



УДК 577.29

picoFAST – НОВАЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ-КОДИРУЕМАЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ МЕТКА

© 2025 г. Н. С. Балеева*, М. В. Гончарук*, И.А. Иванов*,
М. С. Баранов*, **, Ю. А. Богданова*, **, #

* ФГБУН ГНЦ “Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

** Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,
Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Поступила в редакцию 09.09.2024 г.

После доработки 24.09.2024 г.

Принята к публикации 25.09.2024 г.

Получена новая генетически кодируемая флуоресцентная метка picoFAST, которая содержит всего 88 а.о. и на данный момент выступает наименьшим флуороген-активирующим белком. Показано, что комплекс белка picoFAST с флуорогеном HBR-DOM2 может быть использован в качестве генетически-кодируемой флуоресцентной метки для окрашивания отдельных структур живых клеток.

Ключевые слова: арилиден-азолон, флуороген-активирующие белки, флуорогены, флуоресцентное мечение

DOI: 10.31857/S0132342325020084, **EDN:** LCECNH

ВВЕДЕНИЕ

Уменьшение размера генетически-кодируемых меток, используемых для визуализации экспрессии гетерологичных или модифицированных белков в живых клетках и тканях, – одна из приоритетных задач современных исследований. В первую очередь это необходимо для минимизации влияния метки на функционирование меченого белка. Однако еще более важным уменьшение размера метки становится в тех случаях, когда длина кодирующей последовательности оказывается ограничена способом доставки соответствующей ДНК в клетки, например, при использовании аденоассоциированных вирусов (Adeno-associated viruses, AAV) [1]. AAV крайне привлекательны как способ доставки ДНК, т.к. они обладают низкой иммуногенностью, при конструировании вирусных частиц могут быть использованы различные серотипы белков капсида, которые определяют их специфичность к заражению определенных типов клеток, а

их генетический материал не встраивается в ДНК хозяина [2–4]. Кроме того, AAV относятся к организмам первого уровня биологической безопасности, т.е. они практически безопасны для здорового человека, применяющего в работе с ними минимальные средства защиты [5]. Основное ограничение в использовании AAV – ограниченная емкость вирусного капсида, способного вмещать в себя ~4.7 т.п.н. [6, 7]. Нуклеотидная последовательность, кодирующая классические флуоресцентные белки, состоит из более чем 700 п.н., а масса соответствующей белковой молекулы составляет 27 кДа [8]. Структуры флуоресцентных белков крайне консервативны, поэтому значительное уменьшение их размера не представляется возможным [8]. В связи с этим, а также из-за наличия ряда других недостатков флуоресцентных белков (необходимость кислород для созревания хромофора, которое может быть длительным процессом) в современном научном сообществе очень востребована разра-

Сокращения: AAV – аденоассоциированные вирусы.

Автор для связи: (тел.: тел.: +7 (965) 315-15-19; эл. почта: zashiki.vvarashi@gmail.com).

ботка альтернативных методов генетически-кодируемого флуоресцентного мечения.

Наибольший интерес в данной области разработок привлекают системы флуороген-активирующего мечения. Такие системы состоят из белковой, генетически-кодируемой части (флуороген-активирующий белок) и веществ-флуорогенов, которые становятся флуоресцентными только оказавшись в кармане флуороген-активирующих белков. Флуорогены и флуороген-активирующие белки не формируют ковалентной связи, что приводит к быстрому обмену флуорогена между средой и белковым карманом и, как следствие, к высокой фотоустойчивости за счет возможности обмена фотодеградировавшей молекулы флуорогена на новую из раствора. Наиболее популярный флуороген-активирующий белок – белок FAST – это мутантная форма фото-активного желтого белка (Photoactive yellow protein, PYP) из *Halorhodospira halophila* [9]. Белок FAST связывает вещества-флуорогены из семейства арилиден-азолонов, стабилизируя их в плоской конформации, и тем самым блокирует возможность изомеризации их возбужденных состояний, что приводит к высвобождению поглощенной при облучении светом энергии преимущественно в излучательной форме. Белок FAST кодируется нуклеотидной последовательностью, состоящей из 378 п.н., и имеет молекулярную массу всего 14 кДа, что делает его одной из наименьших генетически-кодируемых флуоресцентных меток. В отличие от флуоресцентных белков, белок FAST не имеет собственного хромофора и не требует стадии созревания, а значит, формирование его флуоресцентного сигнала не зависит от присутствия кислорода. Более того, связывание с флуорогенами происходит намного быстрее, чем созревание классических флуоресцентных белков, – фактически сигнал появляется сразу после добавления флуорогена в среду для визуализации. Цветовая палитра флуорогенов, совместимых с различными вариантами FAST, достаточно широка [10–16]. Более того, этот белок используется в ряде самых разных подходов к мечению, включающих в себя микроскопию визуализации времен жизни флуоресценции (Fluorescence-lifetime imaging microscopy, FLIM) [17, 18] или создание циклических пермутантов [19]. Также недавно круг задач, доступных к решению при

помощи мечения FAST, был расширен благодаря использованию этого белка в методе бимолекулярной флуоресцентной комплементации [20]. Для этой цели белок FAST разделяют на две части (так называемый split-белок), а активация флуоресценции флуорогена при этом происходит только в случае объединения двух частей и формирования полной белковой молекулы.

Недавно коллективом нашей лаборатории был разработан белок nanoFAST [21], имеющий еще меньший размер, чем оригинальный белок FAST, также были предложены его модификации, способные связывать флуорогены различного цвета [22]. В данной работе мы описываем попытку использования белка nanoFAST в методе бимолекулярной флуоресцентной комплементации, которая не увенчалась успехом, однако привела к созданию флуороген-активирующего белка еще меньшего размера. Данный белок содержит всего 88 а.о., он выступает *N*-концевым фрагментом белка nanoFAST и был назван нами picoFAST.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дизайн разделенной формы белка nanoFAST для использования в методе бимолекулярной флуоресцентной комплементации был разработан аналогично существующей форме полно-размерного FAST [20]. Для этого кодирующая последовательность белка была разделена на два фрагмента: *N*-концевой фрагмент nanoFAST с Phe2 (соответствует Phe28 в полноразмерном FAST) по Ser87 (соответствует Ser114) и *C*-концевой пептид, состоящий из 11 заключительных аминокислотных остатков FAST. Полные белковые последовательности обеих частей разделенной формы белка nanoFAST приведены в разделе “Экспериментальная часть”. Белковый препарат *N*-концевого фрагмента nanoFAST был наработан с использованием штамма *Escherichia coli* BL21(DE3), а затем очищен при помощи металл-аффинной хроматографии. *C*-концевой фрагмент CFAST11 был получен от компании Органикум в виде лиофилизированного очищенного пептида.

Далее нами был проведен скрининг активации флуоресценции ряда флуорогенов с помощью двух полученных фрагментов белка, а также белка nanoFAST в качестве контроля. В скрининг были включены три варианта проб: nanoFAST,

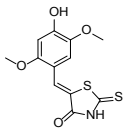
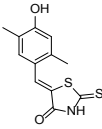
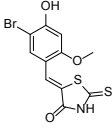
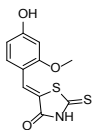
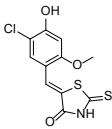
только *N*-концевой фрагмент nanoFAST и смесь *N*-концевого фрагмента nanoFAST и избытка CFAST11. Каждый вариант пробы смешивали с раствором флуорогена в фосфатно-солевом буфере комнатной температуры (pH 7.4), при этом выдерживали избыток белка в соотношении 1 : 10. Интенсивности флуоресценции каждой пробы оценивали при помощи плащечного ридера и сравнивали с интенсивностями флуоресценции растворов флуорогенов той же концентрации без белков. Оценка соотношений проб “белок + флуороген” и “флуороген” позволяла проанализировать степень увеличения флуоресценции флуорогена в присутствии белка (табл. 1).

К нашему удивлению, присутствия в растворе только *N*-концевого фрагмента nanoFAST было достаточно для значительного увеличения интенсивности флуоресценции ряда флуорогенов (табл. 1). Более того, добавление CFAST11 не влияло на степень этого увеличения (табл. 1). Наиболее выраженным этот эффект оказался

для флуорогена HBR-DOM2. Можно предположить, что структура *N*-концевого фрагмента оказывается достаточной для стабилизации флуорогенов в плоской конформации. При этом данная структура также достаточно стабильна, чтобы растворенный в избытке в той же смеси CFAST11 не был способен к встраиванию и восстановлению полноценной структуры nanoFAST.

Таким образом, мы не смогли использовать белок nanoFAST в методе бимолекулярной флуоресцентной комплементации, однако создали новый флуороген-активирующий белок, состоящий из *N*-концевого фрагмента nanoFAST. Полученный белок, для которого мы предложили название picoFAST, – это наименьший из существующих флуороген-активирующих белков, он содержит всего 88 а.о. При помощи сервисов предсказания структур белков Robetta [23] и AlphaFold2 [24], основанных на методах глубинного машинного обучения, мы получили модели предполагаемой структуры picoFAST. Стоит от-

Таблица 1. Результат скрининга флуорогенов с “расщепленными” компонентами белка nanoFAST

Флуороген	Структура	Белок	Увеличение интенсивности флуоресценции			
			430 нм	480 нм	530 нм	580 нм
DOM2		nanoFAST	18.4	154.3	247.7	2.3
		nanoFAST-N-frag	5.4	41.9	101.5	2.4
		nanoFAST-N-frag + P1	5.5	43.5	103.1	2.4
HBR-2,5-DM		nanoFAST	7.8	43.2	10.2	1.4
		nanoFAST-N-frag	4.7	29.1	18.5	1.1
		nanoFAST-N-frag + P1	4.7	29.2	18.1	1.2
SAI365		nanoFAST	15.8	47.6	3.8	1.3
		nanoFAST-N-frag	5.9	21.2	6.6	1.1
		nanoFAST-N-frag + P1	6.0	21.4	6.6	1.1
SAI362		nanoFAST	12.7	42.9	2.4	1.2
		nanoFAST-N-frag	4.0	15.4	3.2	1.0
		nanoFAST-N-frag + P1	4.1	15.6	3.2	1.0
SAI366		nanoFAST	16.5	45.7	3.1	1.2
		nanoFAST-N-frag	6.5	24.4	7.0	1.2
		nanoFAST-N-frag + P1	6.1	19.8	6.4	1.1

Примечание: полужирным шрифтом выделены максимальные значения увеличения интенсивности флуоресценции для каждой пары белок–флуороген.

метить, что оба сервиса характеризуются высокой степенью достоверности предсказываемых ими структур, однако в случае picoFAST полученные структуры отличались (рис. 1). Была предсказана как возможность замыкания β -листов (Robetta, рис. 1б), так и существование белка с недостающим фрагментом с сохранением структуры, близкой к структуре FAST (AlphaFold2, рис 1в).

Затем мы решили проверить, возможно ли использовать полученный нами белок picoFAST для генетически-кодируемого флуоресцентного мечения. Для этого молекулярно-биологическими методами была создана конструкция H2B-TagBFP-picoFAST. Кодированная нуклеотидная последовательность picoFAST была слита с нуклеотидной последовательностью TagBFP, а та – с последовательностью белка-гистона H2B, между последовательностями были добавлены спейсеры, кодирующие глицин-сериновые линкеры.

Экспрессированный гибридный белок локализовался в ядре эукариотических клеток благодаря включению в его состав гистона H2B. Экспрессия TagBFP помогала визуализировать клетки, которые прошли через трансфекцию, до добавления в среду для визуализации флуорогена; спектр возбуждения и эмиссии TagBFP имеет минимальное перекрытие со спектрами связанного с picoFAST флуорогена HBR-DOM2. Мы проэкспрессировали описанную конструкцию в клетках HeLa Kyoto. Добавление в среду флуорогена приводило к развитию флуоресцентного сигнала, совпадающего по своей локализации с сигналом, детектируемым в канале BFP (рис. 2). Это означает, что проэкспрессированный в клетках эукариот picoFAST способен к активации флуоресценции флуорогена и может быть применен в качестве наименьшей из существующих флуороген-активирующих меток. Отметим, что

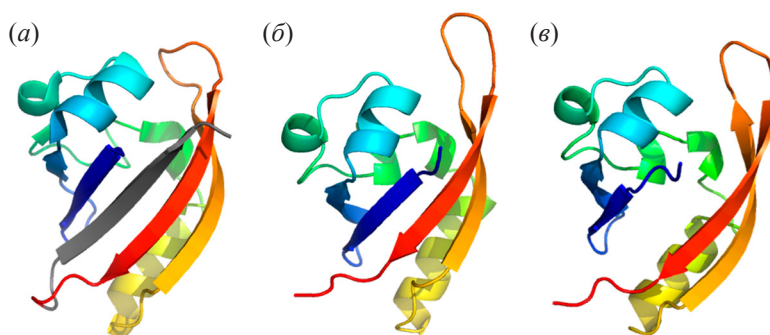


Рис. 1. Моделирование структуры белка picoFAST. (а) – Часть структуры полноразмерного белка FAST (PDB: 7AVA), соответствующая nanoFAST. Серым выделена часть структуры, соответствующая C-концевому пептиду CFAST11. Здесь и далее в цвета радуги (не серым) окрашен N-концевой фрагмент nanoFAST с F2 (соответствует F28 в полноразмерном FAST) по S87 (соответствует S114); данный фрагмент мы называем picoFAST; (б) и (в) – модели структуры picoFAST, полученные при помощи сервисов предсказания структур белков Robetta и AlphaFold2 соответственно.

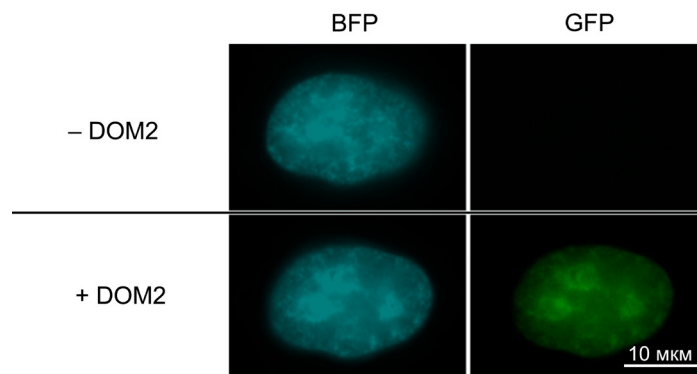


Рис. 2. Микрофотографии живых клеток HeLa Kyoto, экспрессирующих локализующийся в ядре гибридный белок H2B-TagBFP-picoFAST, до и после добавления связывающегося с picoFAST флуорогена HBR-DOM2. Визуализацию проводили в двух каналах: BFP для подтверждения экспрессии H2B-TagBFP-picoFAST и GFP для детектирования разгорания флуорогена после его связывании с picoFAST. Микрофотографии получены на широкопольном флуоресцентном микроскопе BZ-9000 (Keyence, Япония), оснащенного масляным объективом 60 \times PlanApo 1.40 NA (Nikon, США).

использовавшаяся в эксперименте концентрация флуорогена достаточно высока, но мы надеемся на возможность создания улучшенной версии белка picoFAST.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование. Бактериальные клетки наращивали при помощи шейкера-инкубатора New Brunswick Excella E25 (Eppendorf, Германия), клеточную массу осаждали центрифугированием с использованием Heraeus Multifuge 3SR (Thermo Fisher Scientific, США). Соникацию проводили при помощи ультразвукового гомогенизатора Bandelin SONOPULS HD 2200, оснащенного генератором HF GM 2200 и титановым зондом MS 73 (Bandelin, Германия). Скрининг библиотеки веществ осуществляли с помощью планшетного ридера Infinite 200 Pro M Nano (Tecan, Австрия). Микроскопию проводили при помощи инвертированного микроскопа BZ-9000 (Keyence, Япония), оснащенного масляным объективом 60× PlanApo 1.40 NA (Nikon, США). Для поддержания клеточной культуры использовали инкубатор Sanyo MCO-175 (Sanyo, Япония).

Флуорогены. Флуорогены HBR-DOM2, HBR-2,5-DM, SAI365, SAI362 и SAI 366, описанные в данной статье, получены ранее в нашей лаборатории. Эти 2,5-замещенные флуорогены показали высокую эффективность при взаимодействии с белком nanoFAST и его вариантами [22].

Экспрессия гена и наработка белка. Синтез нуклеотидной последовательности, кодирующей N-фрагмент nanoFAST (белок picoFAST), к 3'-концу которой была добавлена последовательность, кодирующая 6 гистидиновых и 3 глициновых остатков, проведен компанией Клонинг Фасилити (Россия). Итоговая нуклеотидная последовательность picoFAST была получена от Клонинг Фасилити заклонированной в экспрессионный вектор pEXPR_002 (аминокислотная последовательность picoFAST, добавленные к ней 6 гистидиновых и 3 глициновых остатка выделены полужирным шрифтом: **MGHHH-HHHGGFGAIQLDGDGNILQYNAAEGDIT-GRDPKQVIGKNFFKDVAPGTDSPFYGKFK-EGVASGNLNTMFEWMIPTSRGPTKVKVHMKKALS**). Нуклеотидная последовательность, кодирующая nanoFAST, была получена нами в экспрессирующем векторе pEXPR_002 ранее [21].

Наработку белков проводили с использованием штамма *E. coli* BL21(DE3) в среде M9. Клетки наращивали при 37°C и 250 об/мин до достижения OD₆₀₀ 0.6. Экспрессию белков индуцировали изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом (IPTG) (Helicon, Россия) в конечной концентрации 0.3 mM и продолжали культивирование клеток в течение 4–5 ч, после чего клетки осаждали, полученный осадок подвергали соникации на льду. Целевые белки очищали при помощи металл-аффинной хроматографии, после чего диализовали через мембрану с отсечкой по молекулярной массе в 3.5 кДа против фосфатно-солевого буфера при комнатной температуре. Полученные препараты белка хранили при 4°C.

C-концевой фрагмент белка nanoFAST (CFAST11, последовательность GDSYWVFVKRV) был получен от компании Органикум (Россия) в виде лиофилизированного очищенного пептида.

Скрининг *in vitro*. Эффективность связывания флуорогенов с белком picoFAST (N-фрагментом nanoFAST) проверяли с использованием растворов, содержащих 1 мкМ флуорогена и 10 мкМ белка, измерения проводили в фосфатном буфере (pH 7.4, Amresco, США). Для расчета усиления флуоресценции при связывании флуорогена с белком использовали отношение интегральной интенсивности флуоресценции смеси флуорогена и белка к аналогичной интенсивности флуоресценции раствора свободного флуорогена на приборе Infinite 200 Pro M Nano (Tecan, Австрия) в планшетном формате. Все пробы возбуждали светом четырех длин волн (430, 480, 530 и 580 соответственно).

Модели структур picoFAST. Для получения модели picoFAST его аминокислотная последовательность была загружена на сервер Robetta (<https://robetta.bakerlab.org/>), в моделировании использовали метод RoseTTAFold. Вторая модель структуры picoFAST была получена при помощи AlphaFold Colab (<https://colab.research.google.com/github/deepmind/alphafold/blob/main/notebooks/AlphaFold.ipynb>) с использованием AlphaFold v2.3.2; сервису также была предоставлена первичная структура picoFAST. Модели были получены в форме PDB-файлов, которые далее были визуализированы и проанализированы при помощи программы PyMOL 2.5.7 (<https://www.pymol.org/>).

ДНК-конструкции для экспрессии в клетках эукариот. Нуклеотидная последовательность, кодирующая белок picoFAST (*N*-фрагмент белка nanoFAST), была синтезирована фирмой Клонинг фасилити (Россия) и заклонирована в плазмиду Level 0 для дальнейшей сборки ДНК-конструкций при помощи метода MoClo [25, 26]. Согласно синтаксису этого метода, входящего в семейство методов клонирования Golden Gate, была собрана конструкция H2B-TagBFP-picoFAST, кодирующая слитые последовательности белка-гистона человека H2B (UniProt ID: P06899), флуоресцентного маркера TagBFP (FPbase ID: BFJKS) и picoFAST (*N*-фрагмента nanoFAST), разделенные короткими глицин-сериновыми спейсерами. Итоговая конструкция экспрессировалась под управлением CMV-промотора и SV40 poly(A). Клонирование осуществляли при помощи эндонуклеазы рестрикции Eco31I (BsaI) (Thermo Scientific, США) и T4 ДНК-лигазы (Евроген, Россия). Правильность полученных конструкций была подтверждена секвенированием по Сэнгеру (Евроген, Россия).

Поддержание и трансфекция клеточной культуры HeLa Kyoto. Клеточная культура раковой опухоли шейки матки человека HeLa Kyoto была получена из коллекции клеточных линий отдела биофотоники ИБХ РАН. Клетки культивировали в течение недели после размораживания в среде RPMI 1640 (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки (ПанЭко, Россия) и смеси антибиотиков пенициллина (50 ед./мл) и стрептомицина (50 мкг/мл) (ПанЭко, Россия) при 37°C и 5% CO₂ в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония). Для проведения микроскопии клетки высевали на 35-мм конфокальные чашки со стеклянным дном (SPL Life Sciences, Корея). Растущие на чашках клетки трансфицировали при помощи полиэтиленимина, PEI (Polysciences, США). За 1 ч до начала трансфекции культуральную среду заменяли на 500 мкл бессывороточной среды Opti-MEM (ПанЭко, Россия). Далее отдельно смешивали 250 мкл Opti-MEM с 3 мкл PEI и 250 мкл Opti-MEM с 1 мкг плазмидной ДНК, инкубировали 5 мин. Раствор, содержащий PEI, и раствор, содержащий плазмидную ДНК, смешивали и инкубировали 20 мин, после чего по каплям добавляли в чашки с растущими клетками и инкубировали 4 ч. По окончании инкубации среду заменяли на свежую RPMI 1640 с сывороткой и антибиотиками.

Флуоресцентная микроскопия живых клеток. Микроскопию проводили при помощи инвертированного микроскопа BZ-9000 (Keyence, Япония), оснащенного масляным объективом 60× PlanApo 1.40 NA (Nikon, США) и кубом ET-EBFP2/Coumarin/Attenuated DAPI, длины волн возбуждающего света 405/20, фильтр 425, длины волн детектируемого света 460/50, и GFP-B, длины волн возбуждающего света 470/40, фильтр 495, длины волн детектируемого света 535/50. Для этого на следующий день после трансфекции культуральную среду заменяли на 1 мл раствора Хэнкса (ПанЭко, Россия) с добавлением 20 mM HEPES (Sigma, Германия), получали микрофотографии клеток в каналах BFP и GFP, после чего добавляли 1 мл раствора Хэнкса с 20 mM HEPES и 40 мкМ HBR-DOM2, разведенного из 10 mM стока в DMSO (Sigma-Aldrich, США). Получали микрофотографии клеток в каналах BFP и GFP при конечной концентрации HBR-DOM2 20 мкМ. Микрофотографии обрабатывали при помощи программы Fiji (<https://fiji.sc/>), в которой с помощью плагина “background subtraction from ROI” из изображения вычитали фоновые значения интенсивности флуоресценции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получен новый флуороген-активирующий белок picoFAST (88 а.о.), на данный момент являющийся наименьшим флуороген-активирующим белком. Показано, что комплекс белка picoFAST с флуорогеном HBR-DOM2 может быть использован в качестве генетически-кодируемой флуоресцентной метки для окрашивания отдельных структур живых клеток.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 24-74-00013).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Н.С. Балеева, М.В. Гончарук, И.А. Иванов и Ю.А. Богданова участвовали в проведении экспериментов; Н.С. Балеева и Ю.А. Богданова подготовили иллюстративные материалы; М.С. Баранов и Ю.А. Богданова подготовили текст статьи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dong J.Y., Fan P.D., Frizzell R.A. // Hum. Gene. Ther. 1996. V. 7. P. 2101–2112.
<https://doi.org/10.1089/hum.1996.7.17-2101>
2. Nakai H., Yant S.R., Storm T.A., Fuess S., Meuse L., Kay M.A. // J. Virol. 2001. V. 75. P. 6969–6976.
<https://doi.org/10.1128/JVI.75.15.6969-6976.2001>
3. Srivastava A. // Curr. Opin. Virol. 2016. V. 21. P. 75–80.
<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.08.003>
4. Rogers G.L., Martino A.T., Aslanidi G.V., Jayandharan G.R., Srivastava A., Herzog R.W. // Front. Microbiol. 2011. V. 2. P. 194.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00194>
5. Collins D.E., Reuter J.D., Rush H.G., Villano J.S. // Comp. Med. 2017. V. 67. P. 215–221.
6. Rose J.A., Berns K.I., Hoggan M.D., Koczot F.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1969. V. 64. P. 863–869.
<https://doi.org/10.1073/pnas.64.3.863>
7. Srivastava A., Lusby E.W., Berns K.I. // J. Virol. 1983. V. 45. P. 555–564.
<https://doi.org/10.1128/jvi.45.2.555-564.1983>
8. Ormö M., Cubitt A.B., Kallio K., Gross L.A., Tsien R.Y., Remington S.J. // Science. 1996. V. 273. P. 1392–1395.
<https://doi.org/10.1126/science.273.5280.1392>
9. 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. USA. 2016. V. 113. P. 497–502.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1513094113>
10. Povarova N.V., Zaitseva S.O., Baleeva N.S., Smirnov A.Y., Myasnyanko I.N., Zagudaylova M.B., Bozhanova N.G., Gorbachev D.A., Malyshevskaya K.K., Gavrikov A.S., Mishin A.S., Baranov M.S. // Chemistry. 2019. V. 25. P. 9592–9596.
<https://doi.org/10.1002/chem.201901151>
11. Myasnyanko I.N., Gavrikov A.S., Zaitseva S.O., Smirnov A.Y., Zaitseva E.R., Sokolov A.I., Malyshevskaya K.K., Baleeva N.S., Mishin A.S., Baranov M.S. // Chemistry. 2021. V. 27. P. 3986–3990.
<https://doi.org/10.1002/chem.202004760>
12. Li C., Tebo A.G., Thauvin M., Plamont M.-A., Volovitch M., Morin X., Vríz S., Gautier A. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2020. V. 59. P. 17917–17923.
<https://doi.org/10.1002/anie.202006576>
13. Chen C., Tachibana S.R., Baleeva N.S., Myasnyanko I.N., Bogdanov A.M., Gavrikov A.S., Mishin A.S., Malyshevskaya K.K., Baranov M.S., Fang C. // Chemistry. 2021. V. 27. P. 8946–8950.
<https://doi.org/10.1002/chem.202101250>
14. Benaissa H., Ounoughi K., Aujard I., Fischer E., Goïame R., Nguyen J., Tebo A.G., Li C., Le Saux T., Bertolin G., Tramier M., Danglot L., Pietrancosta N., Morin X., Jullien L., Gautier A. // Nat. Commun. 2021. V. 12. P. 6989.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-27334-0>
15. Emanuel G., Moffitt J.R., Zhuang X. // Nat. Methods. 2017. V. 14. P. 1159–1162.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.4495>
16. Tebo A.G., Moeyaert B., Thauvin M., Carlon-Andres I., Böken D., Volovitch M., Padilla-Parra S., Dedecker P., Vríz S., Gautier A. // Nat. Chem. Biol. 2021. V. 17. P. 30–38.
<https://doi.org/10.1038/s41589-020-0611-0>
17. Bogdanova Y.A., Solovyev I.D., Baleeva N.S., Myasnyanko I.N., Gorshkova A.A., Gorbachev D.A., Gilvanov A.R., Goncharuk S.A., Goncharuk M.V., Mineev K.S., Arseniev A.S., Bogdanov A.M., Savitsky A.P., Baranov M.S. // Commun. Biol. 2024. V. 7. P. 799.
<https://doi.org/10.1038/s42003-024-06501-1>
18. El Hajji L., Lam F., Avtodeeva M., Benaissa H., Rampon C., Volovitch M., Vríz S., Gautier A. // Adv. Sci. (Weinh). 2024. V. 11. P. e2404354.
<https://doi.org/10.1002/advs.202404354>

19. Tebo A.G., Pimenta F.M., Zoumpoulaki M., Kikuti C., Sirkia H., Plamont M.-A., Houdusse A., Gautier A. // ACS Chem. Biol. 2018. V. 13. P. 2392–2397. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00417>
20. Tebo A.G., Gautier A. // Nat. Commun. 2019. V. 10. P. 2822. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10855-0>
21. Mineev K.S., Goncharuk S.A., Goncharuk M.V., Pova-rova N.V., Sokolov A.I., Baleeva N.S., Smirnov A.Y., Myasnyanko I.N., Ruchkin D.A., Bukhdruker S., Remeeva A., Mishin A., Borshchevskiy V., Goredeliy V., Arseniev A.S., Gorbachev D.A., Gavri-kov A.S., Mishin A.S., Baranov M.S. // Chem. Sci. 2021. V. 12. P. 6719–6725. <https://doi.org/10.1039/d1sc01454d>
22. Baleeva N.S., Bogdanova Y.A., Goncharuk M.V., So-kolov A.I., Myasnyanko I.N., Kublitski V.S., Smir-nov A.Y., Gilvanov A.R., Goncharuk S.A., Mine-ev K.S., Baranov M.S. // Int. J. Mol. Sci. 2024. V. 25. P. 3054. <https://doi.org/10.3390/ijms25053054>
23. Baek M., DiMaio F., Anishchenko I., Dauparas J., Ovchinnikov S., Lee G.R., Wang J., Cong Q., Kin-ch L.N., Schaeffer R.D., Millán C., Park H., Adams C., Glassman C.R., DeGiovanni A., Pereira J.H., Rod-rigues A.V., van Dijk A.A., Ebrecht A.C., Opperman D.J., Sagmeister T., Buhlheller C., Pavkov-Keller T., Rathinaswamy M.K., Dalwadi U., Yip C.K., Burke J.E., Garcia K.C., Grishin N.V., Adams P.D., Read R.J., Baker D. // Science. 2021. V. 373. P. 871–876. <https://doi.org/10.1126/science.abj8754>
24. Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., Tunyasuvunakool K., Bates R., Ží-dek A., Potapenko A., Bridgland A., Meyer C., Kohl S.A.A., Ballard A.J., Cowie A., Romera-Paredes B., Nikolov S., Jain R., Adler J., Back T., Petersen S., Reiman D., Clancy E., Zielinski M., Steinegger M., Pacholska M., Berghammer T., Bodenstein S., Silver D., Vinyals O., Senior A.W., Kavukcuoglu K., Kohli P., Hassabis D. // Nature. 2021. V. 596. P. 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
25. Engler C., Kandzia R., Marillonnet S. // PLoS One. 2008. V. 3. P. e3647. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003647>
26. Weber E., Engler C., Gruetzner R., Werner S., Maril-lonnet S. // PLoS One. 2011. V. 6. P. e16765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016765>

picoFAST: New Genetically-Encoded Fluorescent Label

**N. S. Baleeva*, M. V. Goncharuk *, I. A. Ivanov*,
M. S. Baranov*, **, and Yu. A. Bogdanova*, ****

Phone: +7 (964) 865-16-24; e-mail: svetlanakr2002@mail.ru

* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

** Pirogov Russian National Research Medical University,
ul. Ostrovitianova 1, Moscow, 117997 Russia

A new genetically encoded fluorescent tag picoFAST has been proposed, which contains only 88 amino acids and is currently the smallest fluorogen-activating protein. It was shown that the picoFAST protein in complex with HBR-DOM2 fluorogen can be used as a genetically encoded fluorescent label for staining individual structures of living cells.

Keywords: arylidene-azolones, fluorogen-activating proteins, fluorogens, fluorescent labelling