, pH 7.4, с 2 mM ЭДТА, 0.1%-ным CHAPS, 5 mM ДТТ, 1 мг/мл БСА при 37°C в течение ночи.

**Регистрация времени жизни флуоресценции.** Время жизни флуоресценции TagRFP регистрировали с помощью флуоресцентного спектрометра Fluotime 200 (“PicoQuant”, Германия) и анализировали с помощью программного обеспечения Fluofit 4.2 (“PicoQuant”, Германия).

**Определение кинетик фотоактивации флуоресценции.** Фотоактивацию флуоресценции регистрировали для растворов белков с оптической плотностью 0.1 в максимуме поглощения в буфере 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) с 150 mM NaCl с помощью установки, собранной из спектрометра Spectra-Cluster (Россия) и источника света Spectra X LED (“Lumencor”, США) в термостатируемой (25°C) микрокювете (“Hellma”, Германия), оптический путь 3 × 3 мм. Возбуждение флуоресценции проводилось на длине волны 550 ± 15 нм мощностью 0.5 мВт/см<sup>2</sup>. Интенсивность флуоресценции регистрировалась для KFP при длине волны 600 нм [14], для Ultramarine – при 626 нм [12], anm2CP – при 597 нм [11], gfasCP и spisCP максимум флуоресценции не определен [10] и в эксперименте их флуоресценция полностью отсутствовала на длинах волн от 580 до 630 нм.

**Расчет интегралов перекрытия и ферстеровских радиусов.** Интегралы перекрытия были рассчитаны с использованием программного обеспечения aJe – UV-Vis-IR Spectral Software 2.2 (FluorTools, www.fluortools.com) согласно формуле (1).

$$J(\lambda) \equiv \int_0^{\infty} \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 F_D(\lambda) d\lambda. \quad (1)$$

Ферстеровские радиусы вычислялись по формуле (2):

$$R_0 = 0.211 \left[ \frac{\kappa^2 \Phi_D J(\lambda)}{n^4} \right]^{1/6}, \quad (2)$$

где  $\kappa^2$  – коэффициент, описывающий взаимную ориентацию дипольных моментов переходов донора и акцептора, и равный 2/3 для свободно вращающихся диполей;  $\Phi_D$  – квантовый выход флуоресценции донора в отсутствие акцептора ( $\Phi_D$  (TagRFP) = 0.48);  $J(\lambda)$  – интеграл перекрытия нормированных спектров флуоресценции донора

**Таблица 1.** Спектральные и физико-химические характеристики хромобелков согласно литературным источникам

Хромобелок	Олигомерное состояние*	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	$\epsilon, M^{-1} cm^{-1}$
Ultramarine	Мономер	586/626 (QY = 0.001)	64000
gfasCP	Тетрамер	580/н.о.	205000
anm2CP	Мономер	566/н.о.	120000
spisCP	Тетрамер	564/н.о.	61000

**Таблица 2.** Теоретические значения интегралов перекрытия  $J(\lambda)$  и ферстеровских радиусов  $R_0$  для пар TagRFP-хромобелок

Параметр	FRET-пара			
	TagRFP-Ultramarine	TagRFP-gfasCP	TagRFP-anm2CP	TagRFP-spisCP
$J(\lambda), nm^4/M cm$	$4.511 \times 10^{15}$	$1.208 \times 10^{16}$	$6.233 \times 10^{15}$	$2.537 \times 10^{15}$
$R_0, \text{Å}$	59	69	62	53

и поглощения акцептора;  $n$  – показатель преломления растворителя (для воды он равен 1.33).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

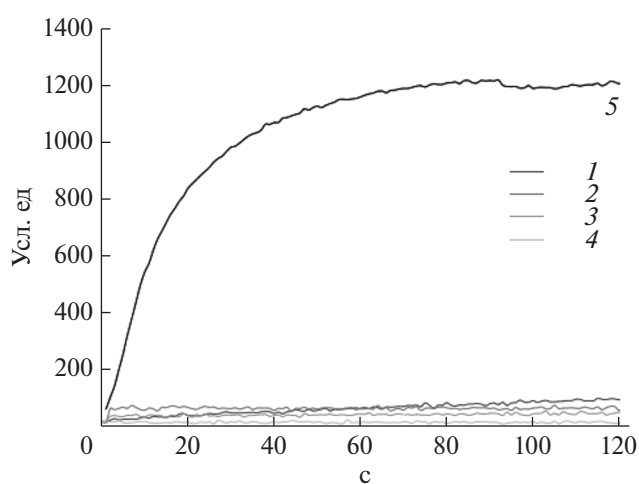
Для создания пары “красный флуоресцентный белок–хромобелок” необходимо выбрать пару с максимальным перекрытием спектров эмиссии флуоресценции донора и поглощения акцептора. В качестве донора был выбран яркий красный флуоресцентный белок TagRFP [18] (молекулярная яркость – 48000), который уже успешно применялся в качестве донора во FRET-сенсорах [13, 19]. На роль нового нефлуоресцирующего акцептора были отобраны несколько хромобелков с высокими значениями коэффициентов молярного поглощения: Ultramarine [12], anm2CP [11], gfasCP [10], spisCP [10], спектральные и физико-химические характеристики которых приведены в табл. 1.

Для выбранных хромобелков были рассчитаны значения интегралов перекрытия  $J(\lambda)$  их спектров поглощения со спектром эмиссии флуоресценции красного белка TagRFP, количественно демонстрирующие потенциальную эффективность переноса энергии в этих парах. Также для полученных пар рассчитаны ферстеровские радиусы ( $R_0$ ), показывающие расстояние, на котором эффективность переноса энергии будет составлять 50% (табл. 2).

Все 4 FRET-пары имели высокие значения интегралов перекрытия и ферстеровских радиусов, что делает их перспективными кандидатами для создания FRET-сенсоров. Также экспериментально показано, что выбранные хромобелки не флуоресцируют при возбуждении мощными световыми потоками на длине волны 530 нм, в отличие от ранее применявшегося во FRET-сенсоре с TagRFP белка KFP (рис. 1) [14]. Таким образом,

еще одним преимуществом новых FRET-пар является отсутствие фоновой флуоресценции акцептора.

Все 4 хромобелка были экспрессированы в клетках *E. coli*, очищены, и их олигомерное состояние охарактеризовано методами гель-фильтрации (ГФ) и динамического рассеяния света (ДРС). 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 (табл. 3). При очистке хромобелков хроматографическими методами было замечено, что их связывание с носителями отличалось



**Рис. 1.** Кинетические кривые фотоактивации флуоресценции (усл. ед.) хромобелков при облучении их светом с длиной волны 530 нм (мощность  $0.5 \text{ Вт/см}^2$ ): 1 – Ultramarine, 2 – anm2CP, 3 – gfasCP, 4 – spisCP, 5 – KFP.

**Таблица 3.** Результаты характеристики олигомерного состояния хромобелков методами ГФ на носителе Superdex 200 и ДРС

Белок	$V_{эл}$ , мл	Мм (ГФ), кДа	$R$ , нм	Мм (ДРС), кДа
Ultramarine	17.35	11	2.2	20
gfasCP	15.04	42	3.4	58
spisCP	15.40	34	3.1	47
anm2CP	15.04	42	4.0	89
	12.94	144		

от других GFP-подобных белков: с гидрофобным носителем связывание слабее, в то время как с анионообменным сильнее. Поскольку при гель-фильтрации могут быть слабые ионные и гидрофобные взаимодействия, то при определении молекулярной массы такие данные представляются менее достоверными, чем результаты, полученные методом ДРС. Однако данные ДРС в достаточной степени согласовывались с результатами гель-фильтрации, указывая на одинаковое олигомерное состояние выделенных хромобелков. Отличие полученных результатов от литературных данных может быть связано с различием методов, использованных для определения олигомерного состояния и концентраций белковых растворов. Для gfasCP и spisCP в работе [10] олигомерность была определена методом электрофореза в полунативных условиях [20]. Для anm2CP использовалась гель-фильтрация, однако, отличался носитель.

В первую очередь, был получен FRET-сенсор на основе мономерных белков TagRFP-23-Ultramarine (TR-23-U), в котором 23 обозначает гибкий линкер из 23 аминокислот, содержащий сайт распознавания каспазы-3 DEVD [13].

Подобраны условия оптимальной экспрессии и созревания (фолдинга и формирования хромофора) обоих белков в сенсоре. После добавления индуктора ИПТГ клетки *E. coli*, экспрессирующие сенсор, инкубировали в среде LB при 20°C в течение 20 ч для созревания TagRFP, а затем при 37°C в течение 4 ч для созревания Ultramarine. Сенсор был выделен и очищен последовательно проведенными гидрофобной и анионообменной хроматографиями, как описано ранее [16]. На этапе гидрофобной хроматографии было отмечено разделение образца на две фракции (рис. 2а), при элюировании которых обнаружено, что в первой фракции отсутствовало поглощение, соответствующее белку Ultramarine (586 нм). На спектрах поглощения фракций также видно, что у фракции 1 присутствовало плечо на 586 нм, а у фракции 2 оно отсутствовало (рис. 2б). Таким образом, метод гидрофобной хроматографии позволил отделить сенсор с созревшим белком Ultramarine от его фракций с незрелым.

Методами гель-фильтрации и ДРС показано, что химерный белок ведет себя в растворе как димер (ГФ:  $V_{эл} = 15.5$  мл, Мм = 32 кДа, ДРС:  $R = 2.8 \pm 0.2$  нм, Мм =  $37 \pm 8$  кДа), следовательно оба белка в сенсоре находятся в мономерном состоянии и сам сенсор можно охарактеризовать как мономерный.

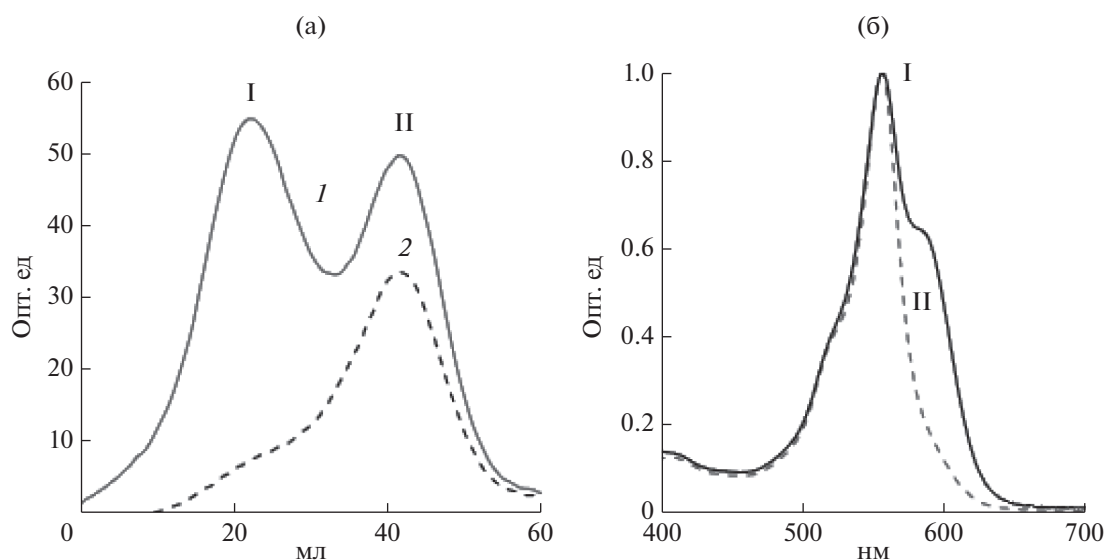
Свойства нового белка слияния в качестве FRET-сенсора были подтверждены на основании измерений времени жизни и интенсивности флуоресценции TagRFP до и после инкубации сенсора с каспазой-3 *in vitro*. Сенсор инкубировали с каспазой-3 в буфере (20 мМ HEPES, pH 7.4, 2 мМ ЭДТА, 0.1%-ный CHAPS, 5 мМ дитиотреитол; 1 мг/мл БСА) в течение ночи для измерения максимального динамического диапазона флуоресцентного ответа сенсора при 37°C. После инкубации интенсивность флуоресценции TagRFP возросла более чем в 2 раза (рис. 3), что свидетельствовало об эффективном гидролизе сенсора каспазой-3.

Для характеристики активности каспазы-3 на клетках млекопитающих более показательным параметром является время жизни флуоресценции донора, поскольку этот параметр не зависит от концентрации белка. Время жизни TagRFP в сенсоре TR-23-U описывается биэкспоненциальной зависимостью (3):

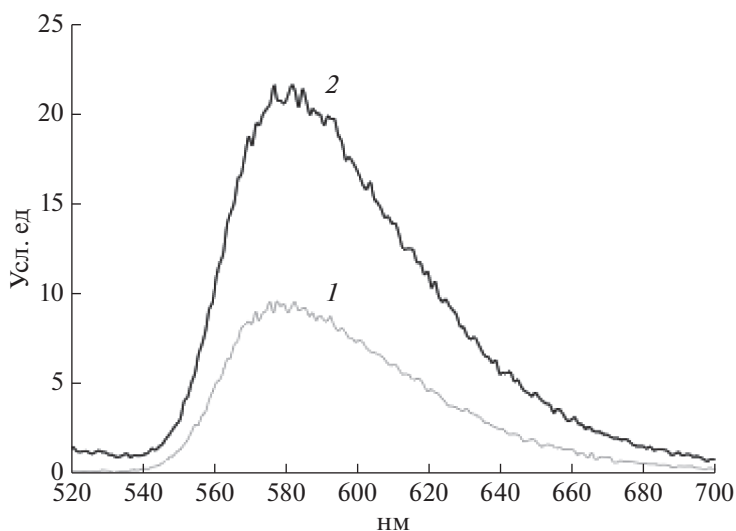
$$I = I_1 \exp(-t/\tau_1) - I_2 \exp(-t/\tau_2) + c, \quad (3)$$

где  $I_1, I_2$  – предэкспоненциальные коэффициенты, характеризующие соотношение фракций сенсора с  $\tau_1$  и  $\tau_2$ ;  $\tau_1 = 2.4$  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 [19];  $c$  – фоновый сигнал, включающий остаточную флуоресценцию.

Наличие долгоживущей компоненты для TR-23-U может свидетельствовать о наличии белковой конформации сенсора с минимальным FRET. Значения параметров, измеренные до и после инкубации с каспазой-3 представлены в табл. 4. 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 (табл. 4), а значение



**Рис. 2.** Профили элюирования сенсора TR-23-U при гидрофобной хроматографии (а): 1 – профиль элюирования при 586 нм, 2 – при длине волны 556 нм. Спектры поглощения, соответствующие собранным фракциям (б): I и II.



**Рис. 3.** Спектры эмиссии флуоресценции TagRFP (интенсивность флуоресценции, усл. ед.) в сенсоре TR-23-U до и после инкубации с каспазой-3 в течение ночи: 1 – спектр флуоресценции TagRFP до инкубации с каспазой-3, 2 – после инкубации.

$I_2$  до и после, что соответствует фракции с высоким FRET, уменьшилось в 7 раз.

Таким образом, были экспрессированы и выделены четыре хромобелка: Ultramarine, gfasCP, anm2CP, spisCP, имеющие высокие значения интегралов перекрывания и ферстеровских радиу-

сов с красным флуоресцентным белком TagRFP. Методами ГФ и ДРС показано, что Ultramarine является мономерным белком, gfasCP и spisCP – димерными, а anm2CP димерным с примесью более крупных агрегатов. На основе белков TagRFP и Ultramarine создан FRET-сенсор TagRFP-23-U1-

**Таблица 4.** Параметры времени жизни флуоресценции белка TagRFP в сенсоре TR-23-U до и после инкубации с каспазой-3

Условия	$I_1$	$\tau_1$ , нс	$I_2$	$\tau_2$ , нс	$I_1/I_2$
До инкубации	17200	2.4	30200	1.1	0.57
После инкубации	14400	2.4	4300	1.1	3.35

tramarine, содержащий в линкере сайт узнавания каспазы-3. Показано, что сенсор является мономерным. Также новый сенсор является субстратом каспазы-3. После инкубации интенсивность флуоресценции TagRFP увеличилась более чем в 2 раза, а соотношение времен жизни флуоресценции свободного и связанного TagRFP изменялось в 5.8 раз в сторону свободного TagRFP. Возрастание этих двух показателей говорит о нарушении FRET между TagRFP и Ultramarine, то есть об эффективном расщеплении сенсора каспазой-3, что позволит применить новый белок слияния TR-23-U в качестве FRET-сенсора на каспазу-3 для детекции ранних стадий апоптоза.

Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (Грант № 19-54-06008 МНТИ\_a)

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Turk B. // Nature Reviews Drug Discovery. 2006. V. 5. № 9. P. 785–799.
2. Mcintosh A., Meikle L.M., Ormsby M.J., McCormick B.A., Christie J.M., Brewer J.M., Roberts M., Wall D.M. // Infect. Immun. 2017. V. 85. P. e00393-17.
3. Suresh K., Carino K., Johnston L., Servinsky L., Machamer C.E., Todd K. et al. // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2019. V. 316. P. 1118–1126.
4. Piston D.W. // Trends in Biochemical Sciences, 2007. V. 32. № 9. P. 407–414.
5. Rajoria S., Zhao L., Intes X., Barroso M. // Curr. Mol. Imaging. Bentham Science Publishers Ltd. 2014. V. 3. № 2. P. 144–161.
6. Förster T. // Annalen der Physik. 1948. V. 6. P. 55–75.
7. Lin M.Z., McKeown M.R., Ng H., Leung A., Todd A., Shaner N.C. et al. // Chem. Biol. Cell Press, 2009. V. 16. № 11. P. 1169–1179.
8. Bastiaens P.I.H., Squire A. // Trends Cell Biol. Elsevier Current Trends, 1999. V. 9. № 2. P. 48–52.
9. Goryashchenko A.S., Khrenova M.G., Savitsky A.P. // Methods Appl. Fluoresc. 2017. V. 6. № 2. P. 022001.
10. Alieva N., Konzen K., Field S., Meleshkevitch E., Hunt M., Beltran-Ramirez V. et al. // PLoS One. 2008. V. 3. № 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002680>
11. Shagin D., Barsova E., Yanushevich Y., Fradkov A., Lukyanov K., Labas Y. et al. // Mol. Biol. Evol. 2004. V. 21. № 5. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh079>
12. Pettikiriarachchi A., Gong L., Perugini M.A., Devenish R.J., Prescott M. // PLoS One. 2012. V. 7. № 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041028>
13. Savitsky A.P., Rusanov A.L., Zherdeva V.V., Gorodnicheva T.V., Khrenova M.G., Nemukhin A.V. // Theranostics. 2012. V. 2. № 2. P. 215–226.
14. Grigorenko B., Savitsky A., Topol I., Burt S., Nemukhin A. // J. Phys. Chem. B. 2006. V. 110. P. 18635–18640.
15. Studier W.F., Moffat B.A. // J. Molecular Biology, 1986. V. 1. № 189. P. 113–130.
16. Gavshina A.V., Marynich N.K., Khrenova M.G., Solovyev I.D., Savitsky A.P. // Sci. Rep. Nature Publishing Group UK, 2021. V. 11. № 1. P. 1–11.
17. Solovyev I.D., Gavshina A.V., Katti A.S., Chizhik A.I., Vinokurov L.M., Lapshin et al. // Sci. Rep. 2018. V. 8. № 1. P. 1–14.
18. Merzlyak E., Goedhart J., Shcherbo D., Bulina M., Shcheglov A., Fradkov A. et al. // Nat. Methods. 2007. V. 4. № 7. P. 555–557.
19. Rusanov A., Ivashina T., Vinokurov L., Fiks I., Orlova A., Turchin I., Meerovich I., Zherdeva V., Savitsky A. // J. Biophotonics. 2010. V. 3. № 12. P. 774–783.
20. Baird G.S., Zacharias D.A., Tsien R.Y. // Proc. Natl. Acad. Sci. 2000. V. 97. P. 11984–11989.

## New Fret-pairs of Fluorescent Proteins for *in vitro* Caspase Activity Determination

N. K. Marynich<sup>a</sup>, I. E. Granovsky<sup>a, b</sup>, and A. P. Savitsky<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

<sup>b</sup> Scriabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, Puschino Moscow region, 142290 Russia

\*e-mail: [apsavitsky@inbi.ras.ru](mailto:apsavitsky@inbi.ras.ru)

In this work, the overlap integrals of new pairs of the red fluorescent protein TagRFP with chromoproteins were calculated. Monomeric sensor TagRFP-23-Ultramarine (TR-23-U) was obtained. Gel filtration and dynamic light scattering methods confirmed the monomeric state of the Ultramarine protein and the TR-23-U sensor. Incubation with caspase-3 showed the possibility of using a new fusion protein as a FRET sensor for apoptosis detection.

**Keywords:** fluorescent proteins, chromoproteins, FRET-sensors, apoptosis, caspase-3