

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИЙ НУКЛЕОСОМ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Обзор

© 2024 А.А. Украинцев^{1#}, М.М. Кутузов^{1#}, О.И. Лаврик^{1,2*}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: lavrik@niboch.nsc.ru

² Новосибирский государственный университет, 630090 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 14.10.2023

После доработки 19.02.2024

Принята к публикации 22.02.2024

Хроматин является эпигенетической платформой для реализации ДНК-зависимых процессов. Нуклеосома, как базовый уровень компактизации хроматина, во многом определяет его свойства и структуру. При изучении структуры и функций нуклеосом активно применяются физико-химические инструменты, такие как магнитный и оптический «пинцеты», «ДНК-шторы», ядерный магнитный резонанс, рентгеноструктурный анализ и криоэлектронная микроскопия, а также оптические методы, основанные на резонансном переносе энергии Ферстера. Несмотря на то что эти подходы позволяют определять широкий спектр структурно-функциональных характеристик хроматина и нуклеосом с высоким пространственным и временным разрешением, атомно-силовая микроскопия (АСМ) дополняет возможности перечисленных методов. В данном обзоре представлены результаты структурных исследований нуклеосом в свете развития метода АСМ. Возможности АСМ рассмотрены в контексте применения других физико-химических подходов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нуклеосома, АСМ, хроматин, одномолекулярные методы исследования биомолекул.

DOI: 10.31857/S0320972524040078 EDN: ZFKWWH

ВВЕДЕНИЕ

Молекулы ДНК используются клетками для хранения и реализации генетической информации. В клетках эукариот ДНК преимущественно находится в составе хроматина, при этом важное значение имеет как степень компактизации хроматина, так и его пространственная укладка [1]. Базовым уровнем компактизации ДНК является нуклеосома – комплекс, состоящий из восьми гистонов и 147 п.н. ДНК, структура которого во многом определяет свойства хроматина. Первые

представления о структуре нуклеосомы были сформулированы в середине 70-х гг. XX века [2–4]. Схематичное представление нуклеосомы приведено на рис. 1.

К настоящему времени достаточно детально изучены основные характеристики состава и структуры нуклеосомы, а также ее молекулярная динамика. Во многом эти знания были получены с использованием современных физико-химических методов исследования, включая одномолекулярные инструменты, такие как оптический и магнитный пинцеты, «ДНК-шторы» (DNA curtains),

Принятые сокращения: АСМ – атомно-силовая микроскопия; криоЭМ – криоэлектронная микроскопия; РСА – рентгеноструктурный анализ; contact mode AFM – контактный режим атомно-силовой микроскопии; DREEM – электростатическая силовая микроскопия с усилением частоты двойного резонанса; FRET – резонансный перенос энергии Ферстера; HS-AFM – высокоскоростная атомно-силовая микроскопия; PARP – поли(ADP-рибоза) полимеразы; ssNCP – нуклеосома с одноцепочечной ДНК; tapping mode AFM – полуконтактный режим атомно-силовой микроскопии.

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

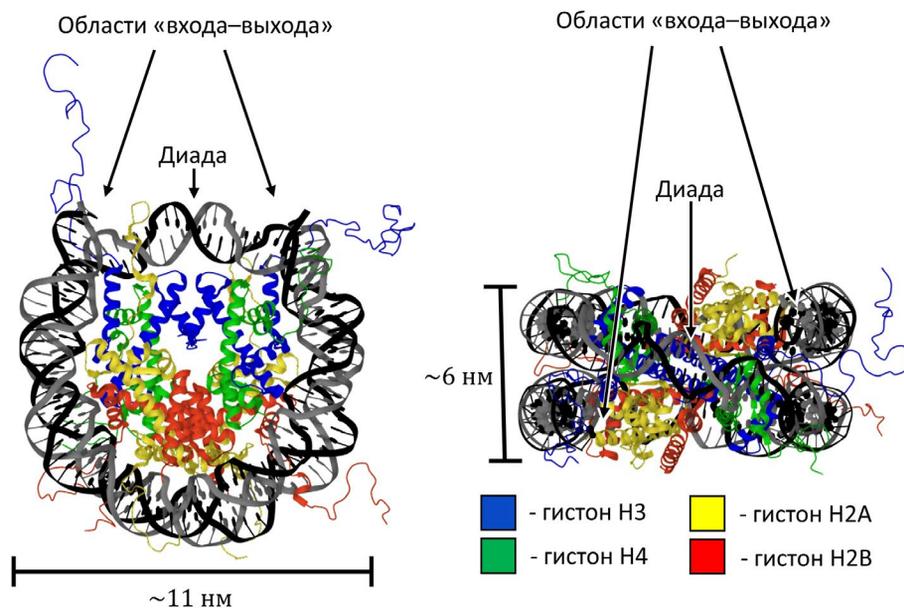


Рис. 1. Структура нуклеосомной частицы (PDB ID: 1KX5). Приведена пространственная структура нуклеосомы в виде ленточной диаграммы в двух проекциях

оптический подход, основанный на резонансном переносе энергии Ферстера (FRET) и др. [5–7]. Эти методы позволяют измерять широкий спектр параметров поведения биомолекул и их комплексов, в том числе хроматина и нуклеосом с высоким пространственным и временным разрешением.

Наряду с перечисленными методами, активно применяется метод атомно-силовой микроскопии (АСМ). В основе АСМ лежит детекция взаимодействия зонда с поверхностью. Зонд в виде иглы на конце кантилевера сканирует образец. Для детекции изменения вертикальной координаты зонда используется лазер, направленный на кантилевер, и фотодетектор, регистрирующий отраженный луч. При вертикальном смещении зонда отраженный от кантилевера луч смещается. По сигналу от фотодетектора можно судить о силе взаимодействия кантилевера с поверхностью. Далее, в зависимости от режима сканирования эти данные явным образом или опосредованно через систему обратной связи позволяют получить информацию о вертикальной координате поверхности образца. К настоящему моменту существует большое разнообразие режимов сканирования и вариантов реализации сканирования.

КОНТАКТНЫЙ РЕЖИМ АСМ

Первые изображения нуклеосом были получены с использованием контактного режима сканирования (contact mode AFM), при котором фиксируется сила отталкивания зонд–поверхность, регулируемая контуром обратной связи [8, 9]

(рис. 2, а). Авторам этих работ удалось показать полинуклеосомную структуру в виде «бусин на нитке» [8, 9]. Кроме того, были определены основные геометрические параметры нуклеосомного диска – его высота и диаметр, которые без учета радиуса кривизны зонда составили ~3 и ~32 нм соответственно [9], а также количество витков суперспирали ДНК в составе нуклеосомы [9].

Контактный режим характеризуется относительно большим механическим воздействием кантилевера на поверхность, что приводит к сильной деформации и повреждению образцов нуклеосом во время сканирования. Кроме того, такой «жесткий» режим сканирования требует применения зондов с радиусом кривизны не менее 10 нм, что снижает чувствительность и точность режима в целом. Как следствие, первые изображения нуклеосом, полученные методом АСМ в контактном режиме, характеризуются невысоким качеством, что в значительной степени ограничило применение этого метода при изучении их структуры.

ПОЛУКОНТАКТНЫЙ РЕЖИМ АСМ

Появление полуконтактного режима сканирования АСМ (tapping mode AFM) позволило значительно уменьшить деформации образца во время сканирования, что позволило использовать более острые зонды. В этом режиме кантилевер колеблется на своей резонансной частоте. Контур обратной связи фиксирует изменения в параметрах колебаний кантилевера и корректирует положение зонда относительно поверхности, обеспечивая

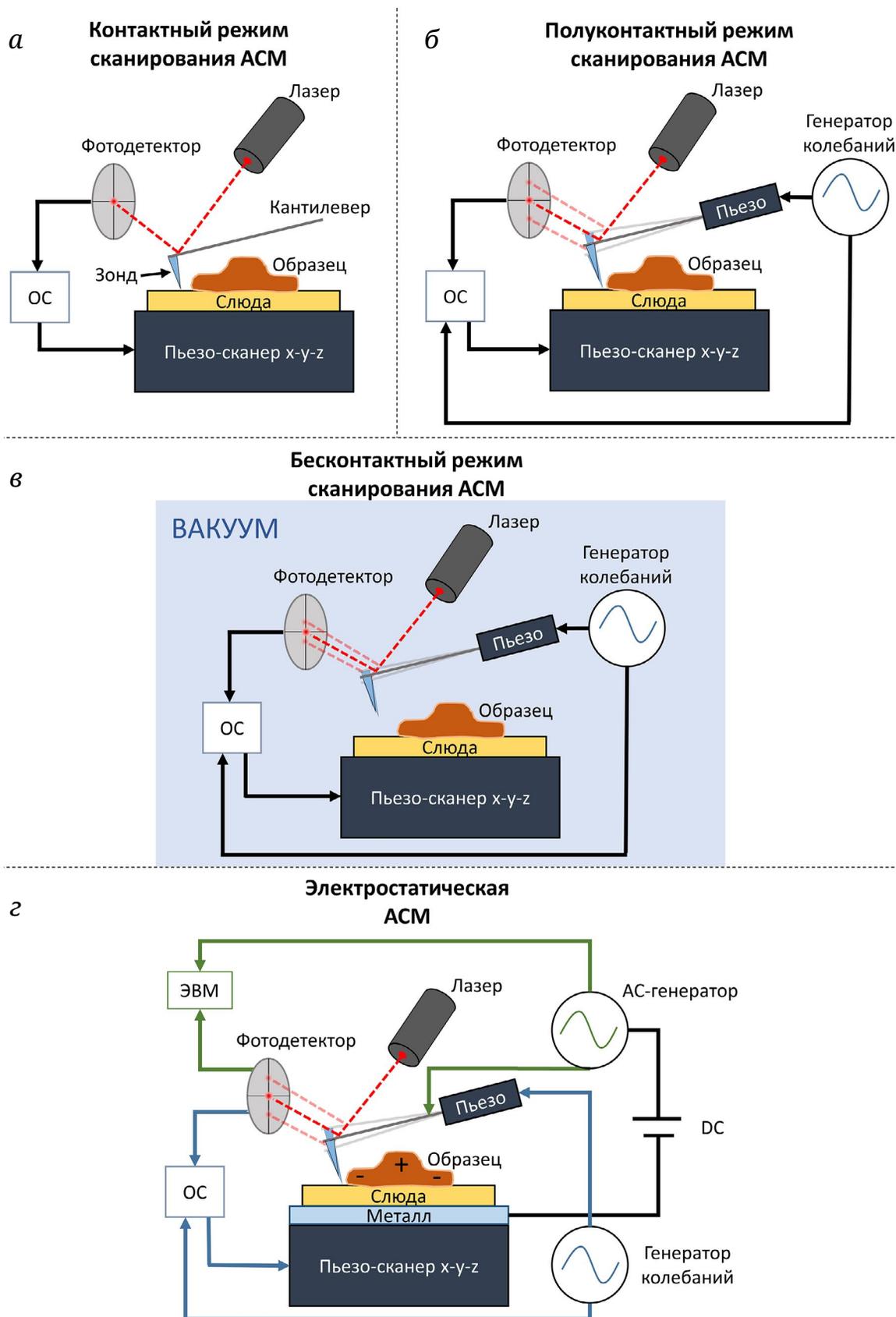


Рис. 2. Схематичное изображение режимов сканирования АСМ на примере прибора с нижним расположением пьезо-сканера. *а* – Контактный режим сканирования; *б* – полуконтактный режим сканирования; *в* – бесконтактный режим сканирования; *г* – электростатическая АСМ. ОС – обратная связь; ЭВМ – электронная вычислительная машина; АС – переменный электрический ток; DC – постоянный электрический ток

положение равновесия, около которого кантилевер совершает гармонические колебания (рис. 2, б). Такие изменения драматически повысили разрешающую способность АСМ при работе с биологическими молекулами. Так, Martin et al. [10] продемонстрировали преимущества этого режима сканирования по сравнению с контактным режимом при изучении структуры хроматина. В своей работе авторам удалось более точно определить размеры нуклеосомы в полуконтактном режиме, чем в контактном. При сканировании в полуконтактном режиме АСМ высота и диаметр нуклеосомного диска составили $4,3 \pm 1,2$ нм и $23,2 \pm 4,5$ нм соответственно, что с учетом радиуса кривизны зонда приближается к значениям, полученным методом рентгеноструктурного анализа (РСА) [11]. Кроме того, с использованием такого подхода удалось визуализировать ДНК в линкерной области хроматина, что было невозможно при сканировании в контактном режиме, а также экспериментально подтвердить структуру нуклеосомы, рассчитанную при помощи математического моделирования [12].

В работе Qian et al. [13] применение АСМ в полуконтактном режиме при исследовании хроматина из эритроцитов домашних кур позволило визуализировать разные уровни компактизации ДНК. Были получены изображения как отдельных «бусин» нуклеосом на нити ДНК, так и их скопления. Наличие участков с различной плотностью упаковки ДНК позволило авторам предположить роль компактизации в регуляции экспрессии генов. В этой работе были определены геометрические характеристики фибрилл, диаметр которых составил 15–60 нм, подтвердившие соленоидную модель упаковки нуклеосом. Кроме того, впервые было показано, что фибриллы низшей степени компактизации (~30 нм) в дальнейшем сворачиваются с формированием структур хроматина более высокого порядка (~60 нм), которые, в свою очередь, складываются в еще более высокоорганизованные хроматиновые структуры (~90–110 нм и более).

С появлением нуклеосом-позиционирующих последовательностей ДНК [14], характеризующихся однозначным расположением нуклеосомного кора на молекуле ДНК и высокой прочностью формируемых комплексов, стало возможным создание модельных структур с прогнозируемым расположением нуклеосом. Использование таких нуклеосом-позиционирующих последовательностей ДНК позволило показать стохастичность расположения нуклеосом в природном хроматине на примере теломерных участков. Эти результаты подтвердили соответствующую теоретическую модель позиционирования нуклеосом [15].

АСМ активно применяется для изучения влияния различных вариантов гистонов, их пост-

трансляционных модификаций и эпигенетических модификаций ДНК на структуру нуклеосом. Модификации хвостов гистонов являются ключевым фактором в регуляции динамики хроматина и клеточного гомеостаза. Отличительной чертой активного хроматина является гиперацетилирование гистонов, что, по-видимому, приводит к более открытой структуре хроматина. В работе Hizume et al. [16] методом АСМ с использованием фибрилл хроматина из клеток HeLa было обнаружено, что гиперацетилирование гистонов приводит к уменьшению толщины хроматиновых фибрилл. Этот результат позволил подтвердить модель деконденсации хроматина, основанную на электростатических взаимодействиях. Биотинилирование, напротив, способствует конденсации хроматина. В работах Filenko et al. [17] и Singh et al. [18] использование АСМ позволило продемонстрировать, что биотинилирование гистона H4 по лизинам 12 или 16 приводит к уплотнению структуры нуклеосомы, выраженному в увеличении количества оборотов ДНК вокруг гистонового октамера.

Замена гистонов вариантами, а также перемещение нуклеосом по молекуле ДНК – базовые механизмы регуляции компактизации хроматина, которые, как правило, обусловлены работой белков-ремоделеров. RSC – АТФ-зависимый белковый комплекс ремоделеров структуры хроматина, гомологичный человеческому SWI/SNF, осуществляющий сдвиг нуклеосомы. Некоторые детали его работы были показаны с использованием полуконтактного режима АСМ. В частности, оказалось, что RSC перемещает нуклеосому по ДНК до тех пор, пока не будет встречена другая нуклеосома или не встретится обрыв цепи ДНК [19].

Сравнительный анализ работ по изучению структуры нуклеосомного комплекса с вариантом гистона H3 (CENP-A), выполненных с использованием АСМ, позволил предложить альтернативную модель укладки ДНК в центромерной области хромосом. Эта модель предполагает укладку ДНК в центромерной области в виде массива параллельных участков в форме «змейки» вместо характерной для канонических нуклеосом зигзагообразной укладки [20]. При изучении особенностей структуры нуклеосом с заменой корового гистона H2A на его недавно открытый вариант мышинового гистона H2AL2, экспрессия которого ассоциирована со сперматогенезом, методом АСМ было показано, что длина ДНК в составе нуклеосомы уменьшается с 147 до 130 п.н. [21]. Укорочение ДНК, находящейся в составе нуклеосомы, обусловлено релаксацией ее структуры посредством частичного разворачивания. В этой же работе с использованием криоэлектронной микроскопии (криоЭМ) дополнительно показано, что нуклеосомы с H2AL2

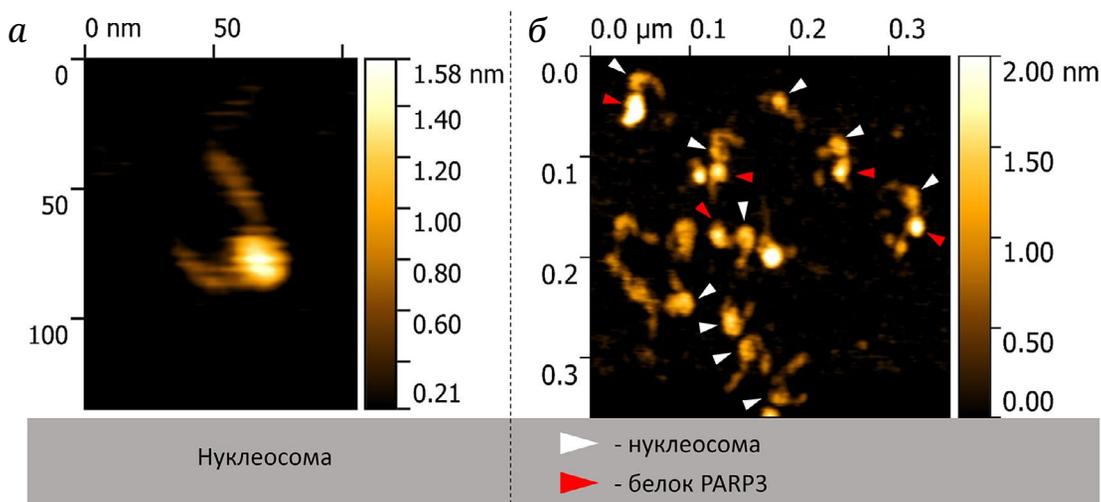


Рис. 3. Изображения, полученные в полуконтактном режиме АСМ. *а* – Нуклеосома; *б* – нуклеосомы с белком PARP3

характеризуются более релаксированной структурой с большим значением угла между линкерными областями ДНК, что согласуется с данными, полученными методом АСМ. Привлекает внимание тот факт, что нуклеосома при этом становится устойчивой к действию белков-ремоделеров, таких как RSC и SWI/SNF. Биологическое значение такой модуляции свойств нуклеосомы остается предметом исследований.

Структура нуклеосомы может модулироваться связыванием белка или белкового комплекса. Одним из наиболее наглядных примеров может служить работа, в которой исследовано влияние линкерного гистона H1 на компактизацию нуклеосомы. С использованием возможностей АСМ было показано, что H1 не оказывает влияния на степень компактизации нуклеосом, однако в значительной степени стабилизирует ее, уменьшая флуктуации структуры [22]. В нашей работе, посвященной изучению влияния ядерных белков поли(ADP-рибоза)полимераз 1, 2, и 3 (PARP1, PARP2 и PARP3) на степень компактизации нуклеосом, методом АСМ было обнаружено, что PARP3 способствует уплотнению структуры мононуклеосом [23] (рис. 3, *а* и *б*). PARP1, PARP2 и PARP3 являются участниками большинства ДНК-зависимых процессов, включая регуляцию транскрипции и репарации. При этом в ответ на повреждение геномной ДНК они катализируют реакцию переноса остатков ADP-рибозы на белки-мишени, используя в качестве субстрата NAD⁺. PARP3 катализирует реакцию моно(ADP-рибозил)ирования, в то время как PARP1 и PARP2 катализируют синтез полимера ADP-рибозы. Кроме того, в отличие от PARP1 и PARP2, PARP3 не взаимодействует с фактором ADP-рибозилирования гистонов HRF1 [24]. С использованием АСМ нам удалось установить ранее неизвестную осо-

бенность функционирования PARP3, а именно ее влияние на структуру нуклеосом, что может говорить о роли этого белка в регуляции структуры хроматина. В данной работе каталитическая реакция ДНК-зависимых белков ARTD на нуклеосомах не исследовалась, но в других работах наблюдали синтез полимера ADP-рибозы, катализируемый белками PARP1 и PARP2 на протяженных ДНК-субстратах методом АСМ [25, 26], что говорит о возможности аналогичных исследований в случае нуклеосом.

БЕСКОНТАКТНЫЙ РЕЖИМ АСМ

Еще одной модификацией метода АСМ является бесконтактный режим сканирования (non contact mode AFM). В его основе лежит детекция изменения сил притяжения, обусловленных взаимодействиями Ван-дер-Ваальса, между зондом и поверхностью, что позволяет проводить сканирование без необходимости непосредственного контакта кантилевера с образцом. При реализации этого режима кантилевер колеблется с низкой амплитудой на частоте, превышающей его резонансную частоту, что приводит к увеличению чувствительности по сравнению с АСМ в полуконтактном режиме. Сканирование нуклеосом в этом режиме позволило получить изображение с разрешением, на момент опубликования работы, превышавшим даже возможности криоЭМ [27]. Тем не менее, несмотря на впечатляющее преимущество, этот режим сканирования не получил широкого распространения в силу технических ограничений. Например, в упомянутой работе Davies et al. [27] сканирование проводили в условиях глубокого вакуума. Следует отметить, что анализ биомолекул

и их комплексов предпочтительнее проводить в растворе для облегчения интерпретации результатов, что несовместимо с работой в вакууме. Кроме того, условия вакуума ограничивают изучение динамики исследуемых комплексов.

С учетом ограничений, возникающих при реализации бесконтактного режима и низкого качества изображений, которые могут быть получены в контактном режиме, на сегодняшний день наибольшее распространение при изучении биомолекул получил полуконтактный режим сканирования АСМ. Более того, на полуконтактном режиме сканирования основаны такие варианты АСМ, как МАС-режим, PeakForce-режим, высокоскоростной режим, а также электростатическая АСМ.

МАС-РЕЖИМ АСМ

Альтернативой классическому полуконтактному режиму является МАС-режим (magnetic alternating current mode AFM), принцип работы которого основан на возбуждении колебаний кантилевера магнитным полем катушки, расположенной под образцом [28]. Использование МАС-режима обеспечивает меньшее силовое воздействие на образец, по сравнению с классическим полуконтактным режимом АСМ, что способствует сохранению остроты зонда и повышает качество получаемого изображения. Например, именно с использованием этого режима сканирования было показано, что метилирование азотистого основания С в CpG-последовательностях приводит к более плотной упаковке хроматина в присутствии линкерного гистона H1 [29]. Эти результаты позволили предложить механизм регуляции транскрипции в крупных доменах хроматина за счет метилирования.

Развитием этого режима сканирования стала модификация кантилевера аффинным агентом, например антителом, что позволило совместить топографическое изучение поверхности и молекулярное распознавание объектов в реальном времени (PicoTREC AFM) [30, 31]. При соприкосновении зонда с образцом регистрируется рельеф поверхности, а по изменению амплитуды колебаний кантилевера можно зарегистрировать наличие антигена в точке сканирования. Применение такого подхода позволило [32, 33] продемонстрировать механизм действия ремоделера хроматина SWI/SNF. В частности, было показано, что SWI/SNF способствует удалению гистона H2A из состава нуклеосомы, что приводит к релаксации структуры нуклеосомы и сопровождается высвобождением ~80 п.н. ДНК. Эти результаты позволили охарактеризовать изменения геометрических параметров нуклеосомы при удалении гистона H2A, хотя ранее методами иммунопреципитации, количественной ПЦР и гель-

электрофореза уже были получены данные, указывающие на то, что под действием ремоделера хроматина SWI/SNF происходит удаление гистонов H2A/H2B из нуклеосомы [34, 35].

PEAKFORCE-РЕЖИМ АСМ

Внерезонансный режим сканирования, разработанный компанией «Bruker» (США), PeakForce Tapping mode AFM – один из вариантов модификации технологии сканирующей зондовой АСМ, перспективных для применения при работе с биологическими молекулами [36]. При реализации этого режима кантилевер контактирует с поверхностью образца с частотой значительно ниже резонансной, что позволяет рассматривать такие контакты как квазистатичный процесс, а сигнал регистрируется по фиксированной максимальной силе контакта образца с зондом. Такой способ сканирования дополнительно снижает силу воздействия кантилевера на образец и позволяет проводить топографические исследования «мягких» объектов с большой точностью. С использованием этого режима сканирования [37] впервые удалось получить изображение нуклеосом в растворе, без использования вакуума, с характеристиками, наиболее приближенными к данным РСА (рис. 4).

В работе McCauley et al. [37] авторы однозначно идентифицируют нуклеосомы по высоте ~5,5 нм и диаметру ~11 нм, что коррелирует с данными, полученными РСА (высота – 5,7 нм; диаметр – 11 нм) [11]. Столь высокое разрешение позволило установить, что негистоновые белки хроматина Nhr6A и Hmo1 из семейства HMGB дестабилизируют структуру нуклеосомы с высвобождением части ДНК, причем делают это по-разному. Установлено, что Hmo1 релаксирует структуру нуклеосомы в большей степени, чем Nhr6A, что хорошо согласуется с особенностями локализации этих белков на хроматине. Hmo1 сосредоточен в высоко транскрибируемой области, обогащенной генами трансляционного аппарата и обедненной гистонами, где не нужна плотная упаковка ДНК, а Nhr6A локализуется в остальных частях эухроматина.

ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКАЯ АСМ

Отдельного внимания заслуживают методики сканирующей зондовой микроскопии, позволяющие определять поверхностный электростатический потенциал. Они оказались значительно более информативными для изучения биомолекул после того, как были оптимизированы варианты сканирования в однопроходном режиме с реализацией резонансных частот кантилевера на двух

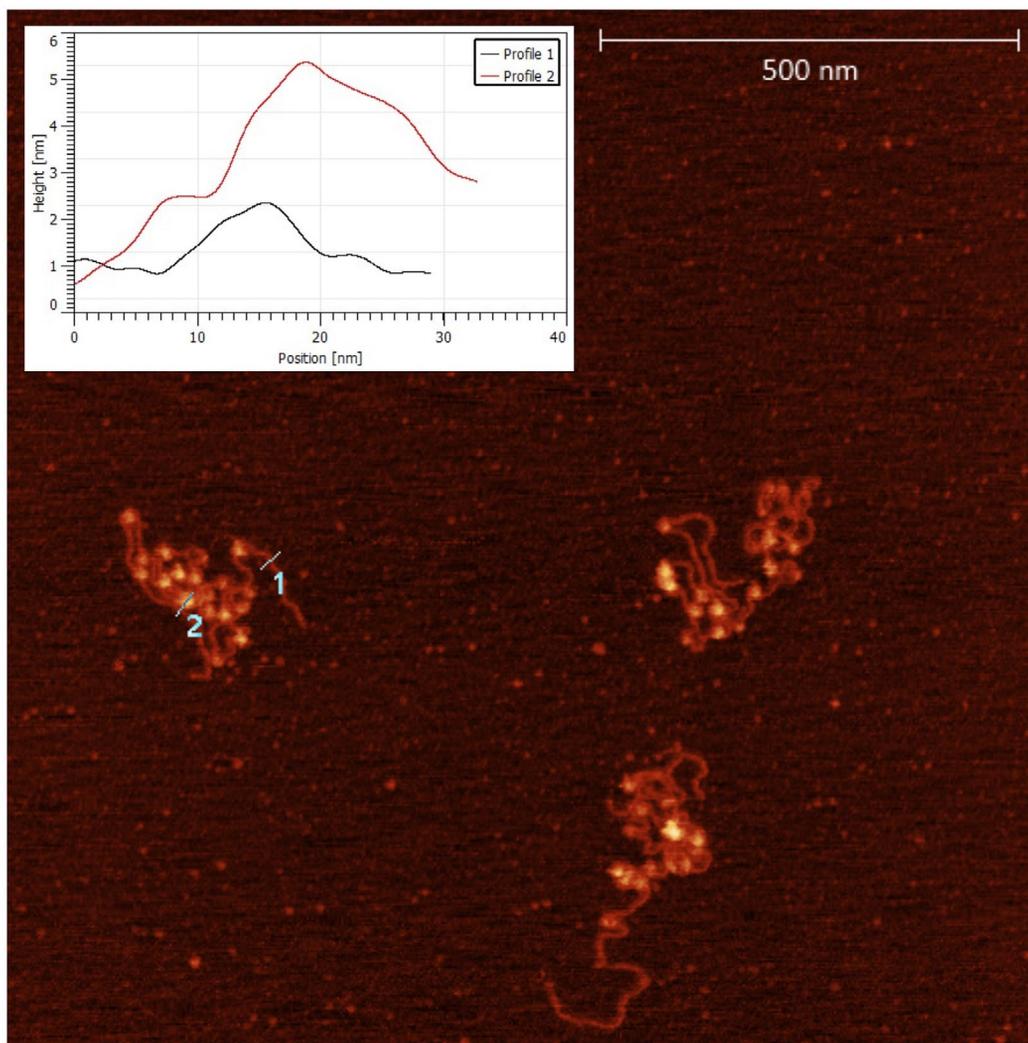


Рис. 4. Кластер нуклеосомных частиц [37]. На АСМ-изображении представлены три кластера нуклеосомных частиц. Отмечены две линии (1, 2). На вставке в верхнем левом углу приведены профили высоты для каждой линии (1 и 2) вдоль измеренного расстояния. Первый профиль (черная линия) пересекает ДНК и показывает высоту и ширину двухцепочечной ДНК. Второй профиль (красная линия) пересекает идентифицированную нуклеосому

гармониках. Реализация такого подхода позволила драматически повысить чувствительность метода [38]. В зависимости от особенностей реализации можно выделить Кельвин-зондовую силовую микроскопию (KPFM) [38] и электростатическую силовую микроскопию с усиленной частотой двойного резонанса (DREEM) [39]. На рис. 2, г показан принцип получения сигнала при KPFM и DREEM.

DREEM позволяет обнаруживать очень малые изменения градиента электростатической силы с высоким разрешением, что делает его мощным инструментом для характеристики структуры белок-нуклеиновых комплексов на уровне одной молекулы. DREEM позволяет визуализировать ДНК, расположенную как на поверхности, так и внутри белок-нуклеинового комплекса, а также ДНК в составе больших гетерогенных комплексов с несколькими белками. Указанный подход имеет

большой потенциал при изучении структуры как одиночных нуклеосом, так и нуклеосом в составе более сложных комплексов.

Работа Wu et al. [39] посвящена демонстрации возможностей метода DREEM для изучения расположения молекулы ДНК в составе больших мультибелковых комплексов. В качестве одного из примеров была выбрана нуклеосома. С одной стороны, авторы показали, что общие топографические изображения нуклеосом, полученные с помощью DREEM и других методов АСМ, совпадают. С другой стороны, на изображениях DREEM наблюдаются участки с пониженной интенсивностью в области нуклеосомного кора, расположение которых хорошо коррелирует с траекторией расположения ДНК в составе нуклеосомы по данным PCA (рис. 5). Этот факт подтверждает корректность применения такого подхода и интерпретации результатов.

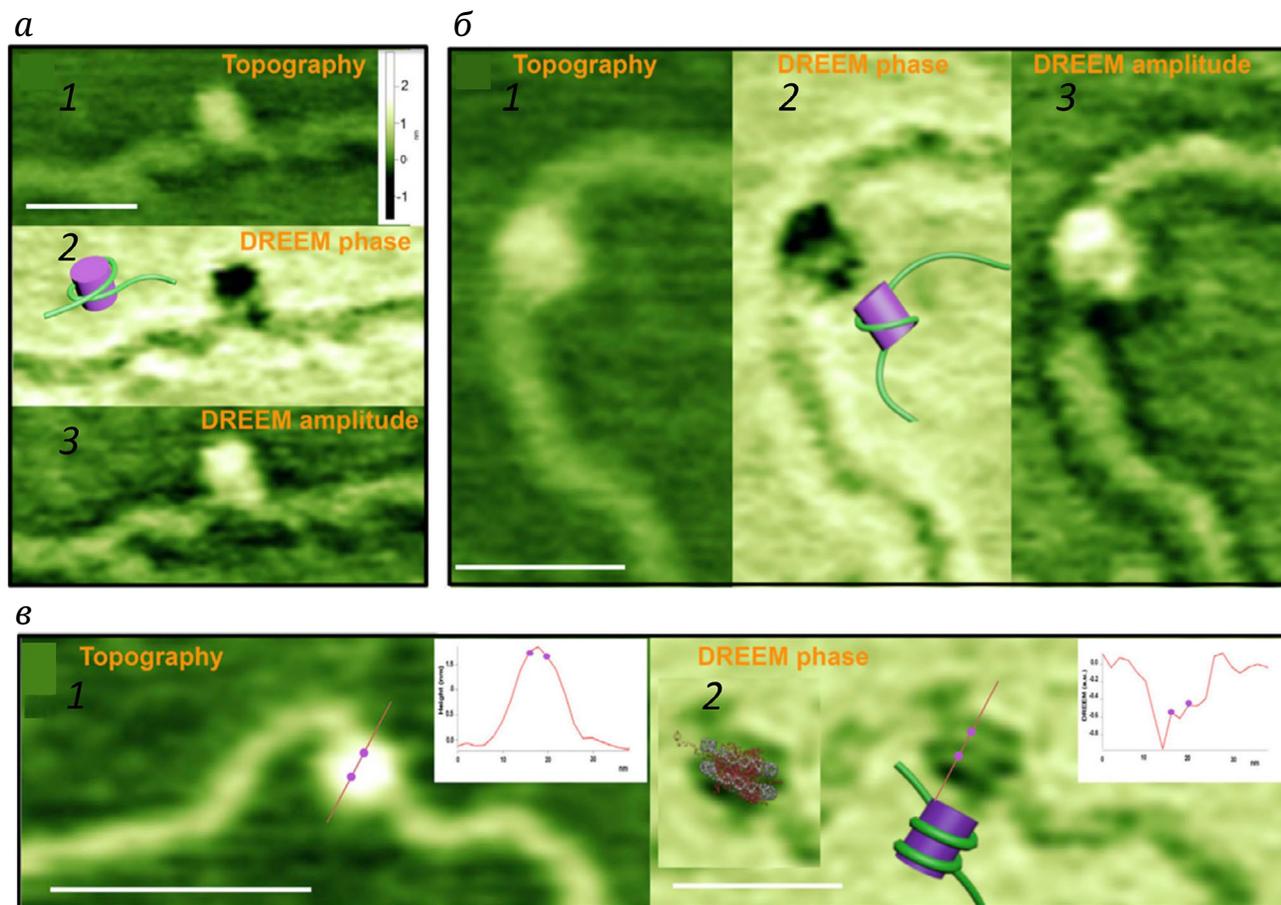


Рис. 5. Топографические изображения нуклеосом с помощью ACM и DREEM [39]. Топографические (а, 1; б, 1), изображения фазы DREEM (а, 2; б, 2) и амплитуды DREEM (а, 3; б, 3) нуклеосом, показывающие, как молекула ДНК оборачивается вокруг гистонов один раз. в – Топографические (1) и DREEM-фазовые изображения нуклеосомы (2), показывающие, что ДНК дважды оборачивается вокруг нуклеосомы. На вставках показаны профили высоты вдоль линии, проведенной через нуклеосому на топографических (в, 1) и DREEM изображениях (в, 2). Две точки на графиках соответствуют положениям двух точек, показанных на линии, которые отмечают положение пиков, соответствующих ДНК на изображении DREEM. Схематичные модели ДНК, обертывающей гистоны, показаны на каждом изображении DREEM (модели не в масштабе). Кристаллическая структура нуклеосомы, наложенная на изображение DREEM-фазы, показана на вставке к фазовому изображению на панели (в, 2)

В качестве второй модели Wu et al. [39] использовали мультибелковый комплекс системы репарации некомплементарных пар оснований ДНК человека, состоящий из MutSa и MutLa. С использованием DREEM удалось визуализировать расположение ДНК, содержащей неканоническую пару нуклеотидов, в составе этого комплекса (рис. 6).

Такая модель призвана продемонстрировать применимость метода для определения расположения ДНК внутри белкового комплекса. Полученные результаты вошли в работу, посвященную изучению функционирования комплекса MutSa и MutLa [40].

Этот же подход был использован в работе Adkins et al. [41] для подтверждения структуры нуклеосомоподобных частиц, реконструированных с использованием одноцепочечной ДНК (ssNCP). С помощью DREEM показано, что ssNCP имеют структуру и размеры, схожие с параметрами канонических нуклеосом, в частности, имеют дискообразную форму и содержат такое же количество оборотов одноцепочечной ДНК на октамере гистонов [41].

Авторы этой работы предположили, что гистоны, высвобождающиеся из состава нуклеосом на начальных этапах процесса репарации двухцепочечных разрывов ДНК, могут связываться с однонитевым участком ДНК. Была показана возможность реконструкции ssNCP *in vitro*. Оказалось, что ssNCP более динамичны, чем канонические нуклеосомы, и способны АТФ-независимо переноситься на другие участки одно- или двухцепочечных ДНК. Более того, АТФ-зависимые ремоделеры нуклеосом, такие как RSC и Fun30, эффективно связываются с ssNCP и активируются. На основании этих результатов авторы выдвинули предположение, что ssNCP могут быть отличительным признаком различных клеточных процессов,

Авторы этой работы предположили, что гистоны, высвобождающиеся из состава нуклеосом на начальных этапах процесса репарации двухцепочечных разрывов ДНК, могут связываться с однонитевым участком ДНК. Была показана возможность реконструкции ssNCP *in vitro*. Оказалось, что ssNCP более динамичны, чем канонические нуклеосомы, и способны АТФ-независимо переноситься на другие участки одно- или двухцепочечных ДНК. Более того, АТФ-зависимые ремоделеры нуклеосом, такие как RSC и Fun30, эффективно связываются с ssNCP и активируются. На основании этих результатов авторы выдвинули предположение, что ssNCP могут быть отличительным признаком различных клеточных процессов,

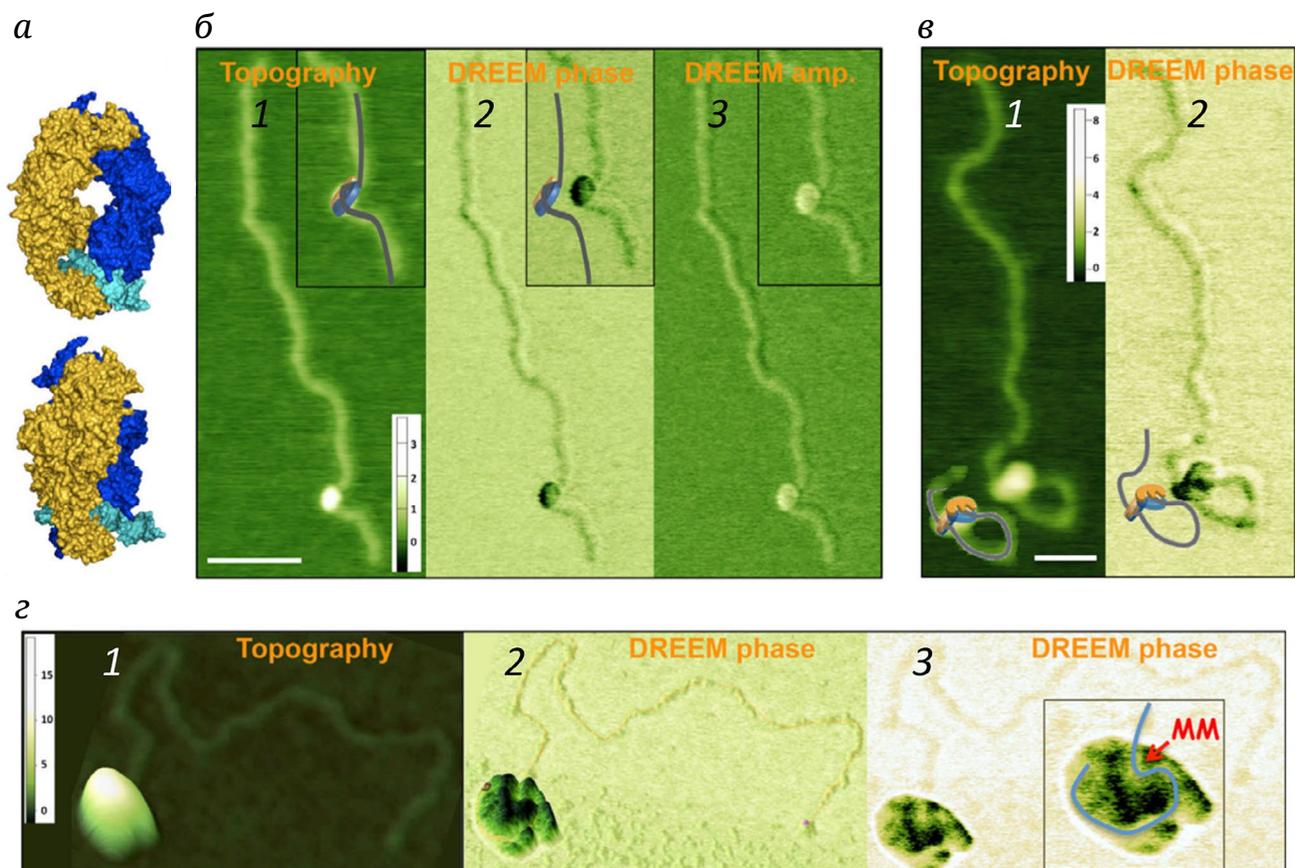


Рис. 6. Топографические АСМ- и DREEM-изображения комплексов репарации ошибочно спаренных нуклеотидов на ДНК длиной 2 т.п.н., содержащей ошибочно спаренные нуклеотиды GT [39]. *а* – Пространственная модель кристаллической структуры Taq MutS (создана из PDB: 1EWQ). Субъединицы А, В и ДНК окрашены в синий, золотой и голубой цвета соответственно. MutS изгибает ДНК примерно на 60° при прохождении через канал связывания ДНК. *б* – Топографические АСМ (*б*, 1), а также DREEM-фазовые (*б*, 2) и амплитудные (*б*, 3) изображения комплекса Taq MutS–ДНК. *в* – Наложение модели комплекса на АСМ-изображения (*в*, 1) и рядом с фазовыми изображениями (*в*, 2). *з* – Топографические АСМ-изображения (*з*, 1) и DREEM-фаза (*з*, 2 и 3) большого комплекса MutSa–MutLa–ДНК, содержащего ~10 белков. Путь ДНК идентифицирован как области с наибольшим снижением величины сигналов DREEM, по сравнению с одним белком, и отмечен на вставке (*з*, 3) синим цветом; ММ – ожидаемое положение ошибочно спаренных нуклеотидов

сопровождающихся формированием одноцепочечных участков ДНК, а возникновение таких структур может быть использовано для регуляции того или иного клеточного процесса.

Несмотря на впечатляющие возможности данного подхода, он имеет ряд технических ограничений, связанных в первую очередь с высокими требованиями, предъявляемыми к качеству кантиллеров, которые должны одновременно обладать высокой остротой и достаточной проводимостью для получения топографических изображений высокого разрешения и изображений DREEM [39].

DREEM позволяет визуализировать конформацию ДНК как на поверхности, так и внутри отдельных комплексов белок–ДНК, а также в составе больших гетерогенных комплексов с несколькими белками. В совокупности способность DREEM обнаруживать очень малые изменения градиента электростатической силы с высоким разрешени-

ем делает его мощным инструментом для характеристики структуры комплексов белок–ДНК на уровне одной молекулы. Указанный подход имеет большой потенциал при изучении структуры как одиночных нуклеосом, так и нуклеосом в составе более сложных комплексов.

ВЫСОКОСКОРОСТНАЯ АСМ

Одним из ключевых недостатков упомянутых режимов проведения АСМ можно считать большие затраты времени, необходимые для получения отдельных изображений. Такая особенность метода ограничивает его применимость при исследовании процессов в динамике. Первые попытки изучения динамических процессов были реализованы с использованием последовательного сканирования образцов. Таким образом, были получены

данные о скольжении РНК-полимеразы вдоль ДНК [42]. В том же режиме удалось продемонстрировать процесс «разматывания» нуклеосомы [43]. Shlyakhtenko et al. [43] показали, что многократное непрерывное сканирование одного и того же поля с нуклеосомой позволило сформировать восемь изображений одной и той же нуклеосомы, отражающих ее преобразования с течением времени. В результате было показано постепенное «разматывание» ДНК с гистонового октамера, завершающееся полным разрушением комплекса.

Дальнейшее совершенствование метода за счет использования более производительного прибора позволило группе Lyubchenko с использованием высокоскоростного сканирования (HS-AFM) получить более детальные данные о динамике «разматывания» нуклеосом с гистоном H3 и его центромерным вариантом CENP-A [44, 45]. В этих работах были получены данные о механизмах релаксации структуры нуклеосом, таких как выпетливание ДНК, а также о возможности транслокации нуклеосом вдоль ДНК. Авторы отмечают, что динамические перестройки центромерного хроматина могут происходить при отсутствии факторов ремоделирования. При этом CENP-A стабилизирует нуклеосомные частицы, препятствуя полной диссоциации гистонов при разрыхлении или разворачивании ДНК и обеспечивая быструю повторную сборку нуклеосом при их межнитевом переносе [45]. Канонические нуклеосомные частицы с гистоном H3 не проявляют такой пластичности и перестраиваются только в присутствии факторов ремоделирования, таких как SNF2h [46]. Позднее в работе Onoa et al. [47] с использованием HS-AFM были показаны некоторые детали динамики нуклеосом и хроматосом, уточняющие механизм их «разворачивания». В частности, в реальном времени продемонстрирована асимметричность «разворачивания» нуклеосом, ступенчатость удаления гетеродимеров гистонов из нуклеосомного кора, а также лабильность положения гистонового тетрамера (H3–H4) × 2 в области диады.

HS-AFM-сканирование сделало возможным анализ динамики нуклеопротеидных и других комплексов биомолекул. Для того чтобы получить представление о кинетических характеристиках исследуемых белков, требуется еще большее увеличение скорости сканирования. В дальнейшем, вероятно, для достижения указанной цели будут привлечены возможности машинного обучения. В работе Kato et al. [48] для анализа данных интегральной симуляции динамики от асинхронного HS-AFM-сканирования предложен подход с использованием машинного обучения. Особенность описанного подхода заключается в том, что в данном случае учитывается асинхронность одиночных проходов при сканировании. Таким образом, было

показано, что этот метод с соответствующей частотой повторной дискретизации является мощным инструментом оценки динамического поведения исследуемого объекта по данным HS-AFM с низким пространственно-временным разрешением.

СРАВНЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ АСМ С НЕКОТОРЫМИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМИ ПОДХОДАМИ ПРИ ИЗУЧЕНИИ НУКЛЕОСОМ

При проведении структурно-функциональных исследований нуклеосом, в том числе при изучении их динамики, применяется ряд физико-химических инструментов исследования, таких как: магнитный и оптический «пинцеты», «ДНК-шторы», ядерный магнитный резонанс, рентгено-структурный анализ и криоэлектронная микроскопия, а также оптические методы, основанные на FRET. Эти методы обеспечивают широкий спектр детектируемых параметров с высоким пространственным и временным разрешением.

Одним из таких подходов, получивших распространение, является оптический «пинцет», позволяющий приложить механическую силу непосредственно к исследуемой молекуле или комплексу и одновременно измерить удлинение исследуемого образца. С использованием этого метода впервые была определена прочность нуклеосомного комплекса [49]. Магнитный пинцет, который, помимо растяжения, позволяет передавать вращательное движение объекту, позволил создавать модельные структуры ДНК с суперспирализацией. В работе Gupta et al. [50] было показано, что внутримолекулярное напряжение, возникающее в структуре ДНК с положительной суперспирализацией, изменяет ее конформацию, по сравнению с несуперспирализованной ДНК, таким образом, что образование нуклеосом становится менее эффективным.

Тем не менее применимость обоих подходов ограничивается измерением изменений линейных характеристик объекта и величины прикладываемого усилия. Комбинирование этих методов с флуоресцентной микроскопией значительно расширяет возможности исследователя, но по-прежнему не позволяет исследовать конформационные изменения внутри комплекса. Реализация флуоресцентной микроскопии в режиме FRET – безызлучательного механизма передачи энергии между флуорофорами – частично позволяет преодолеть это ограничение, тем не менее зарегистрированные с помощью этого метода конформационные изменения не всегда могут быть интерпретированы однозначно. Несмотря на это, использование механизма FRET является мощным инструментом при изучении структуры и конформационной динамики белок-нуклеиновых

комплексов. Например, применение FRET позволило Andreeva et al. [51] зарегистрировать влияние буферных компонентов на структуру нуклеосомы. В частности, показан стабилизирующий эффект ионов калия, а также продемонстрировано, что такая стабилизация структуры нуклеосомы создает барьер для АТР-независимых белков/комплексов, таких как FACT и PARP1.

Еще один подход, позволяющий исследовать комплексы белков с нуклеиновыми кислотами, основан на формировании нанобарьера на поверхности подложки, который обеспечивает «закоривание» молекулы ДНК с формированием так называемых «ДНК-штор». «ДНК-шторы» с нуклеосомами – уникальная система, позволяющая отслеживать поведение тысяч отдельных нуклеосомных частиц, содержащих флуоресцентную метку, в режиме реального времени. Применение этого подхода позволило выявить динамику уплотнения ДНК конденсатами I и II, а также уточнить механистическую модель формирования хроматиновых петель конденсином дрожжей и когезином человека [52–56]. Visnapuu и Greene [57] с использованием этого подхода удалось определить энергетический ландшафт локализации нуклеосом на ДНК и подтвердить теоретические предсказания на основе расчетной модели. Кроме того, в этой же работе было показано, что позиции сайтов сборки нуклеосом коррелируют с регуляторными областями транскрипции. К сожалению, этот подход не позволяет явным образом исследовать структурные изменения внутри самих нуклеосом, индуцируемые различными факторами.

Одним из самых мощных инструментов при изучении структуры биополимеров является метод РСА. При помощи РСА структура нуклеосомы была определена на атомарном уровне довольно давно [58]. Несмотря на высокую разрешающую способность, применимость этого метода сильно ограничена. Ограничения во многом связаны с необходимостью выращивать кристалл, что не позволяет изучать изменения структуры в динамике. Более того, получение кристалла само по себе является нетривиальной задачей, при этом качество изображения напрямую зависит от качества кристалла. Задача дополнительно осложняется, когда исследуется структура комплексов белков с нуклеиновыми кислотами, тем более такой сложности, как нуклеосома, и тем более хроматин. Получение пригодного для РСА кристалла также затруднено, если изучаемый полимер в своем составе содержит неупорядоченные структуры. Кроме того, структура белка в кристалле может отличаться от таковой в растворе, что необходимо учитывать при интерпретации данных РСА. Отдельно следует упомянуть сложности расшифровки полученных первичных данных, что допол-

нительно вносит ограничения на размеры объекта, выбранного для исследований.

На сегодняшний день развитие криоЭМ позволяет получать структуры с разрешением, приближающимся к данным РСА. Например, в работе Markert et al. [59] получено изображение связанного с нуклеосомой полного комплекса деацетилирования гистонов Rpd3S при помощи криоЭМ с общим разрешением 2,8 Å. Этот метод лишен части ограничений, характерных для РСА. Так, например, криоЭМ позволяет изучать белки, содержащие неупорядоченные структуры в своем составе, являющиеся сложными объектами для РСА. Тем не менее применение и этого метода имеет свои ограничения. КриоЭМ лучше подходит для изучения крупных объектов более 200 кДа. Как и РСА, криоЭМ плохо адаптирован для изучения конформационной динамики. Достижения последних лет позволили обеспечить анализ с временным разрешением в диапазоне от миллисекунд до секунд, что позволяет изучать конформационную динамику структуры, но плохо применимо при изучении масштабных изменений в структуре, как, например, транслокация нуклеосомы или ее межнитевой перенос.

Задачу анализа конформационной динамики биомолекул и их комплексов, таких как нуклеосома, позволяет решить ЯМР-спектроскопия. Достижения в области ЯМР-спектроскопии в растворе позволили получить представление о конформационной динамике как связанной коровой части гистонов, так и их свободных N- и C-хвостов [60]. Методы твердотельной ЯМР представляют собой дополнительные инструменты исследования нуклеосом [61]. Например, методом твердотельной ЯМР получена вторичная структура гистона H2В в составе нуклеосомы, и она согласуется со структурой, полученной методом РСА. Авторам удалось показать динамические взаимодействия гистона H2В с гистоном H4, а также с ДНК [62]. Применимость этого метода преимущественно ограничена необходимостью введения изотопов разных элементов в образец для однозначности интерпретации спектров. Так, в работе Shi et al. [62] был использован гистон, содержащий изотопы ^{13}C и ^{15}N .

Использование АСМ во многом позволяет дополнить данные, полученные с использованием описанных выше подходов. В частности, АСМ позволяет определить геометрические параметры нуклеосом, а также их изменение при взаимодействии нуклеосом с различными белковыми факторами или замене гистонов их вариантами, например, при замене H3 на CENP-A. Возможность проводить сканирование в жидкой среде позволяет имитировать условия, более приближенные к физиологическим, а появление высокоскоростного сканирования позволило наблюдать динамику

релаксации структуры нуклеосомы. Использование возможностей электростатической силовой микроскопии позволяет наблюдать траекторию укладки ДНК в составе нуклеосомы.

Одним из преимуществ АСМ можно считать применимость этого метода при работе со сложными макромолекулярными структурами, например, фрагментами хроматина или модельными полинуклеосомными фрагментами [15, 63]. Изучение таких объектов с помощью FRET или с использованием «пинцетов» может быть ограничено необходимостью введения флуоресцентных меток или микросфер в структуру исследуемого образца.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стремительное развитие АСМ как метода исследования сложных белок-нуклеиновых комплексов позволило значительно углубить понимание структуры нуклеосомы. Следует отметить, что большое значение в применении АСМ имеет среда сканирования. Хорошо известно, что реализация АСМ в условиях вакуума положительно сказывается на качестве изображений. Однако для удобства интерпретации результатов при изучении биомолекул предпочтительнее производить сканирование в водной среде. Высушивание таких биомолекул, как ДНК, белки или их комплексы, приводит к нарушению их пространственной структуры [64]. Кроме того, сканирование в водной среде необходимо для реализации возможности изучать динамику процессов. В то же время реализация АСМ в жидкости сопровождается рядом технических сложностей, таких как ограничение спектра используемых подложек и способов иммобилизации объектов сканирования, а также возникают повышенные требования к подготовке кантилеверов.

Возможности АСМ, вероятно, будут расширяться благодаря развитию и внедрению машинного обучения для обработки первичных данных. Такой подход позволит снизить уровень «шума» при сканировании на программном уровне и повысить точность проводимых методом АСМ измерений. Кроме того, повышение производительности на программном уровне позволит увеличить скорость сканирования.

Следует отметить отдельные подходы, основанные на использовании АСМ, но к настоящему времени не нашедшие широкого применения при изучении нуклеосом. Например, сочетание флуоресцентной микроскопии и АСМ может быть востребовано при изучении взаимодействия белковых молекул или их комплексов с субстратами в виде нуклеосом или хроматина. При этом данные о топологии образца позволят локализовать уча-

сток взаимодействия белка/комплекса с субстратом, а данные флуоресценции позволят идентифицировать меченую молекулу. Подобный подход был использован группой Wuman для исследования гомологичной рекомбинации [65].

Широкое применение комбинации АСМ и детекции флуоресценции ограничивается в первую очередь необходимостью использования подложки, которая, будучи атомарно гладкой, была бы оптически прозрачна. На сегодняшний день подготовка такой подложки – нетривиальная задача; один из вариантов ее решения описан в работе Rahman et al. [66]. Вероятно, в будущем эта проблема будет решена, что откроет доступ к арсеналу подходов, основанных на детекции флуоресценции, включая FRET и поляризацию флуоресценции в сочетании с АСМ.

Реализация электростатической силовой микроскопии в жидкости могла бы значительно помочь при изучении динамики конформационных изменений ДНК в составе белок-нуклеинового комплекса, в том числе при использовании нуклеосомы или хроматина. На сегодняшний день измерение электростатического потенциала биологических молекул в жидкости ограничено высокой диэлектрической проницаемостью среды, возможностью образования сольватной оболочки на поверхности образца, а также экранированием поверхностей зонда и образца ионами раствора. Тем не менее некоторые исследования показывают возможность применения электростатической силовой микроскопии твердых материалов при низкой ионной силе [67, 68]. Сканирование электростатического потенциала в жидкости предъявляет повышенные требования в первую очередь к подготовке кантилевера. Он должен не только удовлетворять всем требованиям, предъявляемым к кантилеверу для проведения электростатической силовой микроскопии в режиме DREEM, но еще иметь диэлектрическое покрытие на поверхности зонда за исключением участка, непосредственно находящегося в контакте с образцом. Вероятно, дальнейшее развитие метода, сопряженное с повышением чувствительности прибора, позволит реализовать измерение электростатического потенциала биомолекул в жидкости.

В заключение следует добавить, что исследования последнего десятилетия резко изменили взгляды на структуру хроматина и его базовую единицу – нуклеосому. Статическая картина в настоящее время дополняется динамической, а методы с возможностью исследования одиночных молекул сыграли важную роль в характеристике динамических свойств нуклеосом. Использование АСМ предоставляет возможность охарактеризовать сложную надмолекулярную систему на наноуровне, позволяя непосредственно визуализировать

структурные особенности нуклеосом и изменения в нуклеосомах, например, процесс их разворачивания. Кроме того, немаловажную роль, в сравнении с некоторыми другими методами, играет возможность использования меньших количеств препаратов биополимеров в случае измерений с помощью АСМ.

Вклад авторов. А.А. Украинцев, М.М. Кутузов – концепция и написание текста; О.И. Лаврик – редактирование текста статьи и руководство работами.

Благодарности. Авторы выражают искреннюю благодарность А.А. Ломзову и Е.А. Белоусовой

за консультацию и продуктивные дискуссии при подготовке текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-74-10059) и Проекта государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300041-4 (для О.И. Лаврик).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pombo, A., and Dillon, N. (2015) Three-dimensional genome architecture: players and mechanisms, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **16**, 245-257, <https://doi.org/10.1038/nrm3965>.
2. Kornberg, R. D., and Thomas, J. O. (1974) Chromatin structure; oligomers of the histones, *Science*, **184**, 865-868, <https://doi.org/10.1126/science.184.4139.865>.
3. Olins, A. L., and Olins, D. E. (1974) Spheroid chromatin units (v bodies), *Science*, **183**, 330-332, <https://doi.org/10.1126/science.183.4122.330>.
4. Woodcock, C. L., Safer, J. P., and Stanchfield, J. E. (1976) Structural repeating units in chromatin. I. Evidence for their general occurrence, *Exp. Cell Res.*, **97**, 101-110, [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(76\)90659-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(76)90659-5).
5. Robison, A. D., and Finkelstein, I. J. (2014) High-throughput single-molecule studies of protein-DNA interactions, *FEBS Lett.*, **588**, 3539-3546, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.021>.
6. Teif, V. B., and Cherstvy, A. G. (2016) Chromatin and epigenetics: current biophysical views, *AIMS Biophys.*, **3**, 88-98, <https://doi.org/10.3934/biophy.2016.1.88>.
7. Fierz, B., and Poirier, M. G. (2019) Biophysics of chromatin dynamics, *Annu. Rev. Biophys.*, **48**, 321-345, <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-070317-032847>.
8. Vesenska, J., Hansma, H. G., Siegerist, C., Siligardi, G., Schabtach, E., and Bustamante, C. (1992) Scanning force microscopy of circular DNA and chromatin in air and propanol, *Scan. Probe Microscop.*, **1639**, 127-137, <https://doi.org/10.1117/12.58189>.
9. Allen, M. J., Dong, X. F., O'Neill, T. E., Yau, P., Kowalczykowski, S. C., Gatewood, J., Balhorn, R., and Bradbury, E. M. (1993) Atomic force microscope measurements of nucleosome cores assembled along defined DNA sequences, *Biochemistry*, **32**, 8390-8396, <https://doi.org/10.1021/bi00084a002>.
10. Martin, L. D., Vesenska, J. P., Henderson, E., and Dobbs, D. L. (1995) Visualization of nucleosomal substructure in native chromatin by atomic force microscopy, *Biochemistry*, **34**, 4610-4616, <https://doi.org/10.1021/bi00014a014>.
11. Richmond, T. J., Finch, J. T., Rushton, B., Rhodes, D., and Klug, A. (1984) Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution, *Nature*, **311**, 532-537, <https://doi.org/10.1038/311532a0>.
12. Arents, G., Burlingame, R. W., Wang, B. C., Love, W. E., and Moudrianakis, E. N. (1991) The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 10148-10152, <https://doi.org/10.1073/pnas.88.22.10148>.
13. Qian, R. L., Liu, Z. X., Zhou, M. Y., Xie, H. Y., Jiang, C., Yan, Z. J., Li, M. Q., Zhang, Y., and Hu, J. (1997) Visualization of chromatin folding patterns in chicken erythrocytes by atomic force microscopy (AFM), *Cell Res.*, **7**, 143-150, <https://doi.org/10.1038/cr.1997.15>.
14. Lowary, P. T., and Widom, J. (1998) New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning, *J. Mol. Biol.*, **276**, 19-42, <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1494>.
15. Pisano, S., Pascucci, E., Cacchione, S., De Santis, P., and Savino, M. (2006) AFM imaging and theoretical modeling studies of sequence-dependent nucleosome positioning, *Biophys. Chem.*, **124**, 81-89, <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2006.05.012>.
16. Hizume, K., Araki, S., Hata, K., Prieto, E., Kundu, T. K., Yoshikawa, K., and Takeyasu, K. (2010) Nano-scale analyses of the chromatin decompaction induced by histone acetylation, *Arch. Histol. Cytol.*, **73**, 149-163, <https://doi.org/10.1679/aohc.73.149>.
17. Filenko, N. A., Kolar, C., West, J. T., Smith, S. A., Hassan, Y. I., Borgstahl, G. E., Zemleni, J., and Lyubchenko, Y. L. (2011) The role of histone H4 biotinylation in the structure of nucleosomes, *PLoS One*, **6**, e16299, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016299>.

18. Singh, M. P., Wijeratne, S. S., and Zempleni, J. (2013) Biotinylation of lysine 16 in histone H4 contributes toward nucleosome condensation, *Arch. Biochem. Biophys.*, **529**, 105-111, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.11.005>.
19. Montel, F., Castelnovo, M., Menoni, H., Angelov, D., Dimitrov, S., and Faivre-Moskalenko, C. (2011) RSC remodeling of oligo-nucleosomes: an atomic force microscopy study, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 2571-2579, <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1254>.
20. Lyubchenko, Y. L. (2014) Centromere chromatin: a loose grip on the nucleosome? *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **21**, 8, <https://doi.org/10.1038/nsmb.2745>.
21. Syed, S. H., Boulard, M., Shukla, M. S., Gautier, T., Travers, A., Bednar, J., Faivre-Moskalenko, C., Dimitrov, S., and Angelov, D. (2009) The incorporation of the novel histone variant H2AL2 confers unusual structural and functional properties of the nucleosome, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 4684-4695, <https://doi.org/10.1093/nar/gkp473>.
22. Würtz, M., Aumiller, D., Gundelwein, L., Jung, P., Schütz, C., Lehmann, K., Tóth, K., and Rohr, K. (2019) DNA accessibility of chromatosomes quantified by automated image analysis of AFM data, *Sci. Rep.*, **9**, 12788, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49163-4>.
23. Ukraintsev, A., Kutuzov, M., Belousova, E., Joyeau, M., Golyshev, V., Lomzov, A., and Lavrik, O. (2023) PARP3 affects nucleosome compaction regulation, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 9042, <https://doi.org/10.3390/ijms24109042>.
24. Suskiewicz, M. J., Prokhorova, E., Rack, J. G. M., and Ahel, I. (2023) ADP-ribosylation from molecular mechanisms to therapeutic implications, *Cell*, **186**, 4475-4495, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.08.030>.
25. Sukhanova, M. V., Abrakhi, S., Joshi, V., Pastre, D., Kutuzov, M. M., Anarbaev, R. O., Curmi, P. A., Hamon, L., and Lavrik, O. I. (2016) Single molecule detection of PARP1 and PARP2 interaction with DNA strand breaks and their poly(ADP-ribosyl)ation using high-resolution AFM imaging, *Nucleic Acids Res.*, **44**, e60, <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1476>.
26. Sukhanova, M. V., Hamon, L., Kutuzov, M. M., Joshi, V., Abrakhi, S., Dobra, I., Curmi, P. A., Pastre, D., and Lavrik, O. I. (2019) A single-molecule atomic force microscopy study of PARP1 and PARP2 recognition of base excision repair DNA intermediates, *J. Mol. Biol.*, **431**, 2655-2673, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.05.028>.
27. Davies, E., Teng, K. S., Conlan, R. S., and Wilks, S. P. (2005) Ultra-high resolution imaging of DNA and nucleosomes using non-contact atomic force microscopy, *FEBS Lett.*, **579**, 1702-1706, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.02.028>.
28. Han, W., Lindsay, S., and Jing, T. (1996) A magnetically driven oscillating probe microscope for operation in liquids, *Appl. Phys. Lett.*, **69**, 4111-4113, <https://doi.org/10.1063/1.117835>.
29. Karymov, M. A., Tomschik, M., Leuba, S. H., Caiafa, P., and Zlatanova, J. (2001) DNA methylation-dependent chromatin fiber compaction *in vivo* and *in vitro*: requirement for linker histone, *FASEB J.*, **15**, 2631-2641, <https://doi.org/10.1096/fj.01-0345com>.
30. Stroh, C., Wang, H., Bash, R., Ashcroft, B., Nelson, J., Gruber, H., Lohr, D., Lindsay, S. M., and Hinterdorfer, P. (2004) Single-molecule recognition imaging microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12503-12507, <https://doi.org/10.1073/pnas.0403538101>.
31. Zhang, M., Chen, G., Kumar, R., and Xu, B. (2013) Mapping out the structural changes of natural and pretreated plant cell wall surfaces by atomic force microscopy single molecular recognition imaging, *Biotechnol. Biofuels*, **6**, 147, <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-147>.
32. Wang, H., Bash, R., Lindsay, S. M., and Lohr, D. (2005) Solution AFM studies of human Swi-Snf and its interactions with MMTV DNA and chromatin, *Biophys. J.*, **89**, 3386-3398, <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.065391>.
33. Bash, R., Wang, H., Anderson, C., Yodh, J., Hager, G., Lindsay, S. M., and Lohr, D. (2006) AFM imaging of protein movements: histone H2A-H2B release during nucleosome remodeling, *FEBS Lett.*, **580**, 4757-4761, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.06.101>.
34. Bruno, M., Flaus, A., Stockdale, C., Rencurel, C., Ferreira, H., and Owen-Hughes, T. (2003) Histone H2A/H2B dimer exchange by ATP-dependent chromatin remodeling activities, *Mol. Cell*, **12**, 1599-1606, [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00499-4](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00499-4).
35. Vicent, G. P., Nacht, A. S., Smith, C. L., Peterson, C. L., Dimitrov, S., and Beato, M. (2004) DNA instructed displacement of histones H2A and H2B at an inducible promoter, *Mol. Cell*, **16**, 439-452, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.10.025>.
36. Xu, K., Sun, W., Shao, Y., Wei, F., Zhang, X., Wang, W., and Li, P. (2018) Recent development of PeakForce Tapping mode atomic force microscopy and its applications on nanoscience, *Nanotechnol. Rev.*, **7**, 605-621, <https://doi.org/10.1515/ntrev-2018-0086>.
37. McCauley, M. J., Huo, R., Becker, N., Holte, M. N., Muthurajan, U. M., Rouzina, I., Luger, K., Maher, L. J., 3rd, Israeloff, N. E., and Williams, M. C. (2019) Single and double box HMGB proteins differentially destabilize nucleosomes, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 666-678, <https://doi.org/10.1093/nar/gky1119>.
38. Leung, C., Maradan, D., Kramer, A., Howorka, S., Mesquida, P., and Hoogenboom, B. W. (2010) Improved Kelvin probe force microscopy for imaging individual DNA molecules on insulating surfaces, *Appl. Phys. Lett.*, **97**, 203703, <https://doi.org/10.1063/1.3512867>.

39. Wu, D., Kaur, P., Li, Z. M., Bradford, K. C., Wang, H., and Erie, D. A. (2016) Visualizing the path of DNA through proteins using DREEM imaging, *Mol. Cell*, **61**, 315-323, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.12.012>.
40. Bradford, K. C., Wilkins, H., Hao, P., Li, Z. M., Wang, B., Burke, D., Wu, D., Smith, A. E., Spaller, L., Du, C., Gauer, J. W., Chan, E., Hsieh, P., Weninger, K. R., and Erie, D. A. (2020) Dynamic human MutSa-MutLa complexes compact mismatched DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 16302-16312, <https://doi.org/10.1073/pnas.1918519117>.
41. Adkins, N. L., Swygert, S. G., Kaur, P., Niu, H., Grigoryev, S. A., Sung, P., Wang, H., and Peterson, C. L. (2017) Nucleosome-like, single-stranded DNA (ssDNA)-histone octamer complexes and the implication for DNA double strand break repair, *J. Biol. Chem.*, **292**, 5271-5281, <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.776369>.
42. Guthold, M., Zhu, X., Rivetti, C., Yang, G., Thomson, N. H., Kasas, S., Hansma, H. G., Smith, B., Hansma, P. K., and Bustamante, C. (1999) Direct observation of one-dimensional diffusion and transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase, *Biophys. J.*, **77**, 2284-2294, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77067-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77067-0).
43. Shlyakhtenko, L. S., Lushnikov, A. Y., and Lyubchenko, Y. L. (2009) Dynamics of nucleosomes revealed by time-lapse atomic force microscopy, *Biochemistry*, **48**, 7842-7848, <https://doi.org/10.1021/bi900977t>.
44. Miyagi, A., Ando, T., and Lyubchenko, Y. L. (2011) Dynamics of nucleosomes assessed with time-lapse high-speed atomic force microscopy, *Biochemistry*, **50**, 7901-7908, <https://doi.org/10.1021/bi200946z>.
45. Stumme-Diers, M. P., Banerjee, S., Hashemi, M., Sun, Z., and Lyubchenko, Y. L. (2018) Nanoscale dynamics of centromere nucleosomes and the critical roles of CENP-A, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 94-103, <https://doi.org/10.1093/nar/gkx933>.
46. Sinha, K. K., Gross, J. D., and Narlikar, G. J. (2017) Distortion of histone octamer core promotes nucleosome mobilization by a chromatin remodeler, *Science*, **355**, eaaa3761, <https://doi.org/10.1126/science.aaa3761>.
47. Onoa, B., Díaz-Celis, C., Cañari-Chumpitaz, C., Lee, A., and Bustamante, C. (2023) Real-time multistep asymmetrical disassembly of nucleosomes and chromatosomes visualized by high-speed atomic force microscopy, *ACS Cent. Sci.*, **10**, 122-137, <https://doi.org/10.1021/acscentsci.3c00735>.
48. Kato, S., Takada, S., and Fuchigami, S. (2023) Particle smoother to assimilate asynchronous movie data of high-speed AFM with MD simulations, *J. Chem. Theory Comput.*, **19**, 4678-4688, <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.2c01268>.
49. Bennink, M. L., Leuba, S. H., Leno, G. H., Zlatanova, J., de Groot, B. G., and Greve, J. (2001) Unfolding individual nucleosomes by stretching single chromatin fibers with optical tweezers, *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 606-610, <https://doi.org/10.1038/89646>.
50. Gupta, P., Zlatanova, J., and Tomschik, M. (2009) Nucleosome assembly depends on the torsion in the DNA molecule: a magnetic tweezers study, *Biophys. J.*, **97**, 3150-3157, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.09.032>.
51. Andreeva, T. V., Maluchenko, N. V., Sivkina, A. L., Chertkov, O. V., Valieva, M. E., Kotova, E. Y., Kirpichnikov, M. P., Studitsky, V. M., and Feofanov, A. V. (2022) Na⁺ and K⁺ ions differently affect nucleosome structure, stability, and interactions with proteins, *Microsc. Microanal.*, **28**, 243-253, <https://doi.org/10.1017/S1431927621013751>.
52. Ganji, M., Shaltiel, I. A., Bisht, S., Kim, E., Kalichava, A., Haering, C. H., and Dekker, C. (2018) Real-time imaging of DNA loop extrusion by condensing, *Science*, **360**, 102-105, <https://doi.org/10.1126/science.aar7831>.
53. Davidson, I. F., Bauer, B., Goetz, D., Tang, W., Wutz, G., and Peters, J. M. (2019) DNA loop extrusion by human cohesin, *Science*, **366**, 1338-1345, <https://doi.org/10.1126/science.aaz3418>.
54. Kim, Y., Shi, Z., Zhang, H., Finkelstein, I. J., and Yu, H. (2019) Human cohesin compacts DNA by loop extrusion, *Science*, **366**, 1345-1349, <https://doi.org/10.1126/science.aaz4475>.
55. Kong, M., Cutts, E. E., Pan, D., Beuron, F., Kaliyappan, T., Xue, C., Morris, E. P., Musacchio, A., Vannini, A., and Greene, E. C. (2020) Human condensin I and II drive extensive ATP-dependent compaction of nucleosome-bound DNA, *Mol. Cell*, **79**, 99-114, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.026>.
56. Kim, E., Kerssemakers, J., Shaltiel, I. A., Haering, C. H., and Dekker, C. (2020) DNA-loop extruding condensin complexes can traverse one another, *Nature*, **579**, 438-442, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2067-5>.
57. Visnapuu, M. L., and Greene, E. C. (2009) Single-molecule imaging of DNA curtains reveals intrinsic energy landscapes for nucleosome deposition, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**, 1056-1062, <https://doi.org/10.1038/nsmb.1655>.
58. Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., and Richmond, T. J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution, *Nature*, **389**, 251-260, <https://doi.org/10.1038/38444>.
59. Markert, J. W., Vos, S. M., and Farnung, L. (2023) Structure of the complete *S. cerevisiae* Rpd3S-nucleosome complex, *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2023.08.03.551877>.
60. Van Emmerik, C. L., and van Ingen, H. (2019) Unspinning chromatin: revealing the dynamic nucleosome landscape by NMR, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **110**, 1-19, <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2019.01.002>.
61. Ackermann, B. E., and Debelouchina, G. T. (2021) Emerging contributions of solid-state NMR spectroscopy to chromatin structural biology, *Front. Mol. Biosci.*, **8**, 741581, <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.741581>.
62. Shi, X., Kannaian, B., Prasanna, C., Soman, A., and Nordenskiöld, L. (2023) Structural and dynamical investigation of histone H2B in well-hydrated nucleosome core particles by solid-state NMR, *Commun. Biol.*, **6**, 672, <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05050-3>.

63. Melters, D. P., Neuman, K. C., Bentahar, R. S., Rakshit, T., and Dalal, Y. (2023) Single molecule analysis of CENP-A chromatin by high-speed atomic force microscopy, *Elife*, **12**, e86709, <https://doi.org/10.7554/eLife.86709>.
64. Heenan, P. R., and Perkins, T. T. (2019) Imaging DNA equilibrated onto mica in liquid using biochemically relevant deposition conditions, *ACS Nano*, **13**, 4220-4229, <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b09234>.
65. Sanchez, H., Kertokalio, A., van Rossum-Fikkert, S., Kanaar, R., and Wyman, C. (2013) Combined optical and topographic imaging reveals different arrangements of human RAD54 with presynaptic and postsynaptic RAD51-DNA filaments, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 11385-11390, <https://doi.org/10.1073/pnas.1306467110>.
66. Rahman, M., Boggs, Z., Neff, D., and Norton, M. (2018) The Sapphire (0001) Surface: a transparent and ultraflat substrate for DNA nanostructure imaging, *Langmuir*, **34**, 15014-15020, <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b01851>.
67. Johnson, A. S., Nehl, C. L., Mason, M. G., and Hafner, J. H. (2003) Fluid electric force microscopy for charge density mapping in biological systems, *Langmuir*, **19**, 10007-10010, <https://doi.org/10.1021/la035255f>.
68. Gramse, G., Gomila, G., and Fumagalli, L. (2012) Quantifying the dielectric constant of thick insulators by electrostatic force microscopy: effects of the microscopic parts of the probe, *Nanotechnology*, **23**, 205703, <https://doi.org/10.1088/0957-4484/23/20/205703>.

STUDYING THE STRUCTURE AND FUNCTION OF NUCLEOSOMES BY ATOMIC FORCE MICROSCOPY

Review

A. A. Ukraintsev^{1#}, M. M. Kutuzov^{1#}, and O.I. Lavrik^{1,2*}

¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: lavrik@niboch.nsc.ru*

² *Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia*

Chromatin is an epigenetic platform for the implementation of DNA-dependent processes. The nucleosome, as the basic level of chromatin compaction, largely determines its properties and structure. When studying the structure and functions of nucleosomes, physicochemical tools are actively used, such as magnetic and optical “tweezers,” “DNA curtains,” nuclear magnetic resonance, X-ray diffraction analysis and cryoelectron microscopy, as well as optical methods based on FRET. Despite the fact that these approaches make it possible to determine a wide range of structural and functional characteristics of chromatin and nucleosomes with high spatial and temporal resolution, atomic-force microscopy (AFM) complements the capabilities of these methods. This review presents the results of structural studies of nucleosomes in view of the development of the AFM method. The capabilities of AFM are considered in the context of the use of other physicochemical approaches.

Keywords: nucleosome, AFM, chromatin, single-molecule methods for studying biomolecules