

ПРИМЕНЕНИЕ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЕДИНИЧНЫХ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

©2012 г. И. В. САФЕНКОВА, А. В. ЖЕРДЕВ,
Б. Б. ДЗАНТИЕВ

Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН, Москва

I. Введение. II. Принцип измерения межмолекулярных взаимодействий методом атомно-силовой микроскопии. III. Имобилизация биомолекул при проведении атомно-силовой спектроскопии. IV. Требования к проведению эксперимента. V. Обработка экспериментальных данных. VI. Применение теории переходного состояния для описания разрыва межмолекулярного комплекса. VII. Расчет термодинамических и кинетических параметров межмолекулярных взаимодействий. VIII. Особенности характеристики поливалентных взаимодействий. IX. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Понимание механизмов межмолекулярных взаимодействий (фермент – ингибитор, антитело – антиген, белок-переносчик – гормон и др.) и их количественная характеристика имеет большое значение для описания разнообразных биохимических процессов [1–3]. Используемые в настоящее время методы экспериментального определения равновесных (K_d) и кинетических (k_{on} – ассоциации, k_{off} – диссоциации) констант межмолекулярных взаимодействий могут быть подразделены на две большие группы: основанные на

Принятые сокращения: АСМ – атомно-силовая микроскопия; ВШС – вирус шарки сливы; ЛРВ – лиганд-рецепторные взаимодействия; ССЕК – силовая спектроскопия единичных клеток; ССЕМ – силовая спектроскопия единичных молекул; ПЭГ – полиэтиленгликоль; ХСС – химическая силовая спектроскопия; АРТЕС – 3-аминопропилтриэтоксисилан.

Адрес для корреспонденции: safenkova@inbi.ras.ru

Работа выполнена при поддержке Межгосударственной целевой программы ЕврАзЭС «Инновационные биотехнологии» (государственный контракт № 16.М04.11.0022 от 29 апреля 2011 г.) и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН № 24.

разделении прореагировавших и непрореагировавших молекул или на регистрации изменений тех или иных характеристик системы при комплексообразовании. В ряде случаев используется мечение взаимодействующих молекул радиоактивными, флуоресцентными и другими метками (с подтверждением того, что это не влияет на характеристики взаимодействия, или с дополнительной количественной оценкой этого влияния). Для разделения реагирующих молекул и их комплексов используют равновесный диализ, избирательное осаждение, гель-фильтрацию, электрофоретическое разделение, проточное разделение в поперечном поле, аффинное связывание и другие методы [1, 4, 5]. Из свойств нативных или меченых реагентов, изменяющихся и регистрируемых при специфическом связывании, можно указать ферментативную активность, флуоресценцию, поляризацию флуоресценции [6–12]. Широко используются проточные биосенсоры, способные детектировать взаимодействие немеченых молекул [13–16]. Это, прежде всего, система BIAcore (GE Healthcare Life Sciences), а также сенсорные системы ProteOn™ Sensor Chip, CellKey® 384 System (Molecular Devices), Octet® RED384 (ForteBio), RAPid (TTP LabTech).

Однако, рассмотренные методы, несмотря на их разнообразие, не могут решить ряд проблем. Все они характеризуют совокупность межмолекулярных взаимодействий и, если эти процессы объединяют несколько разных реакций (при гетерогенности взаимодействующих молекул, возможности поливалентного связывания или образования комплексов разного состава), характеризуют каждую из этих реакций лишь посредством дополнительных допущений и математических приемов.

В связи с этим были предложены альтернативные методические решения, позволяющие непосредственно экспериментально охарактеризовать единичные межмолекулярные взаимодействия. К ним относятся методы на основе оптических [17] и магнитных пинцетов [18], камеры ламинарного потока [19, 20] и атомно-силовая микроскопия (АСМ) [21]. Во всех этих методах используется манипулирование единичными молекулами – с помощью лазера (оптический пинцет), магнитного поля (магнитный пинцет), потока жидкости (камеры ламинарного потока), механического зонда (АСМ).

Большая часть работ по регистрации единичных межмолекулярных взаимодействий на сегодняшний день выполнена с использованием АСМ. Накоплен существенный опыт как проведения экспериментов, так и обработки получаемых данных, рассмотрению которого и будет посвящен настоящий обзор.

II. ПРИНЦИП ИЗМЕРЕНИЯ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

АСМ принадлежит к семейству сканирующих зондовых микроскопий [22]. Техника АСМ (рис. 1), появившаяся в 1986 г., предоставила новые возможности для изучения биологических объектов [23–25]. Она основана на сканировании поверхности образца ультратонкой иглой, расположенной на свободном конце кантилевера (микромеханического зонда). Отклонения кантилевера, вызываемые взаимодействием с поверхностью, регистрируются высокопрецизионным оптическим детектором [26]. Получаемые результаты используются для описания рельефа образца. Передвижение зонда относительно поверхности образца осуществляет пьезосканер. Сканер может передвигаться в трех направлениях. Разрешение характеристики рельефа образца в вертикальном направлении (z) достигает нескольких ангстремов и ограничено только температурным дрейфом. Разрешение в горизонтальной плоскости (x – y) может быть менее нанометра и ограничено радиусом кривизны кантилевера [27]. Сканирование можно проводить не только в условиях вакуума и на воздухе, но и в жидкости, что применительно к биологическим объектам означает возможность приблизить условия их изучения к естественным [28–32].

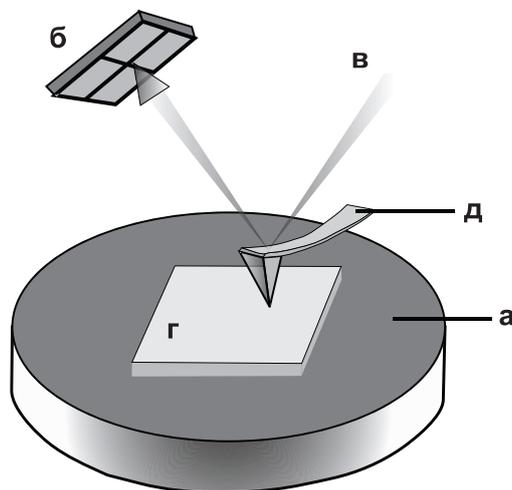


Рис. 1. Схема основных функциональных компонентов атомно-силового микроскопа (а – пьезосканер, б – оптический детектор, в – лазер, г – образец, д – кантилевер).

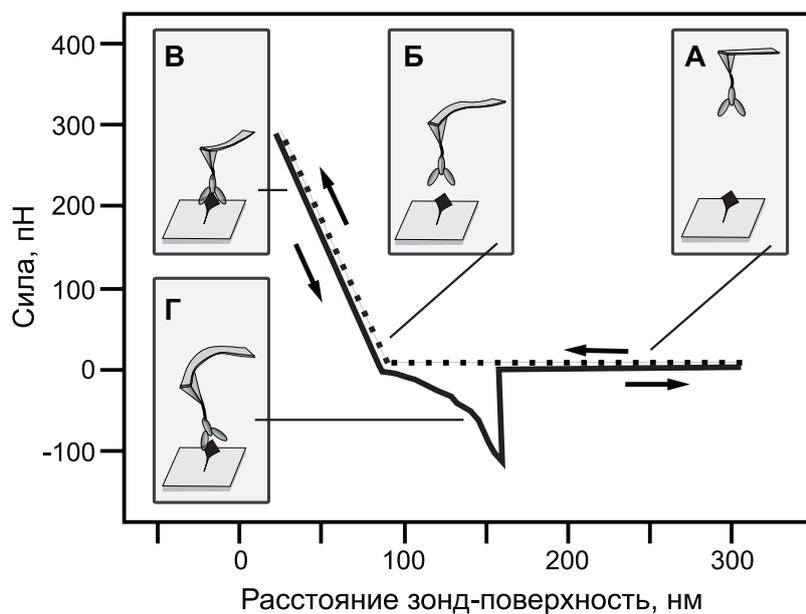


Рис. 2. Типичный вид силовой кривой, полученной методом атомно-силовой спектроскопии: пунктирная линия – подвод кантилевера, сплошная – отвод.

А–Г – варианты положения кантилевера относительно поверхности для разных участков силовой кривой.

Рассмотрим более подробно измерения в режиме атомно-силовой спектроскопии, при которых кантилевер движется в вертикальном направлении. После присоединения одной молекулы на иглу кантилевера, а второй молекулы на поверхность подложки, можно измерить силы взаимодействий молекул. Согласно закону Гука ($F = kd$, где F соответствует силе отрыва, k – константе жесткости кантилевера, d – отклонению кантилевера) сила отрыва прямо пропорциональна отклонению кантилевера. Силы взаимодействия оценивают исходя из силовых кривых – зависимостей отклонения иглы от перемещения кантилевера в вертикальном направлении.

Схема силовой кривой, отражающая подвод кантилевера к поверхности образца и последующий отвод, представлена на рис. 2. Вначале (рис. 2А) расстояние между зондом и поверхностью велико, взаимодействие зонд–поверхность отсутствует. По мере приближения зонда к поверхности происходит отклонение иглы от оси кантилевера за счет сил притяжения (рис. 2Б). Игла приходит в контакт с поверхностью

(рис. 2В); силы притяжения становятся больше жесткости кантилевера и сил отталкивания. На начальных этапах отвода кантилевера (рис. 2Г) игла остается в соприкосновении с поверхностью за счет специфических или неспецифических взаимодействий. Когда силы упругости станут больше сил связывания, зонд вернется в первоначальное положение (рис. 2А). Отметим наличие на кривой отвода локального минимума, соответствующего разрывающемуся межмолекулярному комплексу.

Благодаря программным методам обработки сигнала силовая кривая может быть преобразована в зависимость силы отрыва от перемещения в вертикальном направлении.

Наиболее существенными характеристиками кантилевера, определяющими константу жесткости (k) и тем самым влияющими на измерения в режиме атомно-силовой спектроскопии, являются химический состав, модуль упругости (E), ширина (w), толщина (t) и длина (L):

$$k = Ewt^3/(4L^3).$$

Предпочтительны короткие (<50 мкм) кантилеверы с небольшой (10 – 100 пН/нм) константой жесткости [33].

На игле кантилевера может быть иммобилизовано как низкомолекулярное соединение, так и объект микронного размера (например, клетка). В зависимости от иммобилизуемой структуры выделяют несколько вариантов атомно-силовой спектроскопии. В химической силовой спектроскопии (ХСС, рис. 3А) используется иммобилизация отдельных химических групп, в силовой спектроскопии единичных молекул (ССЕМ, рис. 3Б) – биоорганических молекул, в силовой спектроскопии единичных клеток (ССЕК, рис. 3В) – клеточных структур.

Для характеристики межмолекулярных взаимодействий наибольший интерес представляет ССЕМ, позволяющая изучать лиганд–рецепторные взаимодействия с равновесной константой диссоциации (K_D) от 10^{-5} М [34] до 10^{-15} М [35–38]. Так, еще в пионерских работах 1994–1995 г.г. ССЕМ была успешно применена на примерах комплементарных цепей ДНК [40], пары биотин–стрептавидина [21, 38], адгезии протеогликанов клетки [41]. Далее метод использовался для изучения широкого диапазона взаимодействий: антиген – антитело [30, 42, 43], белок – нуклеиновая кислота [44–48], нуклеиновая кислота – нуклеиновая кислота [49], пептид – нуклеиновая кислота [50], фермент – ингибитор [51].

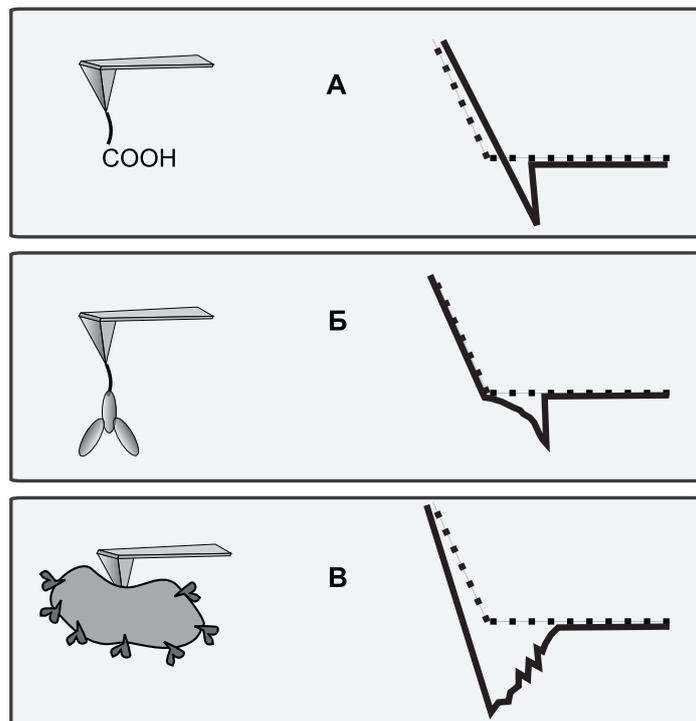


Рис. 3. Методы атомно-силовой спектроскопии: А – химическая силовая спектроскопия, Б – сканирующая спектроскопия единичных молекул, В – силовая спектроскопия единичных клеток.

Изображены иммобилизованные на игле структуры (слева) и схемы типичных силовых кривых (справа).

III. ИММОБИЛИЗАЦИЯ БИОМОЛЕКУЛ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ АТОМНО-СИЛОВОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Для корректной характеристики межмолекулярных взаимодействий методом АСМ следует минимизировать влияние иммобилизации на реакционные свойства молекул [52, 53], что означает выполнение следующих требований:

- сохранение нативной структуры и функциональности взаимодействующих реагентов;
- доступность центров связывания для взаимодействия;
- возможность свободной ориентации реагентов в пространстве;
- унифицированное присоединение взаимодействующих реагентов к поверхностям (подложка, кантилевер);

- минимальная вероятность отрыва иммобилизованных молекул от поверхности в ходе измерений;
- минимизация неспецифических взаимодействий между функционализированным кантилевером и подложкой;
- минимальное влияние на взаимодействие материала подложки или кантилевера.

В связи с этим, как правило, предпочтение отдают ковалентной пришивке реагентов. Такой способ иммобилизации гарантирует, что при отводе кантилевера разрыв произойдет внутри межмолекулярного комплекса (между лигандом и рецептором), а не между поверхностью и иммобилизованной молекулой.

Между поверхностью и иммобилизуемой молекулой, как правило, располагается линкер – линейный олиго- или полимер. Линкер обеспечивает присоединенной молекуле свободу вращения и тем самым делает сайты связывания более доступными. Кроме того, он увеличивает расстояние между поверхностью и молекулой, что нивелирует возможные воздействия (например, электростатической природы) подложки или кантилевера на изучаемый процесс.

Рассмотрим особенности иммобилизации реагентов на поверхности подложки и кантилевера.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ НА ПОВЕРХНОСТЬ ПОДЛОЖКИ.

В АСМ используют кремниевые [54] и стеклянные поверхности [55, 56], слюду [56, 57], высокоориентированный пиролитический графит [58], поверхности, покрытые золотом [59, 60] и др. Выбор подложки определяется природой иммобилизуемого объекта.

Существует ряд способов функционализации поверхности подложки, отличающихся по вводимым химическим группам. Чаще всего применяют обработку ионами двухвалентного металла (как правило, Ni^{2+} , Co^{2+}), полилизинном, полиаргинином, силанизирование поверхности с использованием 3-аминопропилтриэтоксисилана (APTES). На рис. 4 представлены варианты иммобилизации реагентов на поверхности слюды, включающие нековалентную иммобилизацию (рис. 4 А–В) и ковалентную иммобилизацию после функционализации (рис. 4 Г, Д).

Некоторые способы функционализации поверхности и примеры их использования для изучения межмолекулярных взаимодействий представлены в табл. 1. Как правило, ковалентная иммобилизация проводится для молекул белков и нуклеиновых кислот; физическую сорбцию используют при иммобилизации крупных объектов, обладающих множеством точек связывания с поверхностью.

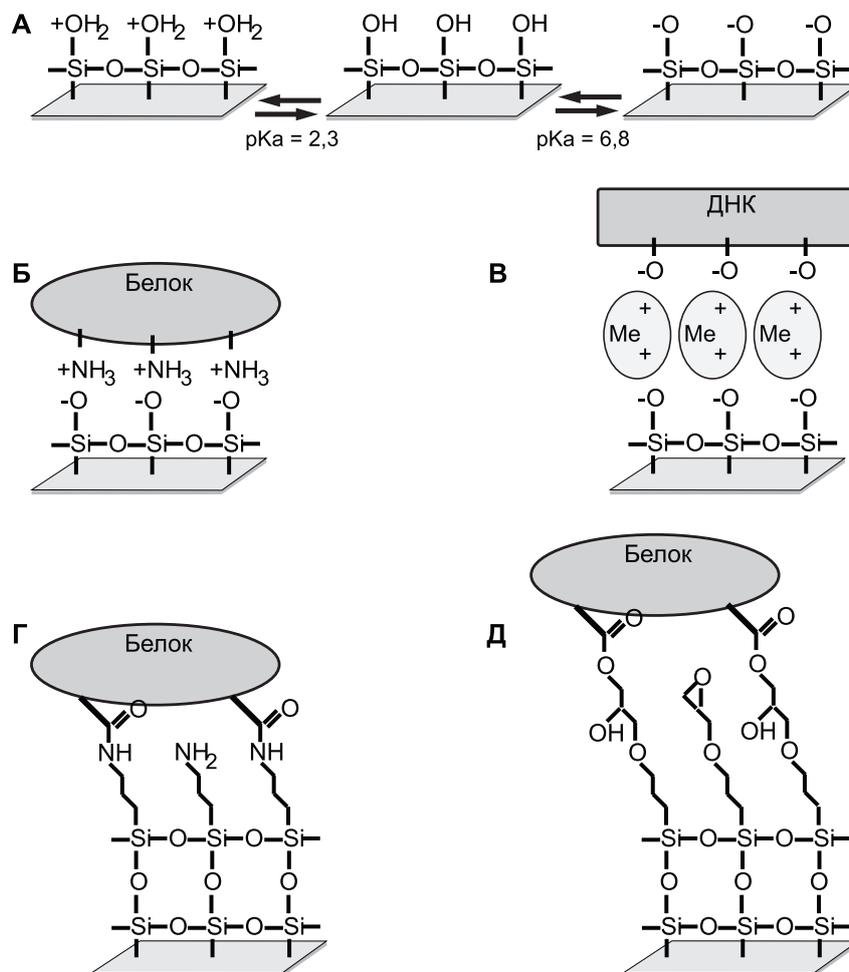


Рис. 4. Варианты использования слюды для иммобилизации.

А – изменение заряда в зависимости от pH буфера, Б – электростатическая сорбция белка, В – электростатическое связывание нуклеиновой кислоты с иммобилизованными ионами металлов, Г – введение аминогрупп посредством обработки 3-аминопропилтриэтоксисиланом и последующая ковалентная иммобилизация, Д – обработка поверхности эпоксисиланом и последующая ковалентная иммобилизация.

Таблица 1.
**Способы иммобилизации реагентов
 на поверхность подложек для ССЕМ**

Тип подложки	Способ иммобилизации	Объект иммобилизации	Изучаемое взаимодействие	Ссылки
Слюда	Силанизирование, 3-аминопропилтриэтоксисилан	ДНК	внутримолекулярное	[61]
Слюда	Электростатическое взаимодействие между поверхностью свежесколотой слюды и белком	белок (кадгерин)	димеризация в присутствии Ca^{2+}	[62]
Стекло	Силанизирование, введение комплекса Ni-NTA, взаимодействующего с N-терминальной His ₆ группой иммобилизуемого реагента	белок (титин)	димеризация	[63]
Слюда	Введение малеимидной группы (малеимид-силатран) на поверхность для образования ковалентной связи с иммобилизуемым реагентом	белок (SfiI, эндонуклеаза) и ДНК	ДНК-белок (SfiI)	[64]

ИММОБИЛИЗАЦИЯ НА ПОВЕРХНОСТЬ КАНТИЛЕВЕРА

При иммобилизации молекул на поверхность кантилевера возможность измерения именно единичных взаимодействий молекул обеспечивают небольшой радиус иглы кантилевера (≤ 10 нм) и ковалентная иммобилизация.

В работе [65] исследована зависимость от pH сил адгезии между кантилевером, функционализированным $-COOH$, $-CH_3$, $-OH$ или $-CH_2-OH$, и поверхностью, функционализированной этими же группами. На адгезию влияет также химический состав кантилевера (как правило, используют кремниевые или нитрид кремниевые кантилеверы). Например, при работе в жидкости игла может приобретать заряд, т.к. даже при успешной иммобилизации остается поверхность, не покрытая молекулами рецептора или лиганда. Для предотвращения артефактов, вызванных этим зарядом, перед иммобилизацией биомолекул, проводят озонирование кантилевера и силанизируют поверхность (рис. 5). Далее вводят функциональные группы, через которые ковалентно иммобилизуют линкер, реагирующий с активированной молекулой лиганда или рецептора.

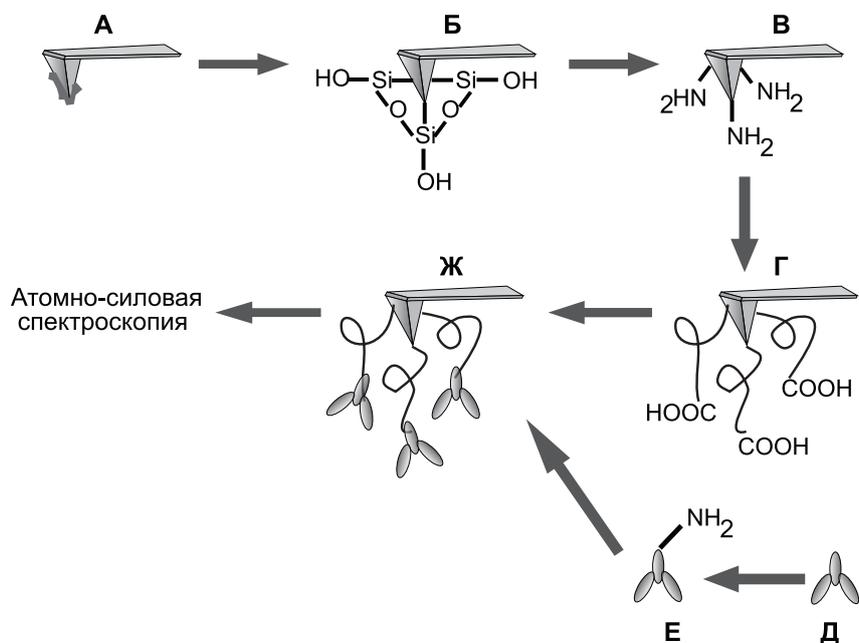


Рис. 5. Схема функционализации кремниевого или нитрид кремниевого кантилевера.

- А – немодифицированный кантилевер,
- Б – кантилевер после озонирования,
- В – кантилевер после введения аминогрупп,
- Г – кантилевер после введения линкера,
- Д – лиганд/рецептор,
- Е – активированный лиганд/рецептор,
- Ж – кантилевер с иммобилизованными молекулами лиганда/рецептора.

Для иммобилизации реагентов на поверхности кантилевера используют различные активаторы – N-гидроксисукцинимид и 2-пиридилдитиопропионат [62], 2-пиридилдитиопропионат [66], N-гидроксисукцинимид и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида гидрохлорид [41], малеимид [67], N-сукцинимидил-S-ацетилтиопропионат [67], нитрилотриацетат [68].

При неправильном выборе методики иммобилизации могут возникать артефакты, приводящие к множественным взаимодействиям и завышению истинных значений измеряемых характеристик [69–71].

Важную роль играет качественный и количественный контроль функционализации кантилевера. Качество функционализации можно

оценить по силовым кривым взаимодействия с реагентом, иммобилизованным на подложке (см раздел V). Известно несколько работ, в которых проверку функционализации проводили другими методами, например, методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии [72, 73].

IV. ТРЕБОВАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ ЭКСПЕРИМЕНТА

Рассмотрим требования к экспериментальному получению силовых кривых методом ССЕМ. Как показано в ряде работ [53, 74–76], ход силовой кривой зависит от скорости отвода кантилевера (pulling velocity, v) – перемещения в вертикальной плоскости в единицу времени. При очень низких скоростях отвода (менее 1 нм/с) температурный дрейф кантилевера приводит к отклонению при определении сил взаимодействия. Высокие скорости отвода (более 10 мкм/с) уменьшают вклад сил адгезии, однако приводят к гидродинамическому сопротивлению кантилевера и также искажают результаты измерения сил взаимодействия [36, 77]. При скорости отвода более 10 мкм/с гидродинамическая сила сопротивления, действующая на кантилевер, становится соразмерной с силами взаимодействия лиганд–рецептор [77]. Этот факт ограничивает максимальную скорость отвода в ССЕМ.

При расчете термодинамических параметров взаимодействия используют величину скорости отрыва (loading rate, r), которая определяется как изменение силы отрыва в единицу времени (Н/с). Соотношение между скоростью отрыва и скоростью отвода соответствует жесткости кантилевера ($r/v = k$).

Метод ССЕМ может быть применен для изучения не только межмолекулярных, но и внутримолекулярных взаимодействий. В данном случае один конец молекулы закрепляют на подложке, а второй – на кантилевере [78]. При отводе кантилевера молекула разворачивается, и регистрация сил позволяет характеризовать прочность внутримолекулярных связей. На рис. 6 приведена зависимость силы разворачивания молекулы белка филамина от скорости отвода и скорости отрыва, полученная в работе [79]. Как видно из рисунка, при разных скоростях отвода/отрыва возможны трехкратные отличия силы разворачивания. Кроме того, в зависимости от прикладываемой силы разворачивание молекулы филамина происходит по одному из двух энергетически отличающихся механизмов.

Влияние скорости отвода на величину силы, необходимой для разрушения межмолекулярного комплекса, не менее значительно. T.Maki

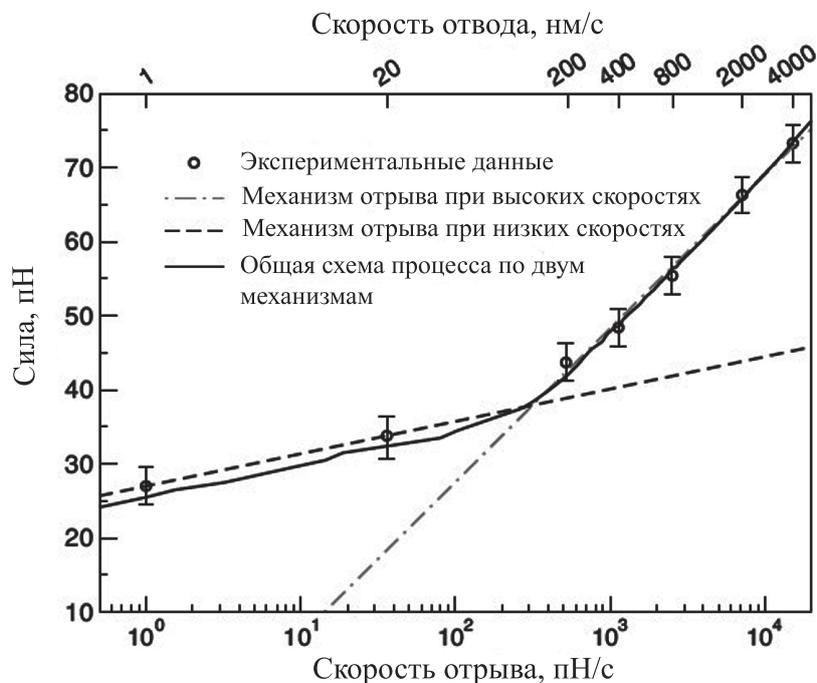


Рис. 6. Зависимость силы разворачивания молекулы филамина от скорости отвода кантилевера и скорости отрыва. Рисунок из работы [79] приведен с любезного разрешения издательства Elsevier.

и соавт. [75] изучали межмолекулярное взаимодействие PDZ-домена (характерного для многих белков сигнальных путей клеток) и специфичных к нему пептидов. На рис. 7 приведены зависимости силы от расстояния игла–поверхность для кантилевера, модифицированного пептидами, специфичными к PDZ-домену. Полученные зависимости убедительно демонстрируют отличия в значениях сил отрыва.

Таким образом, указывая силу отрыва, полученную из силовой кривой, следует обозначать скорость отвода, при которой проводились измерения. Если значения скорости отвода кантилевера не представлены, то корректное сравнение сил для разных пар взаимодействующих молекул невозможно. Использовать несколько скоростей отвода кантилевера также необходимо при измерении кинетических и термодинамических характеристик реакции комплексообразования (см. раздел VII) [80].

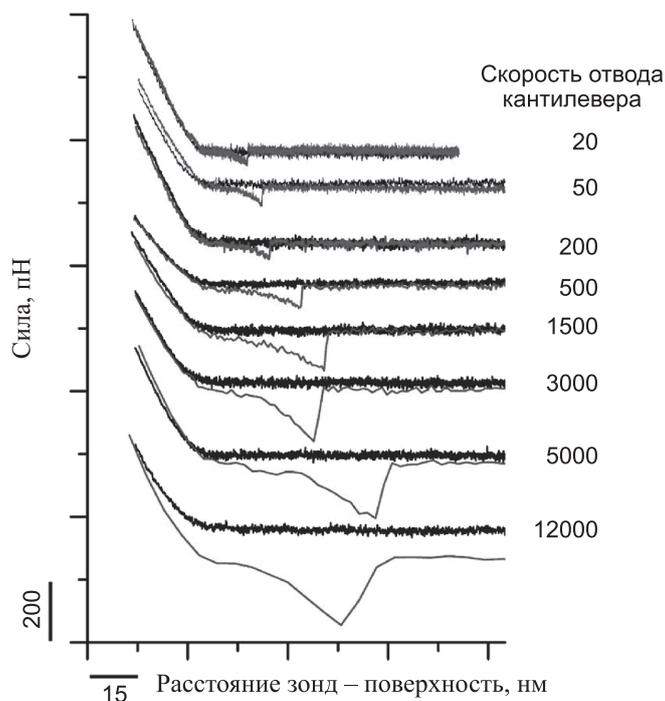


Рис. 7. Зависимости силы взаимодействия PDZ-домен – пептид от расстояния игла – поверхность, полученные при варьировании скорости отвода кантилевера от 20 до 12 000 нм/с.

Рисунок из работы [75] приведен с любезного разрешения издательства American Chemical Society.

IV. ОБРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ

При изучении единичных взаимодействий молекул методом атомно-силовой спектроскопии необходим анализ множества силовых кривых. Причина заключается в том, что получаемые силовые кривые имеют вариативный характер [39, 81], что является следствием вариативности энергетических состояний взаимодействующих молекул. Действительно, даже молекулы, иммобилизованные на подложку в одинаковых условиях, могут находиться в разных энергетических состояниях (подробнее см. раздел VI).

Достоверная количественная информация может быть получена путем статистического анализа большого массива силовых кривых. В связи с этим важным представляется выбор силовых кривых, характеризующих специфические события. Этот выбор производится на

основе особенностей силовых кривых. Рассмотрим (рис. 8) силовые кривые при различных неспецифических и специфических взаимодействиях.

Неспецифические взаимодействия немодифицированного кантилевера в вакууме или в жидкости с подложкой могут приводить к отклонению кантилевера и появлению на кривой отвода локальных минимумов (рис. 8А, Б). Пример отсутствия взаимодействий между модифицированными кантилевером и подложкой представлен на рис. 8В. Для специфических лиганд-рецепторных взаимодействий вид силовой кривой зависит от количества участвующих центров связывания. Множественные взаимодействия отличаются несколькими локальными минимумами на силовой кривой (рис. 8Г). При использовании длинных линкеров, соединяющих молекулу с кантилевером, отклонение кантилевера на кривой отвода сдвинуто вправо по оси абсцисс (рис. 8Д). Этот эффект связан с растяжением линкера в процессе отвода.

Как видно из рис. 8, при множественных взаимодействиях или неспецифической адгезии на силовых кривых возникают дополнительные точки отрыва. Так, рис. 8Г показывает, что при отводе кантилевера с иммобилизованными молекулами стрептавидина от поверхности, на которой находится биотин, происходит разрыв связи в двух местах. Дополнительные пики могут затруднять анализ результатов, мешать правильной интерпретации. Во избежание этого следует проводить такое количество измерений, которое будет удовлетворять требованиям статистической достоверности.

Обработка силовых кривых включает выделение локальных минимумов, определение их природы (адгезионные неспецифические, межмолекулярные специфические, внутримолекулярные, множественные специфические) и измерение сил отрыва. Для измерения сил отрыва проводят построение вертикальной проекции по оси ординат (рис. 9), соответствующей отрезку от локального минимума на силовой кривой отвода до горизонтального отрезка на кривой отвода. Эта вертикальная проекция соответствует значению силы отрыва лиганд-рецепторного комплекса. Результаты измерения сил отрыва для индивидуальных событий представляют в виде гистограмм.

Расчет силы отрыва на основе полученных силовых кривых также можно проводить с применением компьютерных программ [83–86]. Ряд программ специализируется на обработке силовых кривых с множественными точками отрыва [87–89].

При анализе силовых кривых необходимо исключать неспецифические взаимодействия. Специфичность взаимодействия определя-

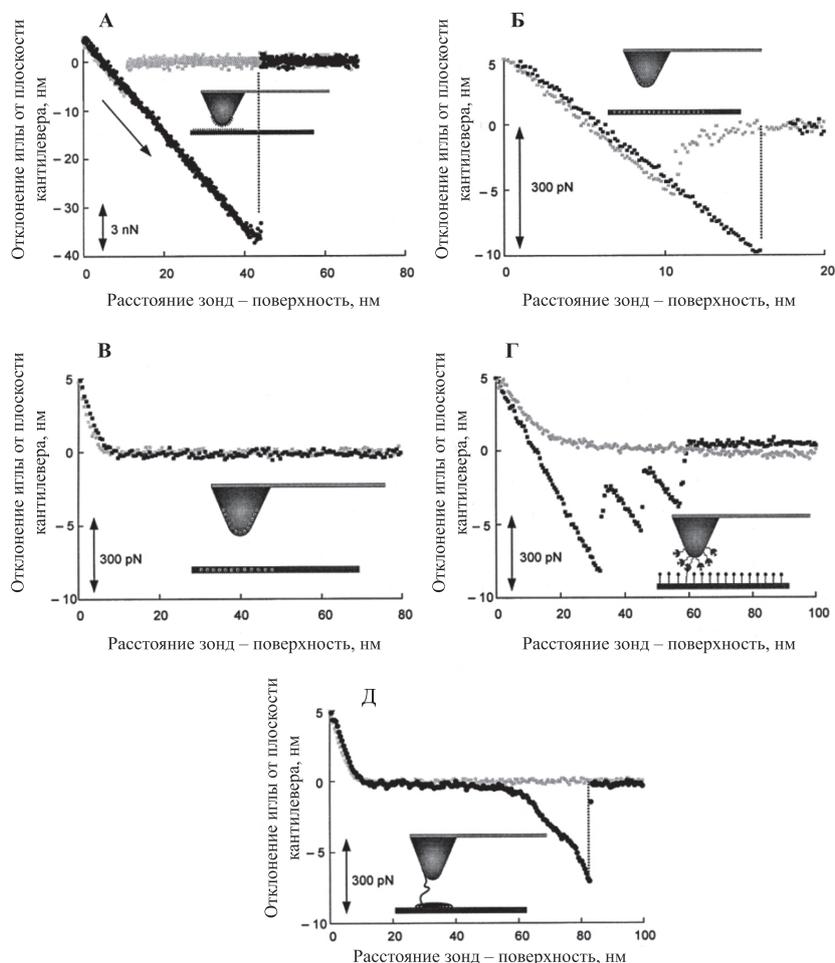


Рис. 8. Силовые кривые при неспецифических (А–В) и специфических (Г, Д) взаимодействиях.

А – силы Ван-дер-Ваальса между кремниевым кантилевером и кремниевой подложкой в вакууме,

Б – электростатические силы притяжения между кантилевером и образцом в жидкости,

В – электростатические силы отталкивания между кантилевером и образцом в жидкости,

Г – специфические взаимодействия между кантилевером, функционализированным стрептавидином, и биотинилированной поверхностью,

Д – разворачивание длинноцепочечной молекулы.

Светло-серые линии – кривые подвода, черные – кривые отвода.

Рисунок из работы [82] приведен с любезного разрешения издательства John Wiley and Sons.

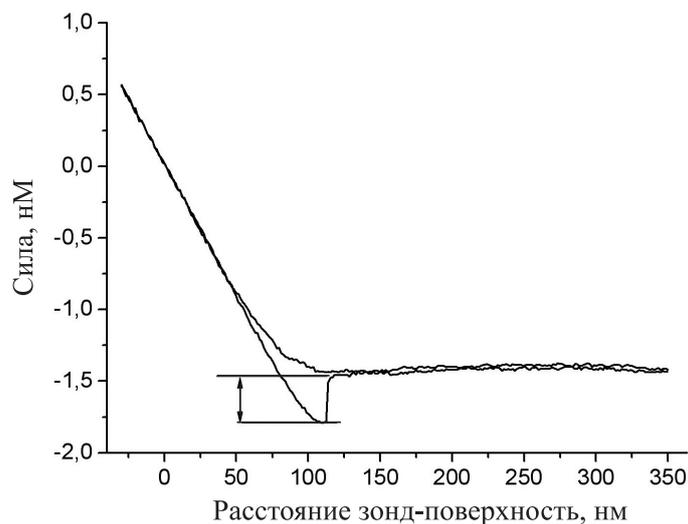


Рис. 9. Зависимость силы по координате Z от расстояния зонд–поверхность.

Стрелками обозначена вертикальная проекция по оси ординат, соответствующая силе отрыва, которую необходимо приложить для разрыва комплекса.

ется по форме силовой кривой (см. рис. 8) и при сравнении с силовыми кривыми, записанными в тех же условиях, но для невзаимодействующей пары молекул. W. Baumgartner и соавт. предложили математический алгоритм для разделения взаимодействий на специфические и неспецифические и продемонстрировали его эффективность на примере молекул кадгерина, которые при взаимодействии друг с другом образуют димер [90]. В зависимости от изучаемого комплекса и корректности выбранных протоколов иммобилизации на неспецифические взаимодействия может приходиться от 15 до 85% силовых кривых [31, 35, 37, 68, 74, 91–93].

Как правило, специфичность подтверждают, оценивая взаимодействие в присутствии ингибирующей (или конкурирующей) молекулы [21, 31, 37]. Ингибирующая (или конкурирующая) молекула блокирует реагент, иммобилизованный на кантилере или на подложке, что приводит к значительному (но обычно не полному [30, 74, 93]) снижению вероятности специфического разрыва. Эксперимент В.Вопани и соавт. ([74]) с использованием конкурирующей молекулы приведен в качестве примера на рис. 10. Как видно, после введения блокирующего реагента (азурина) количество специфических разрывов уменьшилось, что подтверждает специфичность оцениваемых взаимодействий. Эксперименты показывают, что

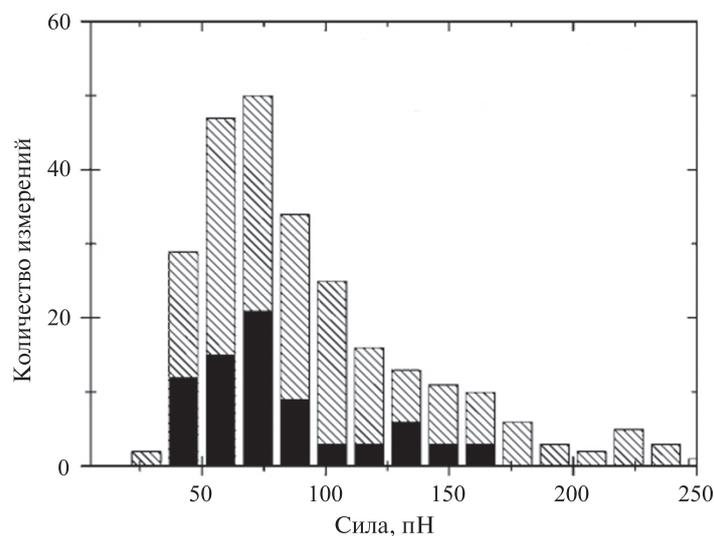


Рис. 10. Гистограммы распределения сил отрыва между молекулами азурина (иммобилизованными на подложку) и цитохрома С 551 (иммобилизованного на кантилере).

Черные столбцы – распределение, полученное в присутствии конкурирующего реагента (азурина); штрихованные – в отсутствии конкурирующего агента. В присутствии и в отсутствии конкурирующего агента проведено одинаковое количество измерений. Скорость отрыва – 3 нН/с.

Рисунок из работы [74] приведен с любезного разрешения издательства Elsevier.

вариативность взаимодействий наблюдается в любых условиях. Поэтому для получения достоверной характеристики необходимо достаточное количество измерений, обеспечивающее статистически достоверное распределение – как правило, не менее ста силовых кривых.

В дополнение к экспериментам с конкурирующим агентом можно провести опыты, в которых один из иммобилизованных взаимодействующих реагентов отсутствует или заменен на неспецифический реагент [85]. В этом случае специфические взаимодействия отсутствуют. Однако из-за изменившихся свойств контактирующих поверхностей возможны неспецифические связывания.

Для интерпретации силовых кривых важно знать реальное количество взаимодействующих молекул, которое может быть больше одной, в зависимости от условий иммобилизации (см. раздел III). Установить количество взаимодействующих молекул можно, изменив при повторной иммобилизации некоторые параметры (например, способ функционализации, линкер, концентрации реагентов).

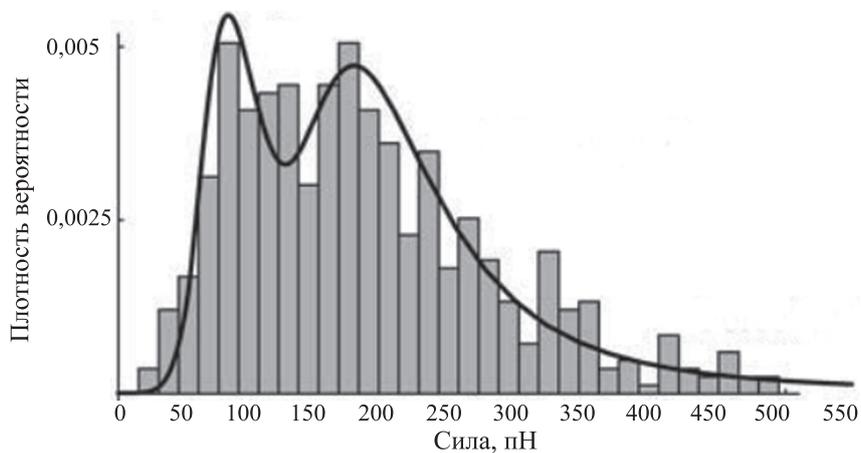


Рис. 11. Гистограмма распределения сил отрыва между молекулами стрептавидина и биотина. Скорость отрыва 2400 пН/с.

Рисунок из работы [94] приведен с любезного разрешения издательства Elsevier.

Если количество локальных минимумов на кривой отвода остается прежним, значит, множественные взаимодействия действительно происходят внутри одного комплекса лиганд-рецептор.

Гистограммы распределения сил отрыва обычно более или менее ассиметричны с одним или несколькими пиками [42, 94]. Распределение, полученное после исключения неспецифических взаимодействий, отражает отличия в энергетических состояниях или ориентации иммобилизованных реагентов, существование нескольких сайтов связывания, множественные взаимодействия [95, 96].

Пример гистограммы распределения сил отрыва, полученной F.Pincet и соавт. для взаимодействия биотин/стрептавидин ([94]), представлен на рис. 11. Наличие двух пиков позволяет заключить, что при подводе кантилевера с иммобилизованными молекулами биотина к поверхности с иммобилизованными молекулами стрептавидина образовался комплекс стрептавидин – две молекулы биотина. Первый пик (80 пН) соответствует отрыву от стрептавидина одной молекулы биотина, второй пик (170 пН) – полному разрыву комплекса, отрыву второй молекулы биотина.

VI. ПРИМЕНЕНИЕ ТЕОРИИ ПЕРЕХОДНОГО СОСТОЯНИЯ ДЛЯ ОПИСАНИЯ РАЗРЫВА МЕЖМОЛЕКУЛЯРНОГО КОМПЛЕКСА

Сила отрыва, полученная из силовых кривых, может быть пересчитана в термодинамические и кинетические параметры лиганд-рецепторных взаимодействий (ΔG , k_{off}), на основании теоретических представлений об энергетическом состоянии образуемого комплекса. Согласно теории переходного состояния переход молекул реагирующих веществ в продукты реакции осуществляется через активированный комплекс. Образование и распад активированного комплекса описывается при помощи величины потенциальной энергии реагирующих молекул.

На рис. 12 приведен график зависимости потенциальной энергии от координаты реакции. При движении исходной системы (AB комплекс) в сторону продуктов (A + B) существует потенциальный барьер, соответствующий образованию переходного состояния (A : B). Вершина барьера соответствует уровню колебательной энергии A : B, энергии активации промежуточного комплекса. Как видно из рис. 12, приложение к комплексу внешней силы понижает энергию активации – сдвигает вниз кривые 2–4 от отношению к кривой 1, уменьшая ΔG .

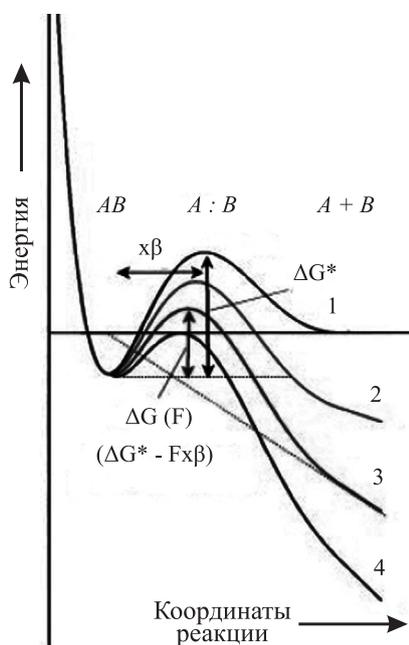


Рис. 12. Схема энергетических профилей процесса диссоциации комплекса биомолекул в системе ССЕМ без приложения внешней силы (кривая 1) и с внешней силой F (кривые 2–4).

Обозначения ΔG^* и $\Delta G(F)$ соответствуют свободной энергии активации.

Рисунок из работы [97] приведен с любезного разрешения издательства John Wiley and Sons.

Время жизни активированного комплекса ($1/k_{off}$) при отсутствии прикладываемых извне сил зависит от энергетического барьера. Однако наложение силы, направленной на разрыв комплекса, может привести к более быстрому преодолению потенциального барьера. Силой отрыва следует считать наиболее вероятную силу, разрушающую комплекс лиганд–рецептор [54, 97]. Реассоциация комплекса под действием данной силы становится маловероятной.

Модель разрыва связей в присутствии внешних сил, основанную на теории переходного состояния, предложил G.I.Bell [98]. Согласно ее положениям свободная энергия комплекса уменьшается внешней силой ($\Delta G^* - Fx_b$, где x_b – ширина энергетического барьера). Как показали E.Evans и K.Ritchie [80], разрыв связей под действием отвода кантилевера с постоянной скоростью (dF/dt) происходит в момент времени, определяемый величиной этой скорости.

VI. РАСЧЕТ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ И КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

Экспериментальное измерение константы связывания и кинетических констант межмолекулярного комплекса в атомно-силовых экспериментах отличается от традиционных подходов биохимической кинетики. Традиционная интерпретация процесса основывается на обратимости реакции:



где L – лиганд, R – рецептор, RL – лиганд-рецепторный комплекс, k_{on} , k_{off} – константы скоростей образования и распада комплексов лиганда с рецептором (ассоциации и диссоциации, прямой и обратной реакции).

Для этой системы (с одной субпопуляцией моновалентного рецептора и одновалентным лигандом) экспериментально получают концентрационные зависимости содержания свободного и связанного лигандов и рассчитывают кинетические константы взаимодействия.

В системе ССЕМ при подводе кантилевера происходит взаимодействие фиксированных лиганда и рецептора с образованием одного комплекса. Получение концентрационных зависимостей в этом случае невозможно, и для расчета термодинамических и кинетических параметров используют среднее время жизни комплекса (τ).

Известно, что среднее время жизни комплекса обратно пропорционально кинетической константе диссоциации:

$$\tau(0) = \frac{1}{k_{off}}. \quad (2)$$

С другой стороны, среднее время жизни комплекса в растворе описывается уравнением Больцмана:

$$\tau(0) = \tau_{osc} \exp \frac{E_{\beta}}{k_B T}, \quad (3)$$

где τ_{osc} – величина, обратная собственной частоте колебаний, E_{β} (ΔG) – энергетический барьер диссоциации, k_B – константа Больцмана, T – температура.

При действии на комплекс лиганд–рецептор внешней силы время его жизни определяется следующим уравнением

$$\tau(F) = \tau_{osc} \exp \frac{E_{\beta} - Fx_{\beta}}{k_B T}, \quad (4)$$

где x_{β} – расстояние от энергетического барьера до энергетического минимума (ширина энергетического барьера).

Для расчета константы скорости диссоциации межмолекулярного комплекса на основании атомно-силовых экспериментов используют модель, предложенную E. Evans и K. Ritchie [80] (см. раздел VI). Необходимо измерить силы отрыва при разных скоростях отвода:

$$r = \frac{df}{dt}, \quad (5)$$

где r – скорость отрыва.

Согласно модели Bell-Evans, сила отрыва линейно зависит от логарифма скорости отрыва.

$$F = \frac{k_B T x_{\beta}}{x_{\beta}} \ln \frac{rx_{\beta}}{k_{off} k_B T}. \quad (6)$$

Построив график зависимости силы отрыва от логарифма скорости отвода, можно найти расстояние от энергетического барьера до энергетического минимума и кинетическую константу диссоциации. Действительно, $(k_B T x_{\beta})/x_{\beta}$ соответствует наклону прямой, а $\ln(Tx_{\beta})/(k_{off} k_B T)$ – её пересечению с осью ординат (F_0). Таким образом, кинетическая константа диссоциации определяется согласно уравнению (7):

$$k_{off} = \frac{x_{\beta}}{k_B T} \exp F_0 \quad (7)$$

Таблица 2.
**Параметры лиганд-рецепторных взаимодействий,
полученные методом ССЕМ**

Лиганд–рецептор	Сила отрыва, пН	Скорость отрыва канти-левера, нН/с	$k_{\text{off}}, \text{c}^{-1}$	Ссылки
$\alpha\beta$ интегрин–специфический связывающий пептид	20 ± 7	10	0,13	[93]
Кадгерин–кадгерин	35 ± 16	10	$\sim 1,8$	[62]
p53 (белок, супрессор опухолей)–mdm2 (домен убиквитин-лигазы, взаимодействующий с p53)	105 ± 6	3	$\sim 1,5$	[99]
Лизоцим–Fv фрагмент антитела против лизоцима	55 ± 10	10	0,001	[72]
Муцин 1–антитело	120	10	$\sim 2,6 \cdot 10^{-3}$	[95]
Флуоресцеин–Fv фрагмент антитела против флуоресцеина	160 ± 10	10	0,062	[76]
Азурин–цитохром c551	95 ± 1	10	$\sim 6-14$	[67, 74]
Азурин–p53 (белок, супрессор опухолей)	75 ± 15	10	$\sim 0,09$	[100]
Карбоангидраза–сульфонамид	65	10	0,8–3,4	[101]
Тромбин–аптамер к тромбину	4,5	3	нет данных	[91]
PDZ-домен–специфический связывающий пептид	120	10	0,03	[75]
Биотин–авидин	130	1	$\sim 6,5 \cdot 10^{-6}$	[102]
Биотин–стрептавидин	150	1	$\sim 1,7 \cdot 10^{-5}$	[102]

В табл. 2 приведены параметры взаимодействий для разных лиганд–рецепторных пар, измеренные методом ССЕМ.

Для оценки свободной энергии реакции (ΔG) в неравновесных процессах существует модель, разработанная С. Jarzynski [103, 104]. Ниже представлено основное уравнение модели:

$$\exp(-\Delta G/k_B T) = \int \rho(W_\lambda) \exp(-W_\lambda/k_B T) d W_\lambda, \quad (8)$$

где W_λ – механическая работа неравновесного процесса (λ), $\rho(W_\lambda)$ – распределение работы неравновесного процесса.

Данную модель использовали для оценки ΔG биомолекулярных комплексов по результатам атомно-силовых экспериментов [105–107]. Для этого в уравнении (6) кинетическую константу диссоциации заменяли на время жизни комплекса согласно уравнению (2) и получали

$$F = \frac{k_B T x_\beta}{x_\beta} \ln \frac{\tau x_\beta}{k_B T}. \quad (9)$$

Далее по пересечению с осью ординат зависимости силы отрыва от логарифма скорости отвода определяли время жизни комплекса. Измерив время жизни при нескольких значениях температуры, строили зависимость логарифма времени жизни от температуры и определяли ΔG согласно уравнению 3.

Как показано в работе W.Liu и соавт. [105], посвященной изучению взаимодействия мембранных белков методом АСМ, по зависимости времени жизни комплекса от температуры можно также определить энтальпию (ΔH) и энтропию (ΔS) реакции:

$$\frac{1}{\tau} = k \exp \frac{\Delta S}{k_B} \exp \frac{-\Delta H}{k_B T}. \quad (10)$$

VIII. ОСОБЕННОСТИ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОЛИВАЛЕНТНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

Определение констант взаимодействий и сил единичного взаимодействия между поливалентными объектами (белки, ДНК, вирусы, клетки и др.) является существенно более сложной задачей, т.к. образующиеся комплексы могут отличаться по составу и по количеству межмолекулярных связей. Количественному описанию поливалентных взаимодействий посвящен ряд работ, отличающихся по используемым моделям и математическому аппарату [108–115].

T.J. Wickham и соавт. [111] описывают три модели связывания вирусов с рецепторами клеток, основанные на поливалентности и эффекте пространственного насыщения рецепторов: (1) взаимодействие вирус/рецептор при стехиометрическом соотношении 1 : 1; (2) вирус взаимодействует с несколькими рецепторами на поверхности клетки, но насыщение не достигается; (3) вирус взаимодействует с несколькими рецепторами на поверхности клетки с возможностью насыщения сайтов связывания. Модели позволяют предсказать количество рецепторов на поверхности клетки и аффинность взаимодействия.

M. Mammen и соавт. [114] обобщают большой массив экспериментальных и теоретических данных по естественным поливалентным структурам, обсуждая ключевую роль энтропийного фактора в поливалентных взаимодействиях (рис. 13). На примере взаимодействия полимерной сиаловой кислоты с молекулами гемагглютинина, экспонированными на поверхности вируса (рис. 14), подтверждаются уменьшение энтропии и стерическая стабилизация в поливалентных комплексах, обуславливающие их термодинамическую оправданность.

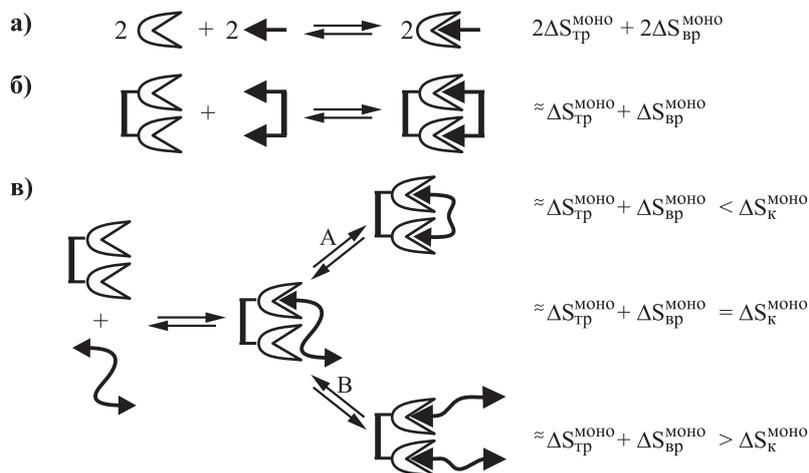


Рис. 13. Вклад трансляционной ($\Delta S_{\text{тр}}^{\text{МОНО}}$), вращательной ($\Delta S_{\text{вр}}^{\text{МОНО}}$) и конформационных ($\Delta S_{\text{к}}^{\text{МОНО}}$) энтропий в моновалентные (а), жесткие бивалентные (б) и подвижные бивалентные (в) взаимодействия.

Рисунок из работы [114] приведен с любезного разрешения издательства John Wiley and Sons.

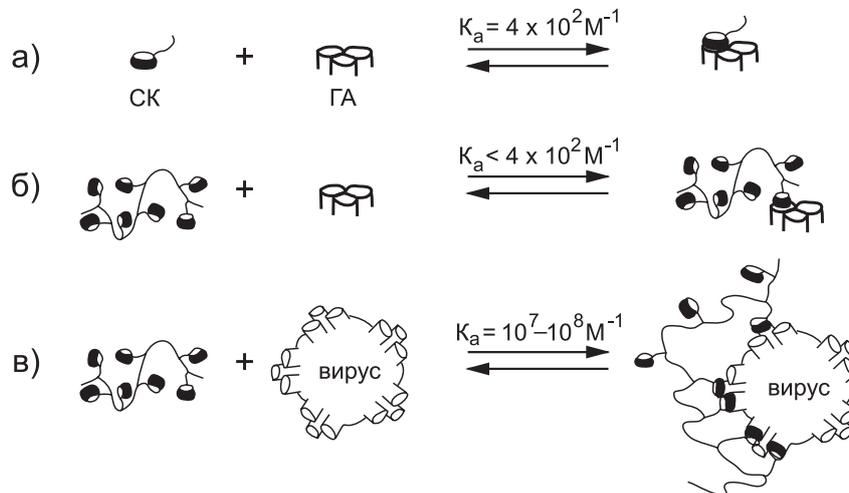


Рис. 14. Обратимые реакции взаимодействия сиаловой кислоты (СК) и гемагглютинина (ГА): а) моновалентная СК и триплет ГА, б) поливалентная СК и триплет ГА; в) поливалентная СК и ГА на поверхности вируса.

Рисунок из работы [114] приведен с любезного разрешения издательства John Wiley and Sons.

Существенные отличия в энергиях моно- и поливалентных взаимодействий позволяют рассчитывать на информативность их сопоставления с использованием методов АСМ, однако на сегодняшний день имеются лишь единичные примеры таких исследований. Сравнение констант моно- и бивалентных взаимодействий описано в нескольких публикациях [73, 116, 117].

Интересная работа была проведена на примере молекул порфирина, иммобилизованных на подложке так, чтобы обеспечить одновременное взаимодействие одной или двух («порфириновые щипцы») молекул с наночастицей фуллерена (C60), иммобилизованной на кантилере [73]. Как видим (рис. 15), бивалентное взаимодействие отличается от моновалентного как по форме силовых кривых и зависимостям силы отрыва от растяжения полимера, так и по гистограмме распределения сил отрыва. Для моновалентного взаимодействия наблюдается мономодальное распределение, для бивалентного – бимодальное. Показан также неаддитивный эффект при переходе от моновалентного к бивалентному взаимодействию. Наиболее вероятная сила отрыва при моновалентном взаимодействии соответствует 29 ± 6 пН. При бивалентном взаимодействии получено бимодальное распределение; первый пик – 32 ± 8 пН, второй пик – 75 ± 15 пН.

Крайне интересным, но и наиболее сложным является применение ССЕМ для количественной характеристики взаимодействий антигенов с корпускулярными антигенами, несущими на своей поверхности большое число антигенных детерминант (вирусные частицы, бактериальные клетки) или для изучения межклеточных взаимодействий. Целенаправленное изучение поливалентных взаимодействий методом ССЕМ проводили лишь в нескольких работах [95, 118–121]. А. Gomez-Casado и соавт. [121] рассматривали поливалентные взаимодействия на примере системы адамантан/ β -циклодекстрин. На кантилевер иммобилизовали одну, две или три молекулы адамантана, а β -циклодекстрин иммобилизовали на подложку. Интересно, что для моновалентного комплекса адамантан/ β -циклодекстрин не наблюдалось зависимости силы разрыва от скорости отвода, тогда как для би- и тривалентного зависимость прослеживалась – от 140 до 184 пН для бивалентного и от 175 до 210 пН для тривалентного при варьировании скорости отвода от 10 до 1000 нм/с (рис. 16). Кинетическая константа диссоциации, определенная согласно уравнению (7), составила $0,2 \text{ с}^{-1}$ для би- и $0,004 \text{ с}^{-1}$ для тривалентного взаимодействия.

Примером комплекса, образованного множественными взаимодействиями, является иммунный комплекс вируса шарки сливы, ВШС

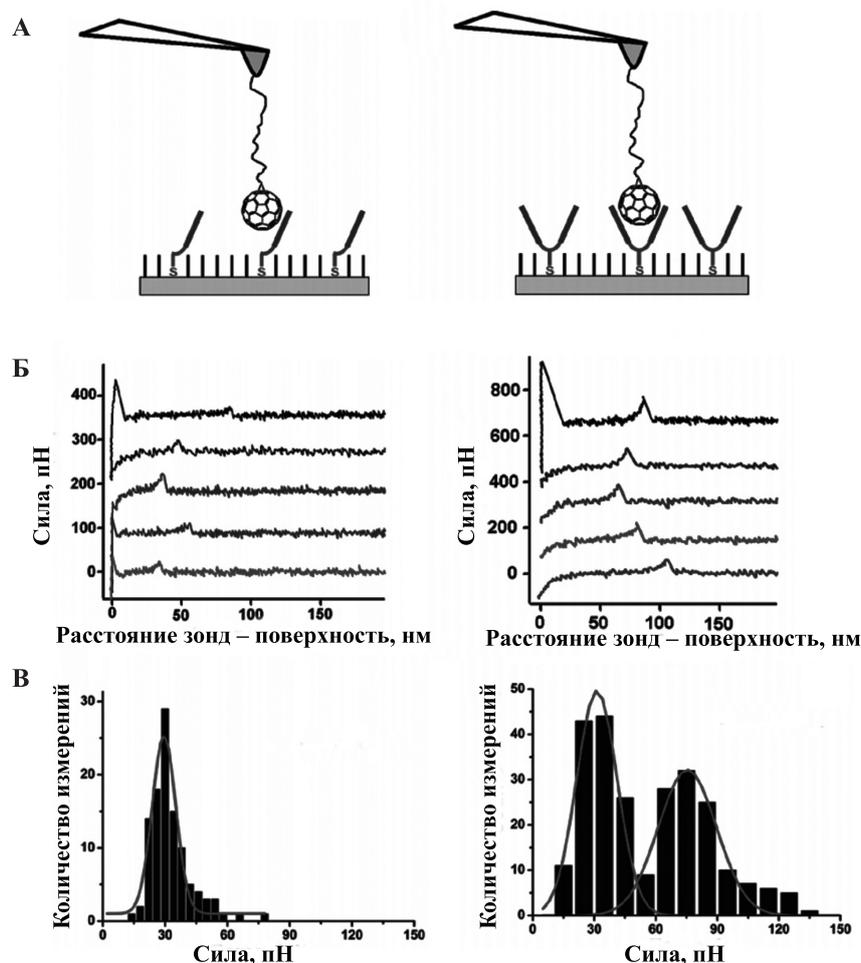


Рис. 15. Характеристика взаимодействия между С60 и порфирином методом ССЕМ.

(а) Схемы эксперимента по измерению взаимодействия между С60 и молекулой порфирина (слева), либо «порфириновыми щипцами» (справа).

(б) Силовые кривые, полученные при взаимодействии С60, иммобилизованного на поверхности кантилевера с молекулой порфирина (слева) или «порфириновыми щипцами» (справа), иммобилизованными на подложке.

(в) Гистограммы распределения сил отрыва между С60 и порфирином (слева) либо «порфириновыми щипцами» (справа).

Скорость отвода 5000 ± 500 пН/с.

Рисунок из работы [73] приведен с любезного разрешения издательства American Chemical Society.

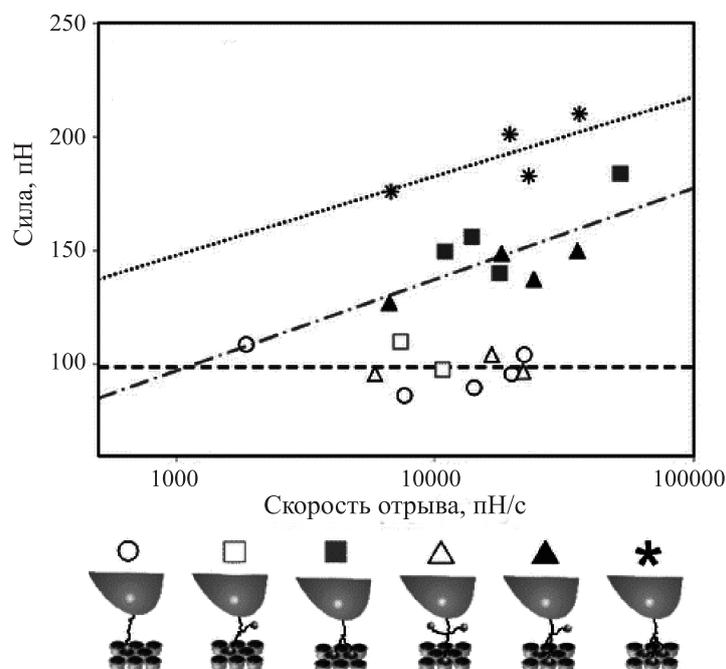


Рис. 16. Зависимость силы отрыва от скорости отрыва при моно-, би- и тривалентном взаимодействии молекул адамантана с β -циклодекстрином.

Символы \circ , \square , Δ соответствуют экспериментальным данным, прямые линии являются аппроксимацией по модели Evans.

Рисунок из работы [121] приведен с любезного разрешения издательства American Chemical Society

(нитевидный вирус, состоит из более чем 2000 копий идентичного белка оболочки (молекулярная масса белка – 36,4 kDa), окружающих единственную молекулу РНК) с бивалентной молекулой моноклональных IgG, специфичных к данному вирусу, изученный авторами в работах [122, 123].

Межмолекулярные взаимодействия измеряли при подводе кантилевера с ковалентно иммобилизованным антителом (специфичным или неспецифичным к ВШС) к поверхности с адсорбированным вирусом; в момент отвода регистрировали силу, необходимую для разрушения комплекса. Было получено не менее 100 силовых кривых для специфических и неспецифических взаимодействий. Гistogramмы распределения сил отрыва приведены на рис. 17. Для антител к ВШС наблюдается три пика, один из которых соответствует неспе-

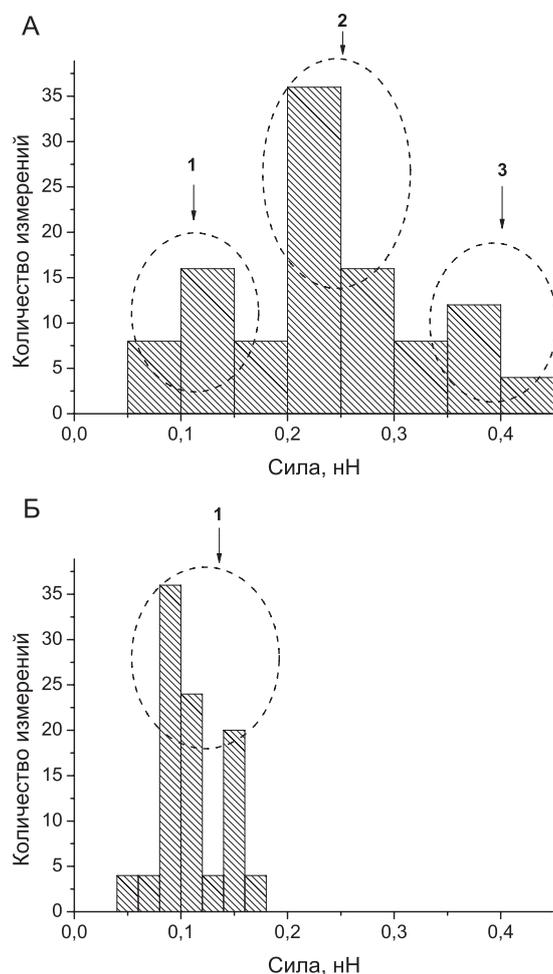


Рис. 17. Гистограммы распределения сил взаимодействия специфических (А) и неспецифических (Б) антител, иммобилизованных на кантилере, с ВШС, иммобилизованным на поверхности слюды. Пик 1 соответствует силам, соответствующим неспецифическому взаимодействию, 2, 3 – специфическому моно- и бивалентному взаимодействию, соответственно.

цифическому взаимодействию (120 ± 70 пН), второй (230 ± 90 пН) и третий (390 ± 70 пН) – специфическому [123]. Второй и третий пики можно интерпретировать как иммунные взаимодействия с участием одного или двух сайтов связывания антитела. Для неспецифических взаимодействий получена мономодальная гистограмма с пиком при 107 ± 30 пН.

IX. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

АСМ является эффективным инструментом для изучения межмолекулярных взаимодействий. Измерения, проведенные методом АСМ в режиме атомно-силовой спектроскопии, позволяют характеризовать не совокупность взаимодействий, а единичные межмолекулярные взаимодействия. Таким образом, если процессы объединяют несколько разных реакций (при гетерогенности взаимодействующих молекул, возможности поливалентного связывания или образования комплексов разного состава), методом атомно-силовой спектроскопии можно экспериментально изучить каждую из них.

Преимуществом АСМ в сравнении с другими методами для характеристики единичных межмолекулярных взаимодействий является возможность контролировать скорость отрыва одного из участников взаимодействия от другого, что позволяет оценить не только силы отрыва, но и кинетические и термодинамические характеристики разрыва комплекса. Благодаря возможностям АСМ гетерогенность популяций не оказывает влияния на измерение процессов комплексообразования. Для силовой спектроскопии существуют теоретические модели, позволяющие трансформировать исходные экспериментальные данные (силу и скорость отрыва) в термодинамические и кинетические параметры реакции (кинетическую константу диссоциации, свободную энергию Гиббса, энтальпию, энтропию). Кроме того, достоинством метода является возможность измерения кинетической константы диссоциации без влияния одновременно происходящих процессов реассоциации лиганд-рецепторного комплекса. Представляется перспективным изучение методом АСМ поливалентных взаимодействий, для которых определение констант представляет проблему в связи со сложной стехиометрией реакции.

Среди ограничений метода следует отметить необходимость иммобилизации реагентов, как правило, ковалентной. Однако на сегодняшний день существует большое количество схем и подходов по функционализации подложек и кантилеверов, которые могут быть использованы в этих экспериментах.

Применение атомно-силовой микроскопии позволяет получить уникальные характеристики образования единичных межмолекулярных комплексов, важные для изучения механизмов различных лиганд-рецепторных взаимодействий.

Следует отметить, что интенсивные работы в области изучения взаимодействий методом атомно-силовой микроскопии делают практически нереальным подведение итогов. Постоянно появляются

научные работы, расширяющие представления о возможностях применения этого метода для новых объектов. Однако авторы надеются, что их работа позволит исследователям, интересующимся этой перспективной областью, получить основные сведения об экспериментальных и теоретических подходах к характеристике лиганд-рецепторных взаимодействий методом АСМ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. (2001) Известия Академии наук. Серия химическая, **50**, 1709–1717.
2. Gurevich, K.G., Agutter, P.S., Wheatley, D.N. (2003) Cell. Signal., **15**, 447–453.
3. Bongrand, P. (1999) Rep. Progr. Phys., **62**, 921–968.
4. Porstmann, T., Kiessig, S.T. (1992) J. Immunol. Methods, **150**, 5–21.
5. Sanderink, G.J., Artur, Y., Siest, G. (1988) J. Clin. Chem. Clin. Biochem., **26**, 795–807.
6. Monsellier, E., Bedouelle, H. (2005) Protein Eng. Des. Sel., **18**, 445–456.
7. Le, X.C., Pavski, V., Wang, H.L. (2005) Can. J. Chem., **83**, 185–194.
8. Landon, L.A., Harden, W., Illy, C., Deutscher, S.L. (2004) Anal. Biochem., **331**, 60–67.
9. Lagerkvist, A.C., Foldes-Papp, Z., Persson, M.A.A., Rigler, R. (2001) Protein Sci., **10**, 1522–1528.
10. Wan, Q.H., Le, X.C. (1999) Anal. Chem., **71**, 4183–4189.
11. Bobrovnik, S. (2005) J. Biochem. Biophys. Methods, **65**, 30–44.
12. Smith, D.S., Eremin, S.A. (2008) Anal. Bioanal. Chem., **391**, 1499–1507.
13. Myszka, D.G., Morton, T.A., Doyle, M.L., Chaiken, I.M. (1997) Biophys. Chem., **64**, 127–137.
14. Quinn, J.G., O'Kennedy, R. (2001) Anal. Biochem., **290**, 36–46.
15. Katsamba, P.S., Navratilova, I., Calderon-Cacia, M., Fan, L., Thornton, K., Zhu, M., Bos, T.V., Forte, C., Friend, D., Laird-Offringa, I., Tavaras, G., Whatley, J., Shi, E., Widom, A., Lindquist, K.C., Klakamp, S., Drake, A., Bohmann, D., Roell, M., Rose, L., Dorocke, J., Roth, B., Luginbuhl, B., Myszka, D.G. (2006) Anal. Biochem., **352**, 208–221.
16. Tanius, F.A., Nguyen, B., Wilson, W.D. (2008) Methods Cell Biol., **84**, 53–77.
17. Miyata, H., Yasuda, R., Kinoshita, K. (1996) Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj., **1290**, 83–88.
18. Evans, E., Ritchie, K., Merkel, R. (1995) Biophys. J., **68**, 2580–2587.
19. Kaplanski, G., Farnarier, C., Tissot, O., Pierres, A., Benoliel, A.M., Alessi, M.C., Kaplanski, S., Bongrand, P. (1993) Biophys. J., **64**, 1922–1933.
20. Alon, R., Hammer, D.A., Springer, T.A. (1995) Nature, **374**, 539–542.
21. Florin, E., Moy, V., Gaub, H. (1994) Science, **264**, 415–417.
22. Balnois, E., Papastavrou, G., Wilkinson, K.J. Force Microscopy and Force Measurements of Environmental Colloids, in: Environmental Colloids and Particles. 2007, New York: John Wiley & Sons, Inc, 405–467.
23. Archakov, A.I., Ivanov, Y.D., Lisitsa, A.V., Zgoda, V.G. (2007) Proteomics, **7**, 4–9.
24. Archakov, A.I., Ivanov, Y.D. (2011) Biochim. Biophys. Acta, **1814**, 102–110.
25. Kiselyova, O.I., Yaminsky, I.V. (2002) Phys. Low-Dim. Struct., **3–4**, 1–26.
26. Binnig, G., Quate, C.F., Gerber, C. (1986) Phys. Rev. Lett., **56**, 930.

27. Butt, H.J., Cappella, B., Kappl, M. (2005) *Surf. Sci. Rep.*, **59**, 1–152.
28. Moy, V.T., Florin, E.L., Gaub, H.E. (1994) *Science*, **266**, 257–259.
29. Dammer, U., Hegner, M., Anselmetti, D., Wagner, P., Dreier, M., Huber, W., Guntherodt, H.J. (1996) *Biophys. J.*, **70**, 2437–2441.
30. Hinterdorfer, P., Baumgartner, W., Gruber, H.J., Schilcher, K., Schindler, H. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 3477–3481.
31. Ros, R., Schwesinger, F., Anselmetti, D., Kubon, M., Schafer, R., Pluckthun, A., Tiefenauer, L. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 7402–7405.
32. Тузов И.В., Яминский И.В. (1995) *Известия Академии наук. Серия химическая*, **44**, 2073–2078.
33. Viani, M.B., Schaffer, T.E., Paloczi, G.T., Pietrasanta, L.I., Smith, B.L., Thompson, J.B., Richter, M., Rief, M., Gaub, H.E., Plaxco, K.W., Cleland, A.N., Hansma, H.G., Hansma, P.K. (1999) *Rev. Sci. Instrum.*, **70**, 4300–4303.
34. Gopalakrishnan, M., Forsten-Williams, K., Cassino, T.R., Padro, L., Ryan, T.E., Tauber, U.C. (2005) *Eur. Biophys. J.*, **34**, 943–958.
35. Yuan, C., Chen, A., Kolb, P., Moy, V.T. (2000) *Biochem.*, **39**, 10219–10223.
36. De Paris, R., Strunz, T., Oroszlan, K., Güntherodt, H.-J., Hegner, M. (2000) *Single Molecules*, **1**, 285–290.
37. Allen, S., Davies, J., Dawkes, A.C., Davies, M.C., Edwards, J.C., Parker, M.C., Roberts, C.J., Sefton, J., Tendler, S.J.B., Williams, P.M. (1996) *FEBS Lett.*, **390**, 161–164.
38. Lee, G.U., Kidwell, D.A., Colton, R.J. (1994) *Langmuir*, **10**, 354–357.
39. Bizzarri, A.R., Cannistraro, S. (2010) *Chem. Soc. Rev.*, **39**, 734–749.
40. Lee, G., Chrisey, L., Colton, R. (1994) *Science*, **266**, 771–773.
41. Dammer, U., Popescu, O., Wagner, P., Anselmetti, D., Guntherodt, H., Misevic, G. (1995) *Science*, **267**, 1173–1175.
42. Morfill, J., Blank, K., Zahnd, C., Luginbuhl, B., Kuhner, F., Gottschalk, K.E., Pluckthun, A., Gaub, H.E. (2007) *Biophys. J.*, **93**, 3583–3590.
43. Allen, S., Chen, X., Davies, J., Davies, M.C., Dawkes, A.C., Edwards, J.C., Roberts, C.J., Sefton, J., Tendler, S.J., Williams, P.M. (1997) *Biochem.*, **36**, 7457–7463.
44. Kuhner, F., Costa, L.T., Bisch, P.M., Thalhammer, S., Heckl, W.M., Gaub, H.E. (2004) *Biophys. J.*, **87**, 2683–2690.
45. Fuhrmann, A., Schoening, J.C., Anselmetti, D., Staiger, D., Ros, R. (2009) *Biophys. J.*, **96**, 5030–5039.
46. Baumgarth, B., Bartels, F.W., Anselmetti, D., Becker, A., Ros, R. (2005) *Microbiol.*, **151**, 259–268.
47. Bartels, F.W., McIntosh, M., Fuhrmann, A., Metzendorf, C., Plattner, P., Sewald, N., Anselmetti, D., Ros, R., Becker, A. (2007) *Biophys. J.*, **92**, 4391–4400.
48. Bartels, F.W., Baumgarth, B., Anselmetti, D., Ros, R., Becker, A. (2003) *J. Struct. Biol.*, **143**, 145–152.
49. Lynch, S., Baker, H., Byker, S.G., Zhou, D., Sinniah, K. (2009) *Chem. – A Eur. J.*, **15**, 8113–8116.
50. Eckel, R., Wilking, S.D., Becker, A., Sewald, N., Ros, R., Anselmetti, D. (2005) *Angew. Chem., Int. Ed.*, **44**, 3921–3924.
51. Porter-Peden, L., Kamper, S.G., Wal, M.V., Blankespoor, R., Sinniah, K. (2008) *Langmuir*, **24**, 11556–11561.
52. Neuman, K.C., Nagy, A. (2008) *Nat. Meth.*, **5**, 491–505.
53. Hinterdorfer, P., Dufrene, Y.F. (2006) *Nat. Meth.*, **3**, 347–355.
54. Bizzarri, A.R., Cannistraro, S. (2009) *J. Phys. Chem. B*, **113**, 16449–16464.
55. Amrein, M., Müller, D. (1999) *Nanobiology*, **4**, 229–256.

56. Wagner, P. (1998) FEBS Lett., **430**, 112–115.
57. Müller, D.J., Amrein, M., Engel, A. (1997) J. Struct. Biol., **119**, 172–188.
58. Adamcik, J., Klinov, D.V., Witz, G., Sekatskii, S.K., Dietler, G. (2006) FEBS Lett., **580**, 5671–5675.
59. Wagner, P., Hegner, M., Kernen, P., Zaugg, F., Semenza, G. (1996) Biophys. J., **70**, 2052–2066.
60. Shao, Z.F., Mou, J., Czajkowsky, D.M., Yang, J., Yuan, J.Y. (1996) Adv. Phys., **45**, 1–86.
61. Tatte, T., Saal, K., Kink, I., Kurg, A., Lohmus, R., Maeorg, U., Rahi, M., Rinken, A., Lohmus, A. (2003) Surf. Sci., **532–535**, 1085–1091.
62. Baumgartner, W., Hinterdorfer, P., Ness, W., Raab, A., Vestweber, D., Schindler, H., Drenckhahn, D. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **97**, 4005–4010.
63. Kollar, V., Szatmari, D., Grama, L., Kellermayer, M.S. (2010) J. Biomed. Biotechnol., **2010**, 1–8.
64. Krasnoslobodtsev, A.V., Shlyakhtenko, L.S., Lyubchenko, Y.L. (2007) J. Mol. Biol., **365**, 1407–1416.
65. Vezenov, D.V., Noy, A., Rozsnyai, L.F., Lieber, C.M. (1997) J. Am. Chem. Soc., **119**, 2006–2015.
66. Haselgrubler, T., Amerstorfer, A., Schindler, H., Gruber, H.J. (1995) Bioconjug. Chem., **6**, 242–248.
67. Bonanni, B., Bizzarri, A.R., Cannistraro, S. (2006) J. Phys. Chem. B, **110**, 14574–14580.
68. Kienberger, F., Kada, G., Gruber, H.J., Pastushenko, V.P., Riener, C., Trieb, M., Knaus, H.-G., Schindler, H., Hinterdorfer, P. (2000) Single Molecules, **1**, 59–65.
69. Barattin, R., Voyer, N., Braga, P.C., Ricci, D. Chemical Modifications of Atomic Force Microscopy Tips, in: Atomic Force Microscopy in Biomedical Research. Walker, J.M., ed., 2011, Humana Press. 457–483.
70. Bergkvist, M., Cady, N.C., Mark, S.S. Chemical Functionalization and Bioconjugation Strategies for Atomic Force Microscope Cantilevers, in: Bioconjugation Protocols. Walker, J.M., ed., 2011, Humana Press. 381–400.
71. Barattin, R., Voyer, N. (2008) Chem. Commun., 1513–1532.
72. Berquand, A., Xia, N., Castner, D.G., Clare, B.H., Abbott, N.L., Dupres, V., Adriaensen, Y., Dufrene, Y.F. (2005) Langmuir, **21**, 5517–5523.
73. Zhang, Y., Yu, Y., Jiang, Z., Xu, H., Wang, Z., Zhang, X., Oda, M., Ishizuka, T., Jiang, D., Chi, L., Fuchs, H. (2009) Langmuir, **25**, 6627–6632.
74. Bonanni, B., Kamruzzahan, A.S.M., Bizzarri, A.R., Rankl, C., Gruber, H.J., Hinterdorfer, P., Cannistraro, S. (2005) Biophys. J., **89**, 2783–2791.
75. Maki, T., Kidoaki, S., Usui, K., Suzuki, H., Ito, M., Ito, F., Hayashizaki, Y., Matsuda, T. (2007) Langmuir, **23**, 2668–2673.
76. Schwesinger, F., Ros, R., Strunz, T., Anselmetti, D., Güntherodt, H.-J., Honegger, A., Jermutus, L., Tiefenauer, L., Plückthun, A. (2000) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **97**, 9972–9977.
77. Janovjak, H., Struckmeier, J., Müller, D.J. (2005) Eur. Biophys. J., **34**, 91–96.
78. Yew, Z.T., Olmsted, P.D., Paci, E. Free Energy Landscapes of Proteins: Insights from Mechanical Probes, in: Single-Molecule Biophysics. 2012, New York: John Wiley & Sons, Inc. 395–417.
79. Schlierf, M., Yew, Z.T., Rief, M., Paci, E. (2010) Biophys. J., **99**, 1620–1627.
80. Evans, E., Ritchie, K. (1997) Biophys. J., **72**, 1541–1555.
81. Fritz, J., Katopodis, A.G., Kolbinger, F., Anselmetti, D. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**, 12283–1238.
82. Janshoff, A., Neitzert, M., Oberdörfer, Y., Fuchs, H. (2000) Angew. Chem., Int. Ed., **39**, 3212–3237.

83. Fuhrmann, A., Anselmetti, D., Ros, R., Getfert, S., Reimann, P. (2008) *Phys. Rev. E*, **77**, 031912-1-10.
84. Levy, R., Maaloum, M. (2005) *Ultramicroscopy*, **102**, 311–315.
85. Odorico, M., Teulon, J.M., Berthoumieu, O., Chen, S.W., Parot, P., Pel-lequer, J.L. (2007) *Ultramicroscopy*, **107**, 887–894.
86. Sandal, M., Benedetti, F., Brucale, M., Gomez-Casado, A., Samori, B. (2009) *Bioinformatics*, **25**, 1428–1430.
87. Carl, P., Kwok, C.H., Manderson, G., Speicher, D.W., Discher, D.E. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 1565–1570.
88. Gergely, C., Senger, B., Voegel, J.C., Horber, J.K.H., Schaaf, P., Hemmerle, J. (2000) *Ultramicroscopy*, **87**, 67–78.
89. Patrick, D.B., Fabio, C., Patrick, L.T.M.F., Merce, R., Christian, A.B., Daniel, J.M., Manuel, P., Andreas, E., Dimitrios, F. (2008) *Nanotechnology*, **19**, 384014.
90. Baumgartner, W., Hinterdorfer, P., Schindler, H. (2000) *Ultramicroscopy*, **82**, 85–95.
91. Basnar, B., Elnathan, R., Willner, I. (2006) *Anal. Chem.*, **78**, 3638–3642.
92. Hinterdorfer, P., Kienberger, F., Raab, A., Gruber, H.J., Baumgartner, W., Kada, G., Riener, C., Wielert-Badt, S., Borken, C., Schindler, H. (2000) *Single Molecules*, **1**, 99–103.
93. Zhang, X., Craig, S.E., Kirby, H., Humphries, M.J., Moy, V.T. (2004) *Biophys. J.*, **87**, 3470–3478.
94. Pincet, F.d.r., Husson, J. (2005) *Biophys. J.*, **89**, 4374–4381.
95. Sulchek, T.A., Friddle, R.W., Langry, K., Lau, E.Y., Albrecht, H., Ratto, T.V., DeNardo, S.J., Colvin, M.E., Noy, A. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 16638–16643.
96. Kienberger, F., Ebner, A., Gruber, H.J., Hinterdorfer, P. (2005) *Acc. Chem. Res.*, **39**, 29–36.
97. Janshoff, A., Steinem, C. (2001) *ChemPhysChem*, **2**, 577–579.
98. Bell, G.I. (1978) *Science*, **200**, 618–627.
99. Funari, G., Domenici, F., Nardinocchi, L., Puca, R., D'Orazi, G., Bizzarri, A.R., Cannistraro, S. (2010) *J. Mol. Recognit.*, **23**, 343–351.
100. Taranta, M., Bizzarri, A.R., Cannistraro, S. (2008) *J. Mol. Recognit.*, **21**, 63–70.
101. Neuert, G., Albrecht, C., Pamir, E., Gaub, H.E. (2006) *FEBS Lett.*, **580**, 505–509.
102. Yuan, C., Chen, A., Kolb, P., Moy, V.T. (2000) *Biochem.*, **39**, 10219–10223.
103. Jarzynski, C. (1997) *Phys. Rev. Lett.*, **78**, 2690–2693.
104. Jarzynski, C. (2008) *Eur. Phys. J. B*, **64**, 331–340.
105. Liu, W., Montana, V., Parpura, V., Mohideen, U. (2011) *Biophys. J.*, **101**, 1854–1862.
106. Liu, W., Montana, V., Parpura, V., Mohideen, U. (2008) *Biophys. J.*, **95**, 419–425.
107. Bizzarri, A.R., Cannistraro, S. (2010) *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **13**, 2738–2743.
108. Karulin, A., Dzantiev, B.B. (1990) *Mol. Immunol.*, **27**, 965–971.
109. Yang, T., Baryshnikova, O.K., Mao, H., Holden, M.A., Cremer, P.S. (2003) *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 4779–4784.
110. Sadana, A., Vo-Dinh, T. (1997) *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **67**, 1–22.
111. Wickham, T.J., Granados, R.R., Wood, H.A., Hammer, D.A., Shuler, M.L. (1990) *Biophys. J.*, **58**, 1501–1516.
112. Hendrickson, O.D., Zherdev, A.V., Kaplun, A.P., Dzantiev, B.B. (2002) *Mol. Immunol.*, **39**, 413–422.
113. Raweeritha, R., Ratanabanangkoon, K. (2005) *Toxicol.*, **45**, 369–375.

114. *Mammen, M., Choi, S.K., Whitesides, G.M.* (1998) *Angew. Chem., Int. Ed.*, **37**, 2754-2794.
115. *Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.* (1996) *Прикл. биохимия и микробиология*, **32**, 179–187.
116. *Azimzadeh, A., Van Regenmortel, M.H.* (1991) *J. Immunol. Methods*, **141**, 199–208.
117. *Dimmock, N.J., Hardy, S.A.* (2004) *Rev. Med. Virol.*, **14**, 123–135.
118. *Ratto, T.V., Rudd, R.E., Langry, K.C., Balhorn, R.L., McElfresh, M.W.* (2006) *Langmuir*, **22**, 1749–1757.
119. *Sulchek, T., Friddle, R.W., Noy, A.* (2006) *Biophys. J.*, **90**, 4686–4691.
120. *Sulchek, T., Friddle, R., Ratto, T., Albrecht, H., DeNardo, S., Noy, A.* (2009) *Ann. NY Acad. Sci.*, **1161**, 74–82.
121. *Gomez-Casado, A., Dam, H.H., Yilmaz, M.D., Florea, D., Jonkheijm, P., Huskens, J.* (2011) *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 10849–10857.
122. *Сафенкова И.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.* (2011) Сборник материалов Третьей научно-практической конференции «Контроль содержания и безопасности наночастиц в продукции сельского хозяйства и пищевых продуктах», М.: Издательский комплекс МГУПП, 36–46.
123. *Сафенкова И.В.* (2010) Взаимодействие вирусов растений с антителами: количественные закономерности и практическое применение. Дисс. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук. М.: ИНБИ РАН, 165 с.