



УДК 576.086.2

## ФЛУОРОФОРЫ ДЛЯ ЛОКАЛИЗАЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ ОДИНОЧНЫХ МОЛЕКУЛ

© 2017 г. Н. В. Клементьева\*, #, Н. Г. Божанова\*\*, Е. В. Загайнова\*,  
К. А. Лукьянов\*\*, А. С. Мишин\*\*

\*Нижегородская государственная медицинская академия  
603005, Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1

\*\*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Поступила в редакцию 22.08.2016 г.

Принята к печати 10.10.2016 г.

Флуоресцентная микроскопия сверхвысокого разрешения позволяет получать изображения с разрешением 10–20 нм, существенно превосходящим дифракционный предел обычной оптической микроскопии (200–350 нм), и дает возможность детально исследовать внутриклеточные структуры и индивидуальные белки как в фиксированных, так и в живых клетках. Среди таких методов широкое распространение получила локализационная микроскопия одиночных молекул (SMLM). В основе этой технологии лежит использование специальных флуоресцентных меток, способных к фотопереключению. В обзоре представлена классификация таких флуорофоров, описаны механизмы их фотопереключения, приведены примеры успешного практического применения. Обсуждаются последние достижения и перспективы в области создания новых эффективных меток, пригодных для SMLM.

*Ключевые слова:* флуоресцентная микроскопия сверхвысокого разрешения, локализационная микроскопия одиночных молекул, фотоконверсия, фотоактивируемые флуоресцентные белки, фотоактивируемые красители, флуорогенные красители.

DOI: 10.7868/S0132342317030083

Среди различных методов микроскопического анализа клеток особое место занимает флуоресцентная микроскопия. Основным ее преимуществом является возможность специфического мечения изучаемых структур (внутриклеточных органелл, целевых белков, геномных локусов и др.) и их детекции с очень высокой чувствительностью [1, 2].

Разрешающая способность светового микроскопа может быть определена через дифракционный предел, предложенный Эрнстом Аббе и выражающийся формулой:

$$d_z = 2\lambda / (n \sin^2 \alpha), \quad d_{x, y} = \lambda / (2n \sin \alpha),$$

где  $d_{x, y}$  и  $d_z$  – латеральное и аксиальное разрешение микроскопа; соответственно,  $\lambda$  – длина волны возбуждающего света,  $n$  – показатель преломления среды,  $\alpha$  – угол между оптической осью

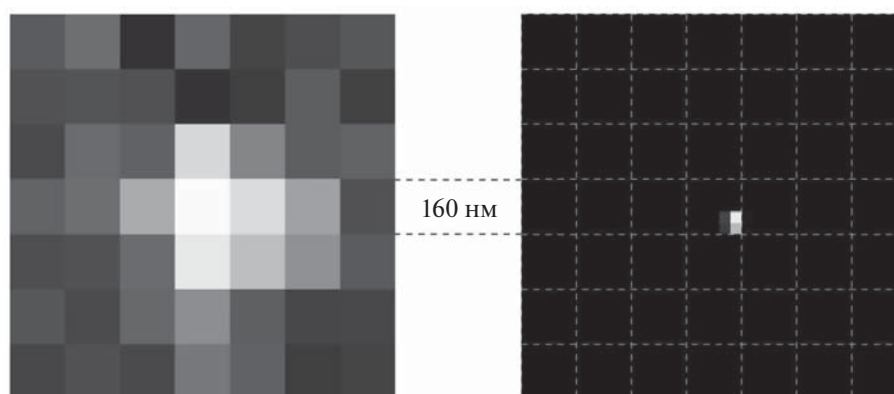
объектива и наиболее отклоняющимся лучом, попадающим в объектив [3, 4]. Таким образом, даже при наличии идеальной оптики разрешение микроскопа будет ограничено примерно половиной длины волны используемого света.

Чаще всего во флуоресцентной микроскопии применяются источники света видимой области спектра (400–700 нм), при этом максимально достижимое разрешение составляет 200–350 нм. Однако многие клеточные структуры имеют меньший размер, поэтому изучение процессов, протекающих в клетке, зачастую остается за пределами возможностей традиционной флуоресцентной микроскопии [5]. Преодолеть дифракционный барьер и повысить разрешающую способность флуоресцентного микроскопа позволили технологии микроскопии сверхвысокого разрешения.

На сегодняшний день разработано несколько различных подходов к получению изображений со сверхвысоким разрешением, среди которых микроскопия структурированного освещения (SIM, structured illumination microscopy), микроскопия истощения флуоресценции путем вынужденного излучения (STED, stimulated emission depletion), локализационная микроскопия одиночных

Сокращения: GFP – зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein); SMLM – локализационная микроскопия одиночных молекул (single-molecule localization microscopy); ФАФБ – фотоактивируемые флуоресцентные белки.

# Автор для связи (тел.: +7 (903) 059-84-86; эл. почта: nvklementieva@gmail.com).



**Рис. 1.** Принцип SMLM. Показано изображение единичной молекулы (слева) и вычисленная на основе этого изображения локализация данной молекулы (справа). Информация о координатах множества молекул в поле зрения позволяет реконструировать изображение со сверхвысоким разрешением.

молекул (SMLM, single-molecule localization microscopy) и др. [6, 7]. В обзоре мы рассмотрим метки, используемые для SMLM, так как данная технология подразумевает применение флуорофоров со специальными свойствами.

К группе методов SMLM относят PALM (photoactivated localization microscopy) [8], FPALM (fluorescence photoactivation localization microscopy) [9], STORM (stochastic optical reconstruction microscopy) [10], dSTORM/GSDIM (direct STORM/ground state depletion followed by individual molecule return) [11, 12], PAINT (point accumulation for imaging in nanoscale topography) [13] и др. Сверхвысокое разрешение в данных методах достигается за счет вычисления положения единичной флуоресцирующей молекулы (рис. 1). Это становится возможным, если одновременно активирована только небольшая часть всех молекул флуорофора, а остальные находятся в темновом “выключенном” состоянии, и такие циклы “включения” флуорофоров повторяются многократно. Путем наложения локализованных центров всех молекул реконструируется субдифракционное изображение исследуемой структуры [14, 15].

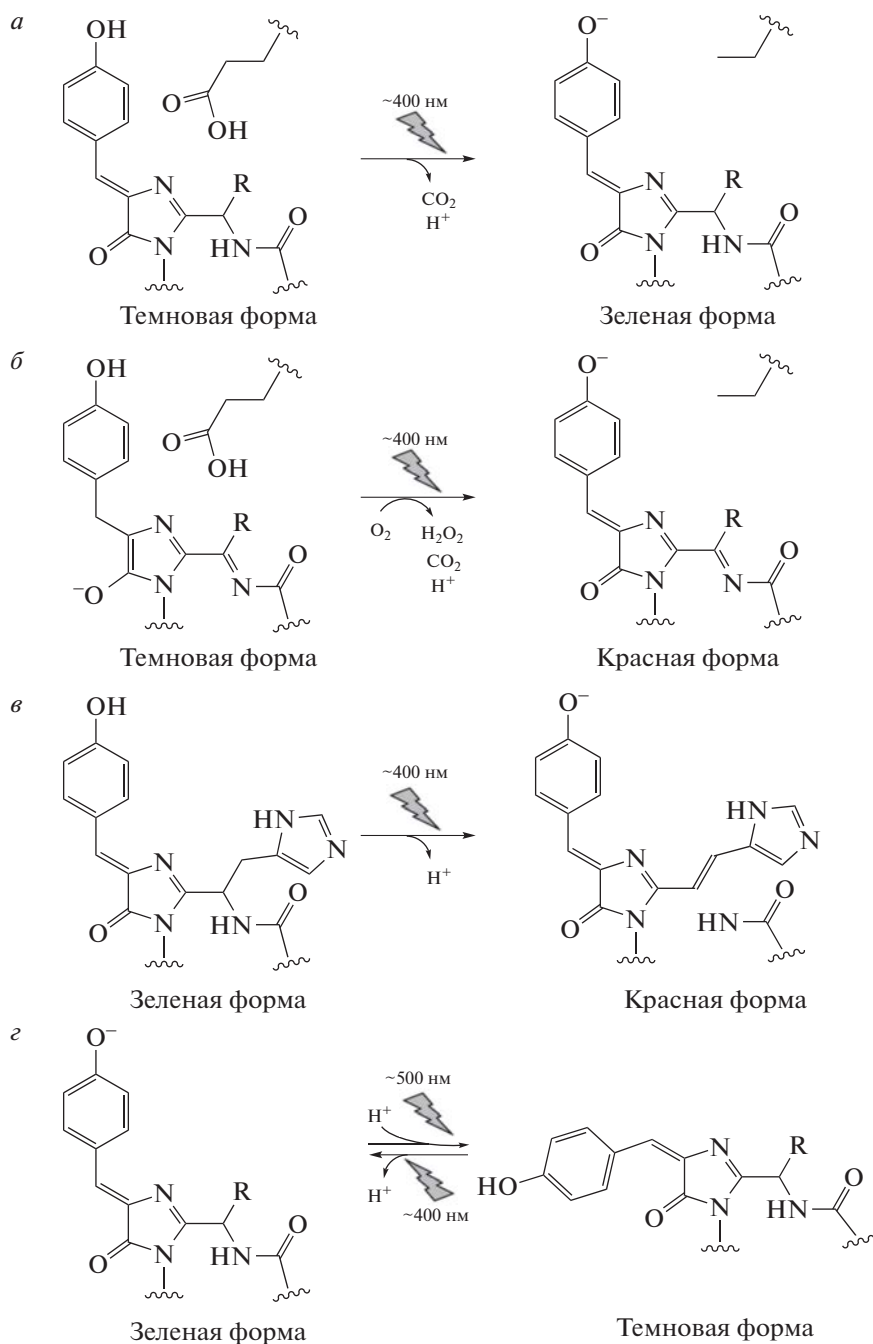
Концепция SMLM основана на применении специальных меток, способных к переходу между темновым и флуоресцентным состояниями. Для эффективной работы такие метки должны иметь низкий фоновый сигнал, высокий фотонный бюджет (суммарное количество фотонов, испускаемых молекулой флуорофора за время нахождения во флуоресцентном состоянии) и возможность специфической доставки к целевым структурам. Флуорофоры, пригодные для SMLM, можно разделить на четыре большие группы: фотоактивируемые флуоресцентные белки, квантовые точки, фотоактивируемые флуоресцентные красители и флуорогенные красители.

### ФОТОАКТИВИРУЕМЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ БЕЛКИ (ФАФБ)

С начала 2000-х годов сразу в нескольких лабораториях начались разработки флуоресцентных белков, способных к фотоактивации – многократному увеличению флуоресцентного сигнала при облучении светом определенной длины волны [16, 17].

Выделяют два типа фотоактивации – обратимую между темновым и флуоресцентным состояниями и необратимую. Последняя, в свою очередь, может быть представлена переходом как из темнового во флуоресцентное состояние, так и из одного флуоресцентного состояния в другое с эмиссией и/или возбуждением на другой длине волны [18, 19]. Помимо механизма фотопереключения, ФАФБ различаются по фотофизическим свойствам. В условиях микроскопии сверхвысокого разрешения SMLM особенно критичными становятся такие параметры, как подверженность спонтанному миганию (кратковременным переходам молекул в темновое состояние с последующим возвращением во флуоресцентное состояние), эффективность и скорость фотопереключения, количество фотонов, испускаемых за один цикл фотопереключения [20].

ФАФБ с необратимым переходом из темнового во флуоресцентное состояние. Первым флуоресцентным белком, у которого была обнаружена способность к фотоактивации, был PA-GFP [21]. Мутация T203N в GFP привела к тому, что облучение интенсивным фиолетовым светом вызывало 100-кратное увеличение зеленого флуоресцентного сигнала (рис. 2a). На сегодняшний день это единственный белок, обладающий фотоконверсией из темновой формы в зеленую, поэтому он часто применяется при многоцветном мечении в сочетании с красными флуорофорами [22]. В отличие от других фотоактивируемых белков,



**Рис. 2.** Механизмы фотоконверсии некоторых ФАФБ. (а) PA-GFP. Фотоконверсия происходит за счет декарбоксилирования остатка глутамата, сопровождающегося переходом хромофора в депротонированную флуоресцентную форму. (б) PAmCherry1. Фотоконверсия происходит за счет окисления боковой цепи остатка тирозина хромофора и сопровождается декарбоксилированием остатка глутамата. (в) Dendra2. Фотоконверсия происходит за счет разрыва белковой цепи и включения боковой группы гистидина в структуру хромофора. (г) Dronpa. Обратимая фотоконверсия определяется *цис-транс*-изомеризацией хромофора, сопровождаемой его протонированием и депротонированием.

PA-GFP сохраняет способность к фотоактивации при низких температурах (до 80 K), что было успешно применено для визуализации замороженных образцов бактериальных клеток методом *сryo*-PALM, комбинируемым с криоэлектронной томографией [23]. Среди белков, характери-

зующихся фотоконверсией из темновой формы в красную, наибольшую популярность получили PAmCherry1, PAmKate и PATagRFP [22] (рис. 2б).

В технологии *sptPALM* (single-particle tracking PALM), позволяющей отслеживать траектории движения единичных молекул в живых клетках,

эффективно работает комбинация PA-GFP с PAtagRFP [24]. При этом флуоресценция этих двух белков легко разделяется спектрально, а для их одновременной фотоактивации достаточно одного лазера с длиной волны 405 нм.

К ФАФБ с необратимой цветовой фотоконверсией относятся белки, изменяющие в результате фотоактивации цвет флуоресценции. Например, белки Kaede, EosFP, KikGR и Dendra2 конвертируются из зеленой в красную форму при облучении фиолетовым (380–420 нм) светом [25] (рис. 2в). С помощью белка Dendra2 была реализована 3D-микроскопия динамики внутриклеточных структур в живых бактериальных клетках, с разрешением по  $z$  менее 100 нм [26]. На основе белка EosFP были сконструированы мономерные формы mEos3.1 и mEos3.2, имеющие наибольший фотонный бюджет, что обеспечило разрешение вплоть до 10 нм при визуализации белков цитоскелета [27].

Также стоит упомянуть белок PS-CFP2, который под воздействием фиолетового света переходит из голубого в зеленое флуоресцентное состояние. Это позволяет использовать его в комбинации с описанными выше белками для многоцветной PALM-микроскопии [28].

Класс ФАФБ с обратимой фотоактивацией включает в себя белки, способные многократно переключаться между двумя состояниями при облучении светом разной длины волны. В методах микроскопии сверхвысокого разрешения широкое применение нашел белок Dronpa [29] и его производные. Dronpa обладает яркой зеленой флуоресценцией. Интенсивное облучение голубым светом (около 500 нм) ведет к “выключению” белка, воздействие же фиолетового света (например, 405 нм) возвращает во флуоресцентное состояние (рис. 2г). Его производные – bsDronpa и Padron – характеризуются противоположным типом фотоконверсии, когда переход во флуоресцентное состояние индуцируется голубым светом, а “выключение” – фиолетовым. Разные режимы фотопереключения позволяют разделять сигналы от bsDronpa, Padron и Dronpa, используя один канал детекции [30]. Другой мутант белка Dronpa – Dronpa-M159T – демонстрирует в 1000 раз более быстрое, по сравнению с предшественником, фотопереключение, что практически решило проблему фотообесцвечивания белка [31] и позволило использовать его в микроскопии сверхвысокого разрешения на срезах живой ткани мозга [32].

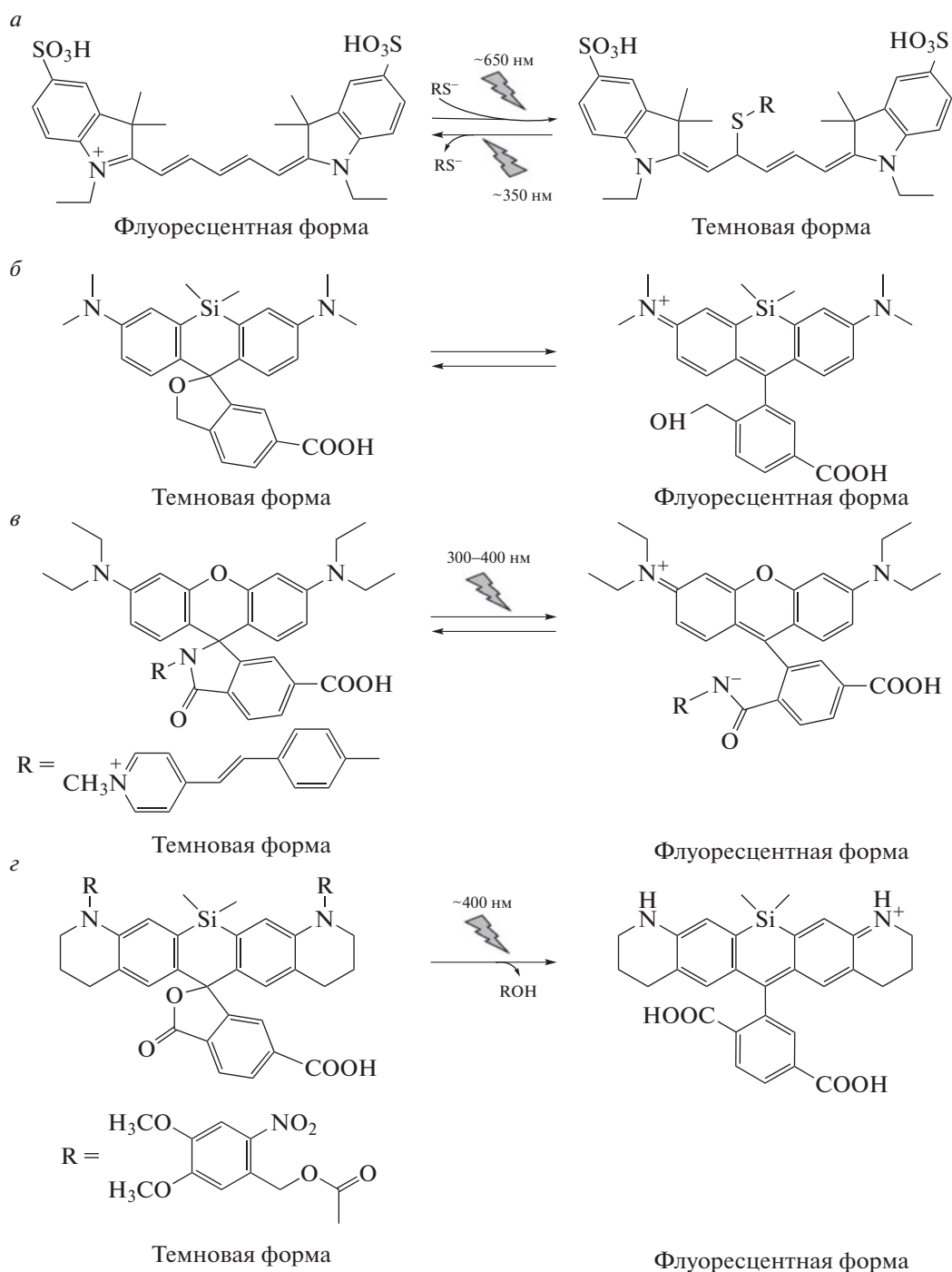
Широкий спектр ФАФБ с различными свойствами дает исследователям возможность подбирать оптимальные сочетания для проведения многоцветной визуализации со сверхразрешением. Так, с помощью пары tdEos и Dronpa в двухцветной PALM-микроскопии было оценено распределение актина в дендритных шипиках

нейронов крысы [33]. Посредством комбинации PAmCherry1 с rsKame – белком с замедленной кинетикой обратимой фотоконверсии – была выявлена пространственная организация ультраструктур внутренней и внешней мембран митохондрий, ответственных за их деление [34]. Также была продемонстрирована возможность трехцветной PALM-микроскопии с использованием спектрально близких белков Dendra2, PAmCherry1 и PAmKate [35]. Для этого каждое изображение одиночных молекул одновременно регистрировалось в двух каналах эмиссии (565–585 и 585–675 нм). Несмотря на близкие максимумы эмиссии (573, 595 и 628 нм для Dendra2, PAmCherry1 и PAmKate, соответственно), каждый белок давал характерное отношение интенсивностей флуоресценции в этих каналах детекции, на основании чего производилась идентификация молекул.

Генетически кодируемые ФАФБ представляют собой простой и высокоспецифичный инструмент для мечения белковых мишеней в живых клетках. Однако в некоторых характеристиках, важных для эффективной SMLM, ФАФБ значительно уступают фотоактивируемым химическим красителям. Так, фотонный бюджет даже самых ярких белков значительно (в десятки раз) ниже, что напрямую отражается на точности локализации целевой молекулы. Кроме того, только мономерные ФАФБ пригодны для использования SMLM, что еще сильнее сокращает разнообразие доступных исследователю меток [36].

## КВАНТОВЫЕ ТОЧКИ

Квантовые точки представляют собой полупроводниковые нанокристаллы, обычно образованные селенидом кадмия и сульфидом цинка [37, 38]. Они обладают превосходными оптическими характеристиками, такими как широкая полоса поглощения, узкий, строго симметричный пик эмиссии, высокий квантовый выход даже в ближнем инфракрасном диапазоне спектра, а также исключительно высокая фотостабильность. Было показано, что под воздействием света некоторые типы квантовых точек претерпевают внутренние электронные перестройки, что приводит к “прерывистой” флуоресценции. Такие флуктуации флуоресценции квантовых точек были успешно использованы в технологии SOFI (super-resolution optical fluctuation imaging) с улучшением разрешения в 5 раз [39], а также в методе GSDIM, где была продемонстрирована разрешающая способность микроскопа вплоть до размера единичной квантовой точки (около 12 нм). Вместе с тем, применение квантовых точек для биологических и биомедицинских задач сильно ограничено ввиду потенциально высокой токсичности образующих их солей, а также трудности доставки к целевым структурам [14, 15].



**Рис. 3.** Механизмы перехода из темновой формы во флуоресцентную для некоторых красителей, используемых в методах SMLM. (а) Цианиновый краситель Cy5. В бескислородных условиях в присутствии тиола (например, бета-меркаптоэтанола) облучение интенсивным красным светом приводит к присоединению молекулы тиола к полиметиновому мостику красителя. Реакция может быть обращена облучением коротковолновым светом; присутствие молекулы активаторного красителя (например, Cy3 или AlexaFluor 405) облегчает уход тиоловой группы. (б) Кремний-родаминовый краситель HMSiR, претерпевающий спонтанные переходы между темновой и флуоресцентной формами в результате спироциклизации. (в) Спиrolактамное производное родамина. Под действием коротковолнового света, поглощаемого группой R, обратимо переходит во флуоресцентное состояние за счет раскрытия цикла. (г) Фотоактивируемое (saged) производное кремний-родаминового красителя SiRh<sub>Q</sub>. Облучение коротковолновым светом приводит к отщеплению фотолабильных групп R и необратимому переходу во флуоресцентное состояние.

## ФОТОАКТИВИРУЕМЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ КРАСИТЕЛИ

Так же, как и в случае с ФАФБ, в группе фотоактивируемых флуоресцентных красителей можно выделить обратимо и необратимо фотопереключаемые флуорофоры.

*Обратимо переключаемые флуорофоры* наиболее широко применяются в методах на основе SMLM [40]. В работе, демонстрирующей метод STORM, использовались два цианиновых красителя: Cy5 в качестве “репортера” и Cy3 в качестве “активатора” [10, 41]. Было показано, что Cy5 при облучении красным светом в бескислородных условиях в присутствии тиолов переходит в бесцветную форму в результате их ковалентного присоединения [42] (рис. 3а). Такие молекулы могут вернуться во флуоресцентное состояние под воздействием коротковолнового света. При этом присутствие молекулы активатора (Cy3) на расстоянии менее 3 нм увеличивает эффективность процесса фотоактивации [43]. Таким образом, использование активатора позволяет снизить уровень фотообесцвечивания молекулы репортера и, следовательно, увеличить число локализованных событий и повысить качество получаемого изображения [44]. Несмотря на распространение технологии dSTORM (direct STORM), основанной на использовании одного фотоактивируемого флуорофора, оригинальная методика с парными красителями до сих пор успешно реализуется в различных областях исследований [45, 46].

В дальнейших исследованиях было обнаружено, что в анаэробных условиях в присутствии тиолов можно добиться мигания молекул красителей различных классов, поглощающих свет в голубой (Atto 488, AlexaFluor 488, Atto 520, Cy2), желтом (AlexaFluor 568, TAMRA, Cy3, Atto 565), красном (AlexaFluor 647, Cy5, Atto 647, Atto 680, Cy5.5) и ближнем инфракрасном диапазонах (DyLight 750, Cy7, AlexaFluor 750, Atto 740). Для большинства из них использование лазера с длиной волны 405 нм ускоряет процесс реактивации флуоресцентной формы, что сокращает время получения изображения [40]. В ряде случаев появление темновой формы объясняется переходом молекул красителя в долгоживущее триплетное состояние, которое также контролируется специальными буферами с редокс-агентами [47, 48].

В 2014 г. был представлен новый класс кремний-родаминовых красителей, способных к спонтанному переходу между темновой и флуоресцентной формой в результате спироциклизации [49] (рис. 3б). На основе спиролактамов производных родамина также был синтезирован краситель, пригодный для проведения микроскопии по типу SMLM [50]. В неактивированном состоянии молекулы флуорофора находятся в темновой, “закрытой” форме, но после облучения

фиолетовым лазером приобретают способность к флуоресценции в желто-зеленой области спектра за счет восстановления системы конъюгированных двойных связей в ксантеновом кольце (рис. 3в). Такие флуорофоры могут успешно работать в живых клетках, так как не требуют добавления тиолов и высокой интенсивности лазерного облучения для фотоактивации.

К группе *необратимо фотопереключаемых флуорофоров* относятся так называемые “caged” красители (caged – в переводе “запертый в клетку”), содержащие фотолабильную группу. Такая группа может быть удалена или модифицирована под действием коротковолнового света, что приводит к значительному росту флуоресцентного сигнала. Например, на основе Q-родамина созданы кремний-содержащие дальнекрасные caged-флуорофоры SiRh<sub>Q</sub> (рис. 3г) и продемонстрировано их успешное применение для многоцветной визуализации клеточных ультраструктур со сверхразрешением [51]. Фотохимический механизм активации позволяет контролировать “включение” определенных популяций индивидуальных молекул флуорофора, варьируя зону облучения и мощность лазера. При этом возможно проведение экспериментов в обычных средах для культивации, без использования специальных буферных растворов.

В целом, описанные флуорофоры характеризуются высокой яркостью, контрастностью и фотостабильностью. К проблемам их использования можно отнести трудность целевой доставки и высокий фоновый сигнал. Основным способом связывания синтетических красителей с целевой структурой служит их конъюгация с антителами. Антитела, в свою очередь, имеют большой размер и часто демонстрируют высокий уровень неспецифического мечения. Кроме того, они не способны проникать через мембраны и, соответственно, возникает необходимость пермеабилзации и фиксации образца при изучении внутриклеточных структур [52].

В связи с упомянутыми недостатками антител были разработаны альтернативные системы сайт-специфической доставки синтетических меток к целевым молекулам. Среди них наиболее известны коммерчески доступные системы мечения SNAP-tag, CLIP-tag и HaloTag [53, 54]. Эти белковые таг-домены используются как генетически кодируемые репортеры. Через собственные аминокислотные остатки они обеспечивают ковалентное связывание целевого белка практически с любым выбранным красителем. Однако такой подход характеризуется высокой фоновой флуоресценцией, требует многоступенчатых процедур отмывок образца и может приводить к неправильной локализации исследуемого белка из-за большого размера таг-домена [55].

Меньшим размером обладают системы на основе пары пептид-флуорофор, что минимизирует воздействие на целевые структуры. Например, было показано, что красители ReAsH и FLAsH могут связывать короткие пептидные последовательности, введенные в состав целевого белка. Похожие пептидные мотивы присутствуют и в других белках, помимо целевого, что может привести к неспецифическому мечению. Специфические фермент-опосредованные системы мечения, такие как LAP (LplA acceptor peptide), позволяют решить эту проблему, но их применение на данный момент сильно ограничено, так как разработка каждой новой пары до сих пор является сложным и трудоемким процессом [56].

Перечисленные способы мечения успешно применяются в микроскопии сверхвысокого разрешения. Например, с помощью метода PALM на основе FLAsH было охарактеризовано распределение фермента интегразы в вирионах и внутриклеточных комплексах вируса иммунодефицита человека [57]. SNAP-tag и HaloTag были использованы для визуализации различных белков в живых прокариотических клетках посредством двухцветной SMLM-микроскопии [58].

### ФЛУОРОГЕННЫЕ КРАСИТЕЛИ

Недавно был предложен принцип мечения целевых молекул с помощью флуорогенных красителей – молекул, которые в свободном виде не имеют выраженной флуоресценции, а приобретают ее лишь в момент связывания с целевым объектом.

Впервые этот подход был продемонстрирован на липидном бислое в методе PAINT, основанном на стохастическом связывании диффундирующих флуорофоров с поверхностью исследуемого объекта [13], а затем воплощен в методе BALM (binding-activated localization microscopy). С помощью BALM и ДНК-связывающих красителей, таких как YOYO-1 и PicoGreen, были получены изображения структуры хромосом бактерий со сверхразрешением [59]. Система мечения клеточных белков с помощью флуорогенов впервые была реализована на основе малахитового зеленого и тиазолового оранжевого в комбинации с вариабельными доменами одноцепочечных антител (FAP-белки) [60].

Флуоресцентный сигнал от флуорогенных красителей с низкой аффинностью может быть в высшей степени фотостабилен, так как молекулы красителя взаимодействуют с целевой структурой непрерывно длительное время, что уменьшает вероятность фотообесцвечивания. Процесс обратимого связывания красителя, теоретически, может обеспечивать мигание флуоресцентного сигнала в целевых структурах, необходимое для локализа-

ционных методов микроскопии сверхвысокого разрешения [61]. Успешное мечение внутриклеточных белков, в том числе в режиме SMLM, показано с использованием малахитового зеленого, модифицированного сложными эфирами [62]. Существенным ограничением данного подхода служит то, что большинство красителей не способны проходить через цитоплазматическую мембрану.

### ПЕРСПЕКТИВЫ

В рамках технологий SMLM фотофизические и фотохимические свойства используемых флуоресцентных меток определяют качество изображений со сверхвысоким разрешением. Поэтому поиск и дизайн новых флуорофоров и систем мечения, наиболее эффективных и удобных в работе, крайне актуальны.

В отношении фотоактивируемых синтетических красителей важной областью исследования является разработка буферных окислительно-восстановительных систем (ROXS, reducing and oxidizing system) для эффективного процесса фотопереключения в условиях, близких к физиологическим [63].

Многообещающим направлением является использование флуорогенных красителей в микроскопии сверхвысокого разрешения для исследования живых объектов. Так, недавно на основе кремниевых производных родамина (SiR) были созданы флуорогенные краски для белков цитоскелета (актин, тубулин) [64] и молекул ДНК [65]. Позже был предложен краситель SiR700, возбуждаемый в дальнекрасном диапазоне спектра, что позволяет снизить фототоксичность при работе с живыми клетками [66].

Перспективными флуорогенными метками для SMLM могут оказаться синтетические аналоги хромофоров флуоресцентных белков, способные свободно проникать в клетку. Так, было показано, что флуоресценция GFP-подобных хромофоров может многократно возрастать при связывании со специфическими РНК-аптамерами [67] или белками [68, 69].

Одна из последних разработок – белок Y-FAST на основе светочувствительного желтого белка РУР, который в комбинации с флуорогенными красителями, производными роданина, позволяет специфически метить белки [70]. Благодаря способности Y-FAST к быстрому переходу между темновым (несвязанным) и флуоресцентным (связанным) состояниями, в будущем он может быть применен для микроскопии сверхвысокого разрешения.

Прогресс в разработке флуоресцентных меток необходим для усовершенствования методов прижизненной микроскопии сверхвысокого разрешения, где принципиальными факторами яв-

ляются физиологическая клеточная среда, быстрота съемки и минимальная фототоксичность за счет снижения интенсивности возбуждающего света и использования длинноволнового света.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-14-10364).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ettinger A., Wittmann T. // *Methods Cell Biol.* 2014. V. 123. P. 77–94.
- Ishikawa-Ankerhold H.C., Richard A., Drummen G.P.C. // *Molecules.* 2012. V. 17. P. 4047–4132.
- Schermelleh L., Heintzmann R., Leonhardt H. // *J. Cell Biol.* 2010. V. 190. P. 165–175.
- Requejo-Isidro J., Jose R.-I. // *J. Chem. Biol.* 2013. V. 6. P. 97–120.
- Deschout H., CellaZanacchi F., Mlodzianoski M., Diaspro A., Bewersdorf J., Hess S.T., Braeckmans K. // *Nat. Methods.* 2014. V. 11. P. 253–266.
- Galbraith C.G., Galbraith J.A. // *J. Cell Sci.* 2011. V. 124. P. 1607–1611.
- Klementieva N.V., Zagaynova E.V., Lukyanov K.A., Mishin A.S. // *Sovrem. Technol. Med.* 2016. V. 8. P. 130–140. [Клементьева Н.В., Загайнова Е.В., Лукьянов К.А., Мишин А.С. // *Соврем. технол. мед.* 2016. Т. 8. С. 130–140.]
- Betzig E., Patterson G.H., Sougrat R., Lindwasser O.W., Olenych S., Bonifacino J.S., Davidson M.W., Lippincott-Schwartz J., Hess H.F. // *Science.* 2006. V. 313. P. 1642–1645.
- Hess S.T., Girirajan T.P.K., Mason M.D. // *Biophys. J.* 2006. V. 91. P. 4258–4272.
- Rust M.J., Mark B., Xiaowei Z. // *Nat. Methods.* 2006. V. 3. P. 793–796.
- Fölling J., Bossi M., Bock H., Medda R., Wurm C.A., Hein B., Jakobs S., Eggeling C., Hell S.W. // *Nat. Methods.* 2008. V. 5. P. 943–945.
- 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.
- Sharonov A., Hochstrasser R.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006. V. 103. P. 18911–18916.
- Allen J.R., Ross S.T., Davidson M.W. // *J. Opt.* 2013. V. 15. P. 094001.
- Holden S., Seamus H., Daniel S. // *Nat. Photonics.* 2016. V. 10. P. 152–153.
- Chudakov D.M., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // *Biotechniques.* 2007. V. 42. P. 553–557.
- Lukyanov K.A., Chudakov D.M., Lukyanov S., Verkhusha V.V. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2005. V. 6. P. 885–890.
- Hinner M.J., Kai J. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2010. V. 21. P. 766–776.
- Fuchs J., Böhme S., Oswald F., Hedde P.N., Krause M., Wiedenmann J., Nienhaus G.U. // *Nat. Methods.* 2010. V. 7. P. 627–630.
- Mishin A.S., Belousov V.V., Solntsev K.M., Lukyanov K.A. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2015. V. 27. P. 1–9.
- Patterson G.H., Lippincott-Schwartz J. // *Science.* 2002. V. 297. P. 1873–1877.
- Shcherbakova D.M., Sengupta P., Lippincott-Schwartz J., Verkhusha V.V. // *Annu. Rev. Biophys.* 2014. V. 43. P. 303–329.
- Chang Y.W., Chen S., Tocheva E.I., Treuner-Lange A., Löbach S., Søgaard-Andersen L., Jensen G.J. // *Nat. Methods.* 2014. V. 11. P. 737–739.
- Subach F.V., Patterson G.H., Renz M., Lippincott-Schwartz J., Verkhusha V.V. // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. V. 132. P. 6481–6491.
- Lippincott-Schwartz J., Patterson G.H. // *Trends Cell Biol.* 2009. V. 19. P. 555–565.
- Biteen J.S., Goley E.D., Shapiro L., Moerner W.E. // *Chemphyschem.* 2012. V. 13. P. 1007–1012.
- Zhang M., Chang H., Zhang Y., Yu J., Wu L., Ji W., Chen J., Liu B., Lu J., Liu Y., Zhang J., Xu P., Xu T. // *Nat. Methods.* 2012. V. 9. P. 727–729.
- Shroff H., Galbraith C.G., Galbraith J.A., White H., Gillette J., Olenych S., Davidson M.W., Betzig E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007. V. 104. P. 20308–20313.
- Ando R., Mizuno H., Miyawaki A. // *Science.* 2004. V. 306. P. 1370–1373.
- Andresen M., Stiel A.C., Fölling J., Wenzel D., Schönle A., Egner A., Eggeling C., Hell S.W., Jakobs S. // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. P. 1035–1040.
- Stiel A.C., Trowitzsch S., Weber G., Andresen M., Eggeling C., Hell S.W., Jakobs S., Wahl M.C. // *Biochem. J.* 2007. V. 402. P. 35–42.
- Testa I., Urban N.T., Jakobs S., Eggeling C., Willig K.I., Hell S.W. // *Neuron.* 2012. V. 75. P. 992–1000.
- Frost N.A., Shroff H., Kong H., Betzig E., Blanpied T.A. // *Neuron.* 2010. V. 67. P. 86–99.
- Rosenbloom A.B., Lee S.H., To M., Lee A., Shin J.Y., Bustamante C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2014. V. 111. P. 13093–13098.
- Gunewardene M.S., Subach F.V., Gould T.J., Penoncello G.P., Gudheti M.V., Verkhusha V.V., Hess S.T. // *Biophys. J.* 2011. V. 101. P. 1522–1528.
- Wang S., Moffitt J.R., Dempsey G.T., Xie X.S., Zhuang X. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2014. V. 111. P. 8452–8457.
- Lidke K., Rieger B., Jovin T., Heintzmann R. // *Opt. Express.* 2005. V. 13. P. 7052–7062.
- Resch-Genger U., Grabolle M., Cavaliere-Jaricot S., Nitschke R., Nann T. // *Nat. Methods.* 2008. V. 5. P. 763–775.
- Dertinger T., Colyer R., Iyer G., Weiss S., Enderlein J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009. V. 106. P. 22287–22292.
- Dempsey G.T., Vaughan J.C., Chen K.H., Bates M., Zhuang X. // *Nat. Methods.* 2011. V. 8. P. 1027–1036.
- Bates M., Huang B., Zhuang X. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2008. V. 12. P. 505–514.
- Dempsey G.T., Bates M., Kowtoniuk W.E., Liu D.R., Tsien R.Y., Zhuang X. // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131. P. 18192–18193.
- Bates M., Blosser T.R., Zhuang X. // *Phys. Rev. Lett.* 2005. V. 94. P. 108101.
- Beliveau B.J., Boettiger A.N., Avendaño M.S., Jungmann R., McCole R.B., Joyce E.F., Kim-Kiselak C., Bantignies F., Fonseca C.Y., Erceg J., Hannan M.A., Hoang H.G., Colognori D., Lee J.T., Shih W.M., Yin P., Zhuang X., Wu C.T. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 7147.



45. Boettiger A.N., Bintu B., Moffitt J.R., Wang S., Beliveau B.J., Fudenberg G., Imakaev M., Mirny L.A., Wu C.T., Zhuang X. // *Nature*. 2016. V. 529. P. 418–422.
46. Dudok B., Barna L., Ledri M., Szabó S.J., Szabadits E., Pintér B., Woodhams S.G., Henstridge C.M., Balla G.Y., Nyilas R., Varga C., Lee S.H., Matolcsi M., Cervenak J., Kacskovics I., Watanabe M., Sagheddu C., Melis M., Pistis M., Soltesz I., Katona I. // *Nat. Neurosci.* 2015. V. 18. P. 75–86.
47. van de Linde S., Sauer M. // *Chem. Soc. Rev.* 2014. V. 43. P. 1076–1087.
48. Ha T., Tinnefeld P. // *Annu. Rev. Phys. Chem.* 2012. V. 63. P. 595–617.
49. Uno S.N., Kamiya M., Yoshihara T., Sugawara K., Okabe K., Tarhan M.C., Fujita H., Funatsu T., Okada Y., Tobita S., Urano Y. // *Nat. Chem.* 2014. V. 6. P. 681–689.
50. Lee M.K., Rai P., Williams J., Twieg R.J., Moerner W.E. // *J. Am. Chem. Soc.* 2014. V. 136. P. 14003–14006.
51. Grimm J.B., Klein T., Kopek B.G., Shtengel G., Hess H.F., Sauer M., Lavis L.D. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2016. V. 55. P. 1723–1727.
52. Patterson G., Davidson M., Manley S., Lippincott-Schwartz J. // *Annu. Rev. Phys. Chem.* 2010. V. 61. P. 345–367.
53. Uchinomiya S., Ojida A., Hamachi I. // *Inorg. Chem.* 2014. V. 53. P. 1816–1823.
54. Corrêa I.R., Jr. // *Methods Mol. Biol.* 2015. V. 1266. P. 55–79.
55. Crivat G., Taraska J.W. // *Trends Biotechnol.* 2012. V. 30. P. 8–16.
56. Wombacher R., Richard W., Cornish V.W. // *J. Biophotonics*. 2011. V. 4. P. 391–402.
57. Lelek M., Di Nunzio F., Henriques R., Charneau P., Arhel N., Zimmer C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012. V. 109. P. 8564–8569.
58. Barlag B., Beutel O., Janning D., Czarniak F., Richter C.P., Kommnick C., Göser V., Kurre R., Fabiani F., Erhardt M., Piehler J., Hensel M. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 31601.
59. Schoen I., Ries J., Klotzsch E., Ewers H., Vogel V. // *Nano Lett.* 2011. V. 11. P. 4008–4011.
60. Szent-Gyorgyi C., Schmidt B.F., Creeger Y., Fisher G.W., Zakel K.L., Adler S., Fitzpatrick J.A., Woolford C.A., Yan Q., Vasilev K.V., Berget P.B., Bruchez M.P., Jarvik J.W., Waggoner A. // *Nat. Biotechnol.* 2007. V. 26. P. 235–240.
61. Xu J., Chang J., Yan Q., Dertinger T., Bruchez M., Weiss S. // *J. Phys. Chem. Lett.* 2013. V. 4. P. 2138–2146.
62. Yan Q., Schwartz S.L., Maji S., Huang F., Szent-Gyorgyi C., Lidke D.S., Lidke K.A., Bruchez M.P. // *Chemphyschem*. 2014. V. 15. P. 687–695.
63. Yang Z., Sharma A., Qi J., Peng X., Lee D.Y., Hu R., Lin D., Qu J., Kim J.S. // *Chem. Soc. Rev.* 2016.
64. Lukinavičius G., Reymond L., D'Este E., Masharina A., Göttfert F., Ta H., Güther A., Fournier M., Rizzo S., Waldmann H., Blaukopf C., Sommer C., Gerlich D.W., Arndt H.D., Hell S.W., Johnsson K. // *Nat. Methods*. 2014. V. 11. P. 731–733.
65. Lukinavičius G., Blaukopf C., Pershagen E., Schena A., Reymond L., Derivery E., Gonzalez-Gaitan M., D'Este E., Hell S.W., Gerlich D.W., Johnsson K. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 8497.
66. Lukinavičius G., Reymond L., Umezawa K., Sallin O., D'Este E., Göttfert F., Ta H., Hell S.W., Urano Y., Johnsson K. // *J. Am. Chem. Soc.* 2016.
67. Paige J.S., Wu K.Y., Jaffrey S.R. // *Science*. 2011. V. 333. P. 642–646.
68. Povarova N.V., Bozhanova N.G., Sarkisyan K.S., Gritcenko R., Baranov M.S., Yampolsky I.V., Lukyanov K.A., Mishin A.S. // *J. Mater. Chem.* 2016. V. 4. P. 3036–3040.
69. Baldrige A., Feng S., Chang Y.T., Tolbert L.M. // *ACS Comb. Sci.* 2011. V. 13. P. 214–217.
70. Plamont M.A., Billon-Denis E., Maurin S., Gauron C., Pimenta F.M., Specht C.G., Shi J., Quérard J., Pan B., Rossignol J., Moncoq K., Morellet N., Volovitch M., Lescop E., Chen Y., Triller A., Vríz S., Le Saux T., Jullien L., Gautier A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015. V. 113. P. 497–502.

## Fluorophores for Single-Molecule Localization Microscopy

N. V. Klementieva\*.,# , N. G. Bozhanova\*\*, E. V. Zagaynova\*, K. A. Lukyanov\*\*, and A. S. Mishin\*\*

# Phone: +7 (903) 059-84-86; e-mail: nvklementieva@gmail.com

\*Nizhny Novgorod State Medical Academy, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005 Russia

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

Super-resolution fluorescence microscopy allows for obtaining images with resolution of 10–20 nm, far exceeding the diffraction limit of conventional optical microscopy (200–350 nm), and provides an opportunity to study in detail the subcellular structures and individual proteins in both living and fixed cells. Among these methods, single-molecule localization microscopy (SMLM) has become widespread. Such techniques are based on special fluorophores capable of photoswitching. The paper presents a classification of fluorophores and describes their photoswitching mechanisms and successful practical applications. We discuss recent progress and prospects for the development of new effective labels suitable for SMLM.

*Keywords: super-resolution fluorescence microscopy, single-molecule localization microscopy, photoconversion, photoactivatable fluorescent proteins, photoactivatable organic dyes, fluorogenic dyes*