



УДК 577.112.083,577.112.4,577.112.7

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ МЕТКИ В БИОЛОГИИ. ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ

© 2020 г. Н. В. Плетнева*, Е. А. Горячева*, И. В. Артемьев*, С. Ф. Архипова*, В. З. Плетнев*.[#]

*ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7

Поступила в редакцию 28.01.2020 г.

После доработки 13.02.2020 г.

Принята к публикации 18.02.2020 г.

В клеточной биологии для визуализации и изучения процессов в живых организмах, мониторинга экспрессии генов, локализации и миграции интересующих белков и клеток, определения жизненно важных внутриклеточных характеристик широко используются флуоресцентные метки различной природы. В обзоре рассмотрены пространственная организация, а также достоинства и недостатки наиболее перспективных молекулярных инструментов, получивших широкое применение в биологии.

Ключевые слова: пространственная структура, флуоресцентные метки, биомаркеры, низкомолекулярные флуорофоры, квантовые точки, GFP-подобные белки, фоторецепторы, фитохромы, флавопротеины, липокалины

DOI: 10.31857/S0132342320040223

ВВЕДЕНИЕ

Бурное развитие направлений по созданию флуоресцентных инструментов как низкомолекулярной, так и белковой природы продиктовано насущными потребностями биологии и биомедицины для изучения процессов в живых организмах. Значительный прогресс в этой области был отмечен в последнее время двумя Нобелевскими премиями по химии: 2008 г. — за открытие и использование зеленого флуоресцентного белка GFP и 2014 г. — за создание флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения. В настоящее время создание флуоресцентных меток для биологии развивается по четырем направлениям: 1) органические и неорганические низкомолекулярные флуорофоры, 2) GFP-подобные белки с хромофором, образующимся в как часть полипептидной цепи результате посттрансляционной модификации, 3) фоторецепторы (домены фитохромов и флавопротеинов), автокаталитически связывающие присутствующие в клетке природные хромофоры, 4) флуороген-активирующие белки (антитела и липокалины), образующие нековалентные специфические комплексы с органическими низкомолекулярными флуорогенами различной природы. Создание новых флуоресцентных конструкций на основе белковых платформ включает рациональный дизайн, основанный на сайт-направленном мутагенезе, и направленную эволю-

цию, основанную на оптимизации свойств методом случайного мутагенеза.

I. ОРГАНИЧЕСКИЕ И НЕОРГАНИЧЕСКИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФЛУОРОФОРЫ

Флуоресцентные органические соединения, представленные многочисленной группой малых молекул, формируют ансамбль эффективных инструментов для визуализации процессов в живых клетках и организмах. С момента первого синтеза флуоресцеина в 1871 г. органические низкомолекулярные флуорофоры успешно используются в клеточной биологии [1–4]. Индивидуальные флуорофоры нашли применение для стехиометрического маркирования практически любого белка даже в живых клетках. Другие флуорофоры обладают свойством специфического связывания с ДНК или с биологическими мембранами. В настоящее время разнообразие свойств таких флуоресцентных меток позволяет определять ионы металлов и pH среды, изучать активность ферментов и сигнальных молекул. Благодаря высокой яркости и фотостабильности метки локализуются с нанометрической точностью современными высокочувствительными методами спектроскопии — PALM (photoactivated localization microscopy), STORM (stochastic optical reconstruction microscopy) [5, 6]. Используемые в практике флуорофоры относятся к группе красителей, представленной большим набором химических структур (рис. 1) [4]. Соеди-

[#] Автор для связи: (эл. почта: vzpletnev@gmail.com).

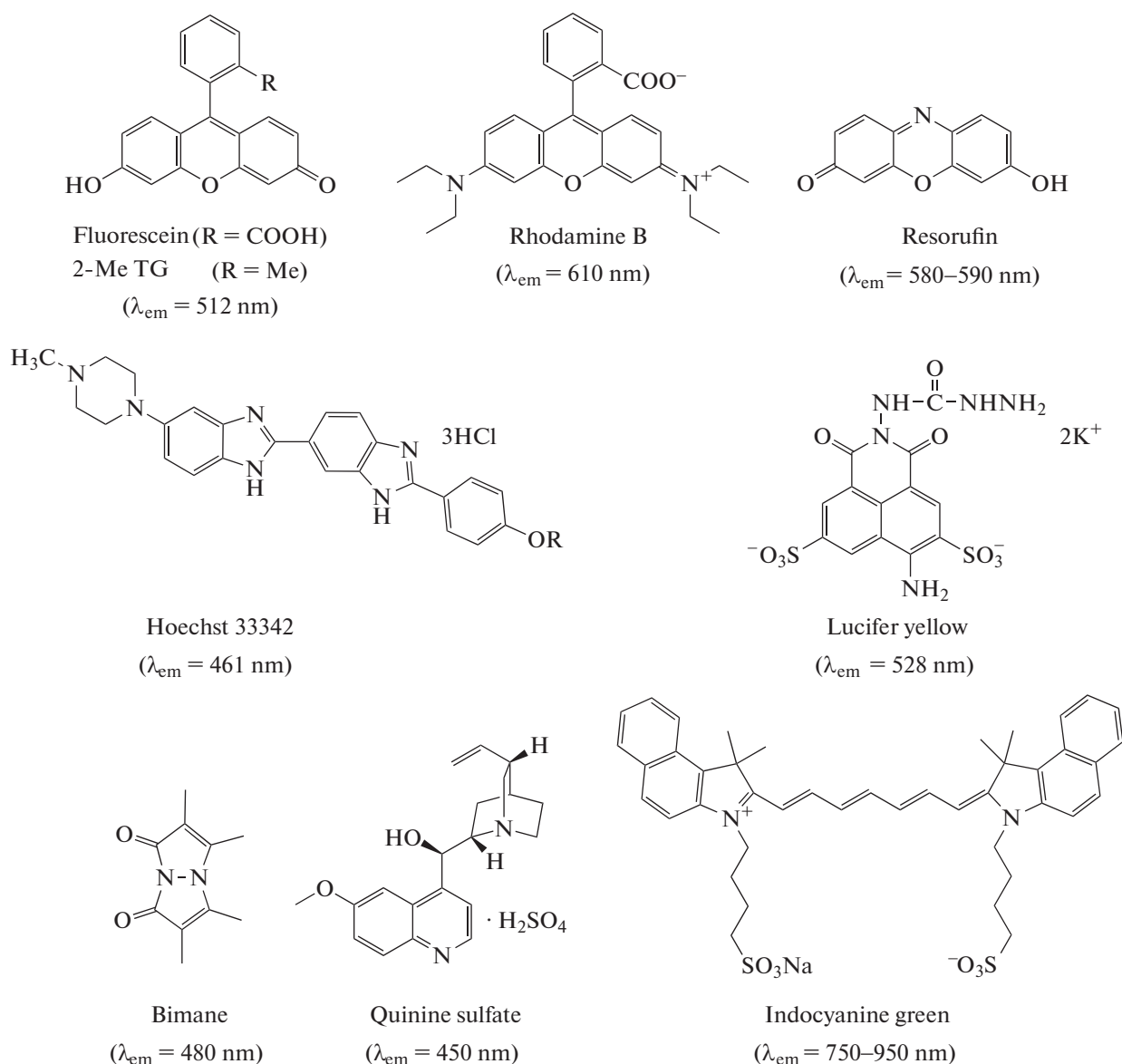


Рис. 1. Примеры химических структур синтетических органических низкомолекулярных флуорофоров [4], демонстрирующих эмиссию в голубой (с условным центром при ~460 нм), зеленой (~515), желтой (~540), красной (~610) и ближней инфракрасной (~800 нм) областях спектра.

нения характеризуются плоской структурой с сопряженной π -электронной системой.

Неорганические низкомолекулярные флуорофоры (называемые квантовыми точками) на основе металлов с полупроводниковыми свойствами дают дополнительные возможности для биологических исследований [7]. Эти метки в виде флуоресцентных солибилизованных нанокристаллов вводятся в изучаемый объект непосредственно или после присоединения к их поверхности специальных распознающих молекул (антител или олигонуклеотидов), обеспечивающих адресное связывание. Будучи внедренными в полимерные матрицы в форме коллоидных нанокристал-

лов они становятся чрезвычайно устойчивыми. Квантовые точки обладают уникальными оптическими характеристиками – высокой фотостабильностью, яркой флуоресценцией (до 10 цветов в видимом диапазоне) с узким симметричным пиком (в отличие от органических красителей, имеющих длинноволновый “хвост”) и широкой полосой возбуждения, которая позволяет возбуждать нанокристаллы разных цветов одним источником излучения. Эти свойства, а также высокая фотостабильность нанокристаллов, делают их идеальными флуорофорами для многоцветного спектрального мечения биологических объектов. Уникальные свойства нанокристаллов позволяют

использовать их практически во всех системах мечения и визуализации биологических объектов (за исключением в качестве экспрессируемых генетически внутриклеточных меток, к которым относятся широко известные флуоресцентные белки). На основе неорганических флуорофоров конструируют элементы электронных и оптоэлектронных устройств, сенсоры для анализов вещества в микрообъемах, различные флуоресцентные, хемилюминесцентные и фотоэлектрохимические датчики.

II. GFP-ПОДОБНЫЕ БЕЛКИ

Наиболее широкое применение в качестве генетически кодируемых меток нашли GFP-подобные флуоресцентные белки (ФБ) из морских организмов [8]. Природные ФБ (~27 кДа) и их синие, зеленые, желтые, красные и дальнекрасные генно-инженерные варианты показывают экстраординарную способность спонтанно генерировать флуоресценцию. Спектральное разнообразие ФБ сделало возможным многоцветное мечение биологических тканей. Благодаря свойству флуоресценции GFP-подобные белки широко используются в клеточной биологии, биотехнологии и биомедицине в качестве биомаркеров для визуализации процессов в живых организмах, мониторинга экспрессии генов, локализации и миграции интересующих белков и клеток, определения жизненно важных внутриклеточных характеристик, таких как pH, концентрация ионов, температуры. Молекулярные инструменты на их основе нашли успешное применение при изучении развития раковой опухоли у животных *in vivo*, включая перемещение раковых клеток, инвазию, метастазирование, ангиогенез, а также для быстрого скрининга потенциальных лекарственных средств. В этой связи, просматривается хорошая перспектива использования отдельных фототоксичных генно-инженерных вариантов для фотоиндуцированной терапии рака у человека [9]. Уникальность свойств ФБ предопределила создание специфичных биосенсоров различного назначения (в частности, для измерения концентрации ионов, активностей отдельных ферментов), основанных на методе индуктивно-резонансного переноса энергии в донорно-акцепторных FRET (Forster resonance energy transfer) парах. В большинстве случаев, практическое применение ФБ требует создания мономерных вариантов с эмиссией в дальнекрасной области спектра, обладающих высоким квантовым выходом, высокой скоростью созревания хромофора и фотостабильностью. Флуоресцентные белки, обладающие эмиссией в красной и особенно в дальнекрасной (длина волны эмиссии $\lambda_{эм} > 610$ нм) областях спектра, представляют особый практический интерес для визуализации биологических процессов. Их излучение

характеризуется более высокой проникаемостью через биологические ткани по сравнению с эмиссией меньшей длиной волны. Кроме того, излучение в дальнекрасной области, характеризующееся большей длиной волны и, соответственно, меньшей энергией кванта, вызывает меньшее повреждение маркируемых биологических объектов. В более сложных конструкциях биосенсоров исключительно актуальной остается задача создания эффективных FRET-пар на основе желто/оранжевых доноров и красных/дальнекрасных акцепторов. При рациональном конструировании биомаркеров/биосенсоров важно понять, каким образом особенности стереохимии белка определяют его основные фотофизические свойства, включая скорость и полноту созревания, склонность к олигомеризации и характеристики цветового спектра. Эти знания необходимы для разработки рационального подхода по созданию улучшенных вариантов, удовлетворяющих требуемым критериям для практического использования.

Их пространственная структура принимает форму закрытого с торцов β -бочонка, сформированного из 11-ти антипараллельных β -тяжей и одной α -спирали, в середине которой располагается хромофор, образованный из трех аминокислотных остатков X-Tyr-Gly в результате посттрансляционной автокаталитической модификации в присутствии молекулярного кислорода (рис. 2) [10–12]. Первый остаток – переменный, остальные два – консервативные. Олигомерная структура ФБ дикого типа представлена димерами или тетрамерами (рис. 3). Мономеры в составе димера тяготеют к антипараллельному взаимному расположению, а димеры в составе тетрамера – к перпендикулярному. Поверхность мономеров в тетрамере формирует два типа стабилизирующих олигомерную структуру межсубъединичных интерфейсов: ИФ1 – между субъединицами в одном димере и ИФ2 – между субъединицами в разных димерах (рис. 4) [13]. Олигомерная структура на интерфейсах стабилизируется большим количеством водородных связей между гидрофильными остатками, солевых мостиков между заряженными остатками (Lys/Arg и Glu/Asp) и гидрофобными кластерами между неполярными остатками. Хромофор располагается в центральной полости, сформированной из ближайших аминокислотных остатков (рис. 5). Фотофизические характеристики таких ФБ в значительной степени зависят от структуры зрелого хромофора и его ближайшего аминокислотного окружения. Остатки вокруг хромофора образуют между собой развитую сеть водородных связей, которая в свою очередь активно взаимодействует с хромофором путем образования водородных связей, как прямых, так и опосредованных молекулами воды. В структурах фототоксичных предшественников GFP-подобных белков, KillerRed и KillerOrange, обнаружен уникальный канал, про-

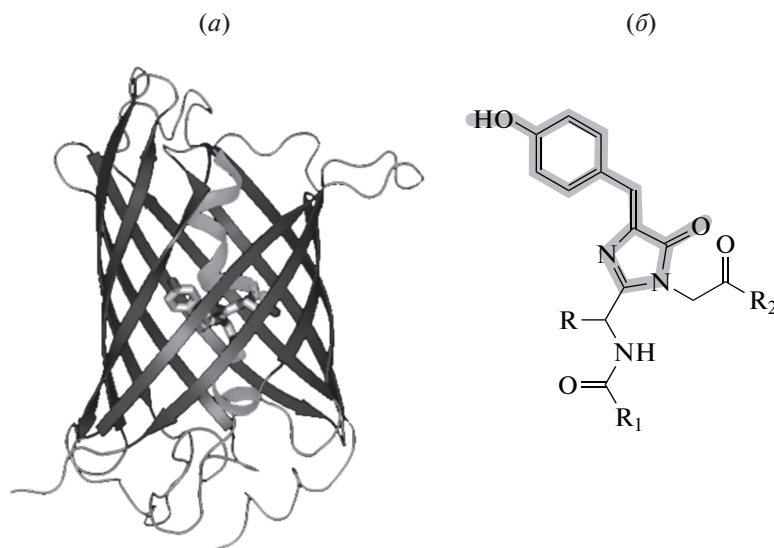


Рис. 2. (а) Пространственная структура GFP-подобных белков, (б) структура хромофора в белках дикого типа (сопряженная система двойных связей выделена серым фоном).

стирающийся от области хромофора до торцевой части β -бочонка (рис. 6) [14, 15]. Канал заполнен цепочкой из связанных водородными связями молекул воды, предположительно формирующую транспортную систему для генерируемых токсичных форм кислорода.

III. ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ МЕТКИ НА ОСНОВЕ ФОТОРЕЦЕПТОРОВ

Другая уникальная группа флуоресцентных белков представлена светочувствительными фоторецепторами, способными автокаталитически связывать присутствующие в клетке природные хромофоры. Эти инструменты отличаются природой белковой платформы, представленной в основном бактериальными фитохромами и нуклеотид-связывающими доменами флавопротеинов (LOV, BLUF), а также природой связанного хромофора, среди которых наиболее часто фигурируют биливердин, флавиномоно(ди)нуклеотид (ФМН и ФДН) и флавинадениндинуклеотид (ФАДН) [16–19]. Биомаркеры и биосенсоры на основе природных и генно-инженерных вариантов фоторецепторов обладают уникальными фотофизическими характеристиками, отсутствующими у GFP-подобных маркеров — флуоресценцией в ближней инфракрасной области, независимостью от кислорода, малыми размерами и повышенной фотосенсибилизационной активностью. Благодаря своим уникальным возможностям, они позволяют детектировать, визуализировать и контролировать биологические процессы с исключительно высокой пространственно-временной точностью. Эта особенность обуславливает специфику их применения в качестве генетически кодируемых флуоресцент-

ных биомаркеров, биосенсоров и оптогенетических инструментов. Флуоресцентные биомаркеры на их основе, излучающие в ближней инфракрасной области ($\lambda_{эм} > 700$ нм), позволяют визуализировать процессы в глубинных отделах биологических тканей. Генетически кодируемые фотосенсибилизаторы, генерирующие активные формы кислорода (синглетный кислород или супероксид анион), позволяют целевым образом инактивировать индивидуальные белки, органеллы, клетки, нуклеиновые кислоты. В качестве оптогене-

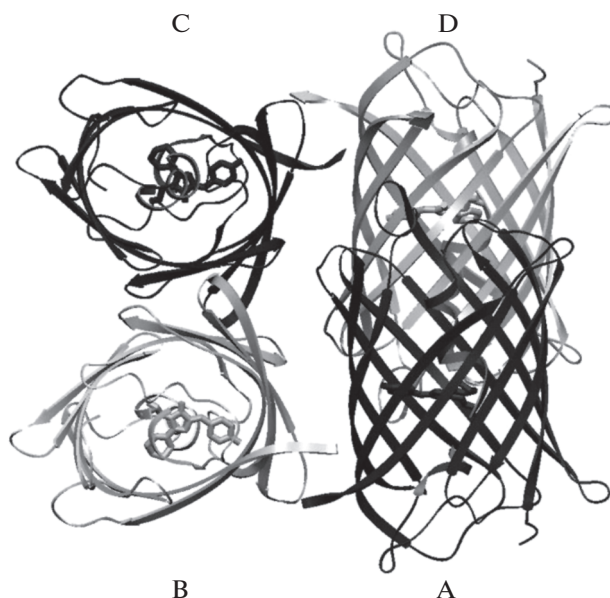


Рис. 3. Структура тетрамера GFP-подобных белков, состоящего из двух димеров CB и AD.

тических меток они нашли эффективное применение в исследованиях работы нервных клеток.

К одной из наиболее перспективных белковых платформ, используемых для создания флуоресцентных биомаркеров, относятся фитохромы. Они найдены в различных источниках – растениях, грибах, водорослях, бактериях и состоят из четырех доменов. Способность таких биомаркеров поглощать и испускать свет в дальнекрасной и ближней-инфракрасной спектральных областях обусловлена способностью одного из доменов белка связывать линейный хромофор тетрапирролового ряда. Одна из наиболее распространенных флуоресцентных конструкций на основе бактериальных фитохромов обладает способностью специфически связывать биливердин – флуорофор, присутствующий в клетке и представляющий собой продукт деградации гемоглобина [16, 20, 21]. Поглощение света вызывает фотоизомеризацию биливердина относительно одной из его связей и последующее его ковалентное связывание в полости белка. На основе фрагмента белка, состоящего из светочувствительного PAS и биливердин-связывающего GAF-доменов, а также на основе только GAF-домена, был осуществлен генно-инженерный дизайн серии эффективных флуоресцентных конструкций с эмиссией в дальнекрасной и ближней инфракрасной областях (рис. 7) [16, 20, 21]. Структура PAS-домена построена из β шпильки и трех α -спиралей, фланкирующих шпильку с трех сторон – слева, справа и сверху. Ключевой хромофор-связывающий GAF-домен принимает структуру α - β - α сэндвича, состоящего из 5-сегментного β -слоя и двух α -спиралей, формирующих хромофор-связывающую полость, а также трех α -спиралей с противоположной от β -слоя стороны. В связывающей полости разных генно-инженерных вариантов фитохромов хромофор может образовывать ковалентную связь, как с двумя остатками Cys20 и Cys253 одновременно, так и с каждым из них по отдельности.

Необходимость использования хромофор-несущей платформы на основе нуклеотид-связывающих доменов (LOV, BLUF) флавопротеинов [17–19, 22, 23] вызвана рядом внутренних ограничений GFP-подобных белков, а именно: потребность в кислороде при созревании хромофора, относительно большие размеры, ограниченная способность проникновения через клеточные мембраны и существенно пониженная стабильность при $\text{pH} < 5$. Генно-инженерные варианты этих доменов способны на начальном этапе нековалентно связывать флуорофоры – ФМН, ФДН или ФАДН (кофакторы, присутствующие в растительных и животных клетках), которые при фотовозбуждении светом в диапазоне 300–500 нм образует ковалентную связь с остатком цистеина белка.

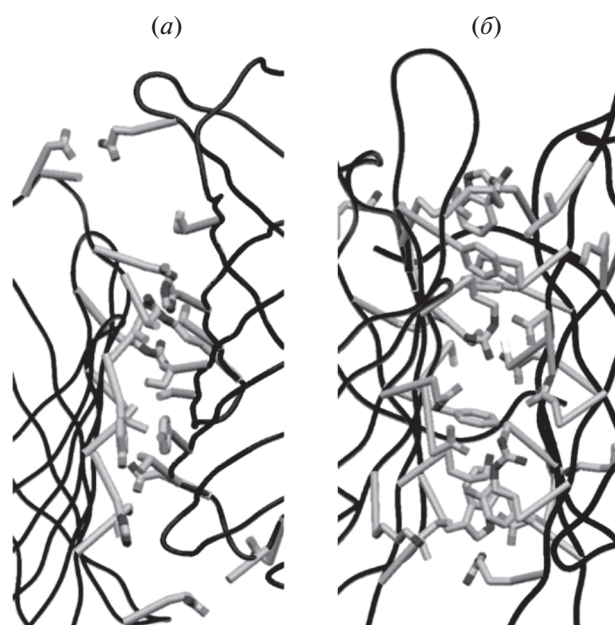


Рис. 4. Типичные структуры интерфейсов GFP-подобных белков, демонстрирующие стабилизирующее взаимодействие боковых цепей (а) между мономерами в димере и (б) между мономерами разных димеров в тетрамере.

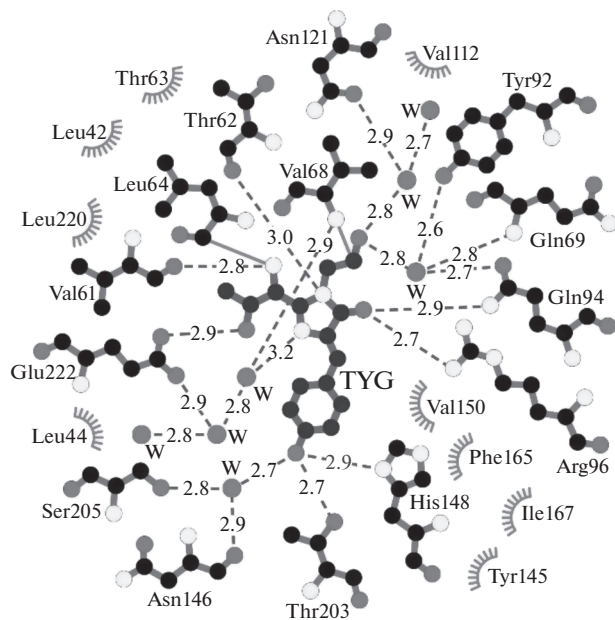


Рис. 5. Типичный пример ближайшего окружения хромофора в зеленом ФБ – EGFPv [32].

К основному преимуществу ФМН/ФДН/ФАДН-связывающих конструкций относят независимость их образования от кислорода; при переходе из аэробной среды в анаэробную флуоресцентный сигнал остается неизменным. Они характеризуются небольшим размером – порядка

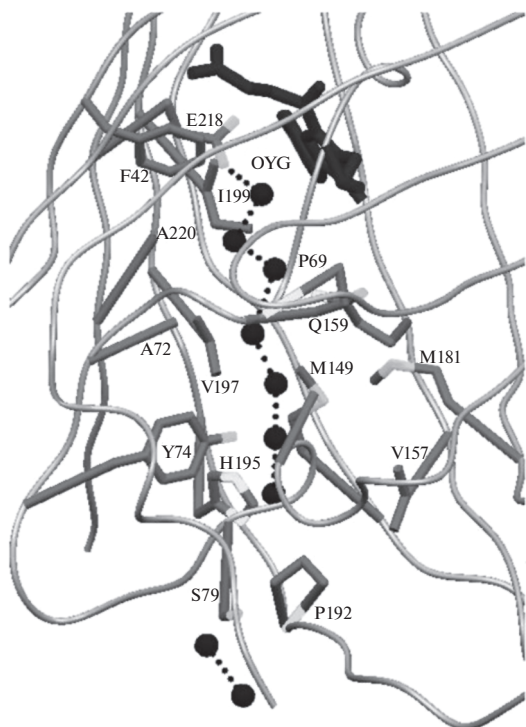


Рис. 6. Внутренний канал в структуре красного GFP-подобного белка KillerRed с цепочкой связанных водородными связями молекул воды, осуществляющей транспорт активных форм кислорода (показаны шариками) [14].

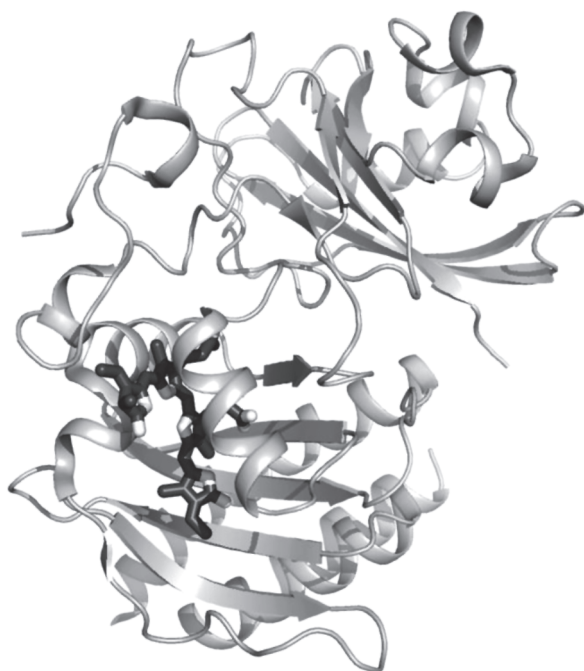


Рис. 7. Структура комплекса бактериофитохрома с биливердином [21].

100–150 аминокислотных остатков (относительно 238 в GFP белках), продолжительным временем жизни, достигающим 5.7 нс, и повышенной стабильностью фотофизических характеристик в широком диапазоне pH. Пространственная структура LOV/BLUF доменов флавопротеинов относится к α/β типу и представляет собой изогнутый смешанного типа β -слой из 5 β -тяжей, фланкированный 4 α -спиралями – по две с каждой стороны (рис. 8) [22, 24–27]. Генно-инженерные методы позволяют адаптировать внутреннюю полость домена к высокоаффинному связыванию ФМН/ФДН кофакторов. На основе LOV-домена (*Arabidopsis phototropin*) был сконструирован эффективный флуоресцентный фотосенсибилизатор с высоким квантовым выходом (~ 0.47), названный miniSOG (mini Singlet Oxygen Generator) [28, 29]. Это небольшая мономерная конструкция (106 остатков; $\lambda_{эм} \sim 500/528$ нм), связывающая ФМН с субнаномолярной аффинностью и обладающая уникальным свойством фототоксичности. При облучении светом (~ 450 нм) miniSOG генерирует токсичную форму кислорода (синглетный кислород). Это свойство нашло эффективное использование при мечении, окислении и инактивации целевых белков и клеточных органелл.

IV. БИОМАРКЕРЫ НА ОСНОВЕ ФЛУОРОГЕН-АКТИВИРУЮЩИХ БЕЛКОВ

В последнее время получили развитие новые направления по созданию флуоресцентных конструкций, основанных на органических красителях (флуорогенах), которые в растворе не флуоресцентны, но проявляют яркую флуоресценцию в специфическом нековалентном комплексе с флуороген-активирующими белками (ФАБ) [30].

Одно из них связано с конструированием специфических комплексов антител с флуорогенами различной природы. В качестве примера можно привести тройной комплекс легкой цепи ($L5^*V_Ls$) вариабельного домена антитела человека (несущим по сравнению с диким типом одну мутацию Leu89Ser) с зеленым малахитовым красителем (MG) [31]. Полученный комплекс демонстрирует эмиссию в дальнекрасной области спектра ($\lambda_{эм} \sim 670$ нм), характеризующуюся повышенной проницаемостью через биологические ткани. Причем его флуоресценция сравнима по яркости ($QY \sim \sim 0.24$) с такими коммерческими ФБ, как EGFP [32] и mCherry [33]. В структуре тройного комплекса одна молекула MG располагается в полости между двумя расположенными антипараллельно иммунобелковыми мономерами, имеющими β -структурную природу (рис. 9).

Другое перспективное направление связано с созданием флуоресцентных конструкций на основе липид-переносящих белков – липокалинов



Рис. 8. Структура комплекса LOV домена флавопротеина с флавинадениндинуклеотидом [22].

(18–40 кДа) [34–36]. Несмотря на существенное различие в аминокислотной последовательности, липокалина характеризуются удивительно похожей пространственной структурой, представляющей собой β -бочонок из 8 антипараллельных скрученных вокруг центральной оси β -тяжей и C-концевой α -спирали [37–41]. Структура липокалинов характеризуется наличием узкой вытянутой полости, которую с помощью мутагенеза можно адаптировать для специфического связывания и активации низкомолекулярных флуорогенов различной природы. На рис. 10 показана структура генно-инженерного варианта липокалина FluA, полученная из билин-связывающего белка путем 16 аминокислотных замен в связывающей полости и обладающая высоким родством к флуоресцеину [39]. Совсем недавно на основе генно-инженерного варианта бактериального липокалина *Blc* и синтетического GFP-подобного хромофора была получена серия ярких желтых флуоресцентных биомаркеров, обладающих по сравнению со спектрально-близкими GFP-подобными белками существенно более высокой фотостабильностью [42]. Специфичность связывания в структуре комплекса была достигнута за счет комплементарности взаимного расположения полярных частей хромофора и связывающей полости.

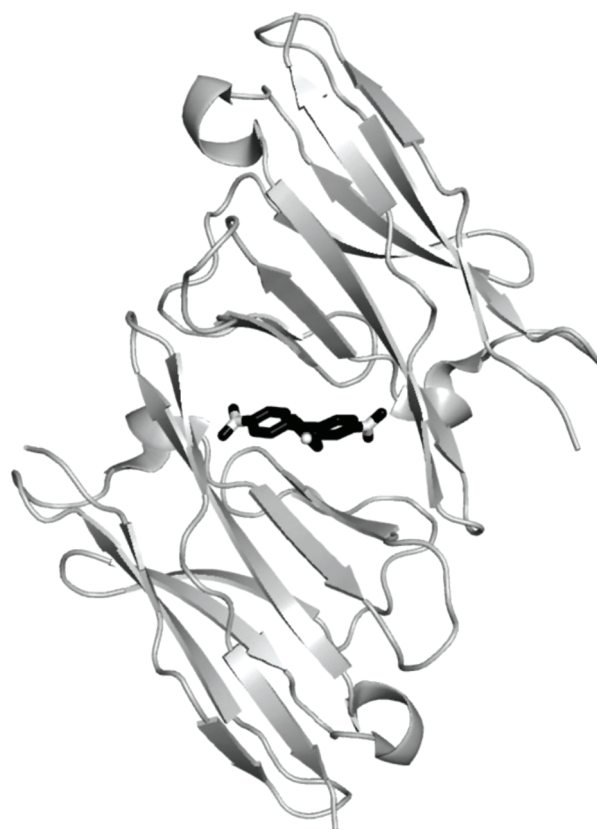


Рис. 9. Структура тройного комплекса легкой цепи варибельного домена антитела человека с зеленым малахитовым флуорофором [31].

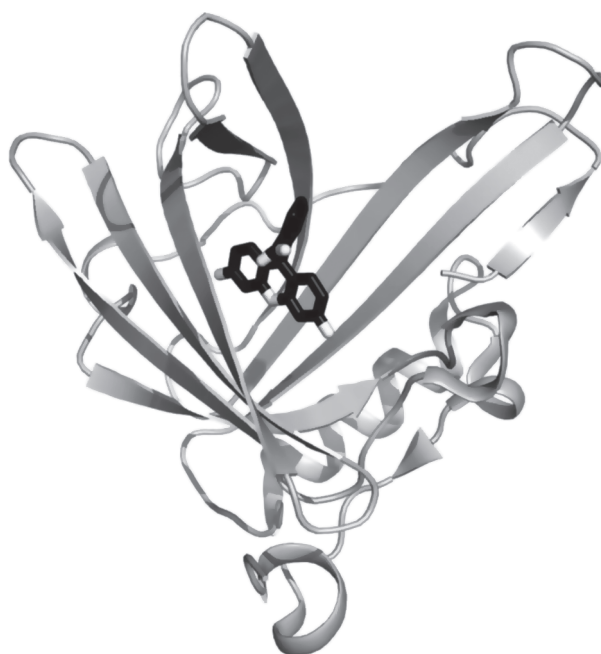


Рис. 10. Структура комплекса антикалина FluA с флуоресцеином [39].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Широкий диапазон исследований в клеточной биологии, биотехнологии и биомедицине постоянно выдвигает разнообразные требования к созданию специализированных соединений различного цветовой гаммы для практического использования в качестве флуоресцентных маркеров изучаемых биологических объектов. Исследования по созданию и структурно-функциональному изучению новых перспективных биомаркеров продолжаются. Перед разработчиками встают все более сложные задачи по получению совершенных молекулярных инструментов различного цветового диапазона с улучшенными фотофизическими характеристиками. При создании новых флуоресцентных меток с улучшенными свойствами важную роль играют рентгеноструктурные исследования. Они позволяют установить структурно-функциональные взаимосвязи биомаркеров, которые служат руководством для целенаправленного изменения их свойств в соответствии с требованиями современных методов исследований.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена по программе НИР (№ гос. регистрации АААА-А19-119042590107-1).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не содержит исследований с использованием людей или животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wysocki L.M., Lavis L.D.* // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2011. V. 15. P. 752–759.
2. *van de Linde S., Aufmkolk S., Franke C., Holm T., Klein T., Loschberger A., Proppert S., Wolter S., Sauer M.* // *Chem. Biol.* 2013. V. 20. P. 8–18.
3. *Terai T., Nagano T.* // *Pflugers Arch.* 2013. V. 465. P. 347–359.
4. *Xu W., Zeng Z., Jiang J.H., Chang Y.T., Yuan L.* // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2016. V. 55. P. 13658–13699.
5. *Heilemann M., van de Linde S., Schüttelz M., Kasper R., Seefeldt B., Mukherjee A., Tinnefeld P., Sauer M.* // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2008. V. 47. P. 6172–6176.
6. *Shroff H., Galbraith C.G., Galbraith J.A., Betzig E.* // *Nat. Methods.* 2008. V. 5. P. 417–423.
7. *Олейников В.А.* // *Природа.* 2010. Т. 3. С. 22–28.
8. *Chudakov D.M., Matz M.V., Lukyanov S., Lukyanov K.A.* // *Physiol. Rev.* 2010. V. 90. P. 1103–1163.
9. *Hoffman R.M.* // *Curr. Top. Dev. Biol.* 2005. V. 70. P. 121–144.
10. *Tsien R.Y.* // *Annu. Rev. Biochem.* 1998. V. 67. P. 509–544.
11. *Pletnev V.Z., Pletneva N.V., Sarkisyan K.S., Mishin A.S., Lukyanov K.A., Goryacheva E.A., Ziganshin R.H., Dauter Z., Pletnev S.* // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2015. V. 71. P. 1699–1707.
12. *Pletnev V.Z., Pletneva N.V., Lukyanov K.A., Souslova E.A., Fradkov A.F., Chudakov D.M., Chepurnykh T., Yampolsky I.V., Wlodawer A., Dauter Z., Pletnev S.* // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2013. V. 69. P. 1850–1860.
13. *Pletneva N.V., Pletnev S., Pakhomov A.A., Chertkova R.V., Martynov V.I., Muslinkina L., Dauter Z., Pletnev V.Z.* // *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* 2016. V. 72. P. 922–932.
14. *Pletnev S., Gurskaya N.G., Pletneva N.V., Lukyanov K.A., Chudakov D.M., Martynov V.I., Popov V.O., Kovalchuk M.V., Wlodawer A., Dauter Z., Pletnev V.* // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. P. 32028–32039.
15. *Pletneva N.V., Pletnev V.Z., Sarkisyan K.S., Gorbachev D.A., Egorov E.S., Mishin A.S., Lukyanov K.A., Dauter Z., Pletnev S.* // *PLoS One.* 2015. V. 10. P. e0145740.
16. *Anders K., Essen L.O.* // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2015. V. 35. P. 7–16.
17. *Mukherjee A., Schroeder C.M.* // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2015. V. 31. P. 16–23.
18. *Shcherbakova D.M., Shemetov A.A., Kaberniuk A.A., Verkhusha V.V.* // *Annu. Rev. Biochem.* 2015. V. 84. P. 519–550.
19. *Buckley A.M., Petersen J., Roe A.J., Douce G.R., Christie J.M.* // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2015. V. 27. P. 39–45.
20. *Piatkevich K.D., Subach F.V., Verkhusha V.V.* // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. P. 2153.
21. *Bhattacharya S., Auldridge M.E., Lehtivuori H., Ihalainen J.A., Forest K.T.* // *J. Biol. Chem.* 2014. V. 289. P. 32144–32152.
22. *Christie J.M., Hitomi K., Arvai A.S., Hartfield K.A., Mettlen M., Pratt A.J., Tainer J.A., Getzoff E.D.* // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. P. 22295–22304.
23. *Walter J., Hausmann S., Drepper T., Puls M., Eggert T., Dihne M.* // *PLoS One.* 2012. V. 7. P. e43921.
24. *Anderson S., Dragnea V., Masuda S., Ybe J., Moffat K., Bauer C.* // *Biochemistry.* 2005. V. 44. P. 7998–8005.
25. *Jung A., Domratcheva T., Tarutina M., Wu Q., Ko W.H., Shoeman R.L., Gomelsky M., Gardner K.H., Schlichting I.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. P. 12350–12355.
26. *Rollen K., Granzin J., Panwalkar V., Arinkin V., Rani R., Hartmann R., Krauss U., Jaeger K.E., Willbold D., Batra-Safferling R.* // *J. Mol. Biol.* 2016. V. 428. P. 3721–3736.
27. *Wu Q., Gardner K.H.* // *Biochemistry.* 2009. V. 48. P. 2620–2629.
28. *Xu S., Chisholm A.D.* // *Sci Rep.* 2016. V. 6. P. 21271.
29. *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. P. e1001041.
30. *Bruchez M.P.* // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2015. V. 27. P. 18–23.

31. *Szent-Gyorgyi C., Stanfield R.L., Andreko S., Dempsey A., Ahmed M., Capek S., Waggoner A.S., Wilson I.A., Bruchez M.P.* // *J. Mol. Biol.* 2013. V. 425. P. 4595–4613.
32. Плетнева Н.В., Плетнев С.В., Богданов А.М., Горячева Е.А., Артемьев И.В., Сулова Е.А., Архипова С.Ф., Плетнев В.З. // *Биоорг. химия.* 2014. Т. 40. С. 414–420. [*Pletneva N.V., Pletnev S.V., Bogdanov A.M., Goriacheva E.A., Artem'ev I.V., Suslova E.A., Arkhipova S.F., Pletnev V.Z.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2014. V. 40. P. 383–389.]
33. *Shu X., Shaner N.C., Yarbrough C.A., Tsien R.Y., Remington S.J.* // *Biochemistry.* 2006. V. 45. P. 9639–9647.
34. *Flower D.R.* // *Biochem. J.* 1996. V. 318 (Pt 1). P. 1–14.
35. *Bishop R.E.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2000. V. 1482. P. 73–83.
36. *Skerra A.* // *FEBS J.* 2008. V. 275. P. 2677–2683.
37. *Huber R., Schneider M., Mayr I., Muller R., Deutzmann R., Suter F., Zuber H., Falk H., Kayser H.* // *J. Mol. Biol.* 1987. V. 198. P. 499–513.
38. *Korndorfer I.P., Schlehuber S., Skerra A.* // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 330. P. 385–396.
39. *Korndorfer I.P., Beste G., Skerra A.* // *Proteins.* 2003. V. 53. P. 121–129.
40. *Ghosh S., Yu C.L., Ferraro D.J., Sudha S., Pal S.K., Schaefer W.F., Gibson D.T., Ramaswamy S.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. P. 11513–11518.
41. *Campanacci V., Nurizzo D., Spinelli S., Valencia C., Tegoni M., Cambillau C.* // *FEBS Lett.* 2004. V. 562. P. 183–188.
42. *Bozhanova N., Baranov M., Klementieva N., Sarkisyan K., Gavrikov A., Yampolsky I., Zagaynova E., Lukyanov S., Lukyanov K., Mishin A.* // *Chem. Sci.* 2017. V. 8. P. 7138–7142.

Fluorescent Tags in Biology. Three Dimensional Structure

N. V. Pletneva*, E. A. Goryacheva*, I. V. Artemyev*, S. F. Arkhipova*, and V. Z. Pletnev*, #

#E-mail: vzpletnev@gmail.com

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997 Russia

Fluorescent tags of various nature are widely used in cell biology for visualization and study processes in living organisms including gene expression, localization and migration of proteins and cells of interest, determination of the vital intracellular characteristics such as pH, ion concentration, temperature, etc. The review presents an overview of the three dimensional organization as well as advantages and disadvantages of the most promising fluorescent molecular instruments that have been widely used in biology.

Keywords: 3D structure, fluorescent tags, biomarkers, low-molecular-weight fluorophores, quantum dots, GFP-like proteins, photoreceptors, phytochromes, flavoproteins, lipocalins