

БЕСКОНТАКТНАЯ АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОМОЛЕКУЛ В ЖИДКОСТИ

© 2024 г. Т. Мамедов*, А. Швирст*, М.В. Федотова**, Г.Н. Чуев*.*#

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия

**Институт химии растворов им. Г.А. Крестова РАН, Академическая ул., 1, Иваново, 153045, Россия

#E-mail: genchuev@rambler.ru

Поступила в редакцию 18.03.2024 г.

После доработки 02.07.2024 г.

Принята к публикации 03.07.2024 г.

Бесконтактная атомно-силовая микроскопия, разновидность сканирующей зондовой микроскопии, в последние два десятилетия активно используется для изучения гидратированных биомолекул. В частности, как показывает анализ современной литературы, она является весьма перспективной в исследовании адсорбированных биомакромолекул и биомакромолекулярных комплексов на границе раздела фаз или на поверхности мембран. В настоящем мини-обзоре описываются основы данного метода, его применение для биомолекул, обсуждаются требования к методу и возможности его расширения за счет дополнительной обработки полученных экспериментальных данных с помощью теоретического анализа, молекулярного моделирования или машинного обучения.

Ключевые слова: гидратированные биомолекулы, бесконтактная атомно-силовая микроскопия, молекулярное моделирование, машинное обучение.

DOI: 10.31857/S0006302924040056, EDN: NHSYHJ

Сканирующая зондовая микроскопия является уникальным методом, позволяющим получать изображения поверхности и проводить изучение ее локальных свойств в широких диапазонах параметров состояния. Создание сканирующего зондового микроскопа [1] стало эпохальным событием и было удостоено Нобелевской премии, так как оно позволило получать эксклюзивные данные о структуре поверхности, молекулярных и атомарных особенностях адсорбированных молекул и агрегатов с очень высокой степенью разрешения. В свою очередь, атомно-силовая микроскопия (АСМ) является одним из перспективных направлений сканирующей зондовой микроскопии, которая позволяет определять рельеф изучаемой поверхности с субнанометровым разрешением. Изначально метод был разработан для определения упругих деформаций зонда при силовом контакте с образцом, а возможности ди-

намического режима обсуждались сугубо теоретически [2]. Только спустя некоторое время, с начала двухтысячных, исследования поверхности в динамическом режиме обрели популярность и стали массовыми (см., напр., монографию [3]). Отметим, что для биологических систем динамический режим имеет определенные преимущества, так как позволяет проводить исследования в широком диапазоне параметров состояния при физиологических условиях. Особую роль для исследования биологических систем играют бесконтактный и полуконтактный режимы работы АСМ. При работе в этих режимах не оказывается разрушающего воздействия на образец. В отличие от рентгеноструктурного анализа бесконтактная АСМ (БАСМ) не требует кристаллизации образцов, а в отличие от ЯМР-спектроскопии — не имеет ограничений при исследовании биологических объектов массой свыше 50 кДа. Так же, как и некоторые другие методы, используемые для изучения биологических объектов, например, электронная микроскопия, БАСМ не требует нанесения на поверхность проводящего материала, который часто деформирует образец. При этом БАСМ имеет ряд преимуществ перед электронной микроскопией. Например, с его помощью допускается работа как в воздухе, так и в жидко-

Сокращения: АСМ — атомно-силовая микроскопия, БАСМ — бесконтактная атомно-силовая микроскопия, ЧМ — частотная модуляция, ЭМП — электронно-механический привод, КСР — кривая «сила–расстояние», теория ДЛФО — теория Дерягина–Ландау–Фервея–Овербека, STA — simple tip approximation, MDFF — молекулярная динамика с дополнительной подгонкой (molecular dynamics flexible fitting).

стях. В последнем случае возможно проводить исследования при физиологических условиях (рН, температура, физиологические концентрации ионов и т.д.). Тем не менее, при использовании БАСМ важно учитывать и ограничения метода. Существует довольно большое число обзоров, посвященных применению метода АСМ для исследования биологических систем (см., например, обзор [4]). Но все они, как правило, посвящены экспериментальным особенностям проведения АСМ экспериментов с биообъектами, описывают детали приготовления образцов, нанесения их на подложку, а также детали проведения спектроскопических измерений или получения изображений биомакромолекул.

В отличие от этих монографий, в данном мини-обзоре будут описаны не только основы метода БАСМ, возможности его применения для биомолекул, но и обсуждены требования и возможности расширения метода за счет дополнительной обработки полученных экспериментальных данных с помощью моделирования. Кратко будет изложено не только то, что можно наблюдать и измерять с помощью БАСМ, а также какие возможности дает комбинация этих экспериментальных данных с моделированием и методами машинного обучения. В части 1 приведено описание экспериментальной установки для проведения БАСМ. Ряд иллюстративных примеров по визуализации белков, ДНК, вирусов представлен в части 2. В части 3 кратко описаны основные теоретические и численные подходы для моделирования данных, полученных с помощью БАСМ, и возможности обработки этих данных с использованием методов машинного обучения.

1. ОПИСАНИЕ МЕТОДА АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Существует довольно большое разнообразие экспериментальных установок для проведения БАСМ. Сюда входят как различные модификации измерения разницы потенциалов между зондом и образцом, так и установки для определения силового взаимодействия. Последние можно разделить на два основных типа — с частотной и амплитудной модуляцией. В работе АСМ выделяют три основных режима работы: контактный, полуконтактный и бесконтактный режимы. На рис. 1 показаны области работы трех режимов.

В контактном режиме определяются механические деформации биообъекта, а в полуконтактном и бесконтактном — изменение частоты или амплитуды колебаний зонда, так как зонд не касается образца. Полуконтактный или бесконтактный режимы работы — это динамический режим работы. Как в контактном, так и в бесконтактном режиме можно водить зонд как в латеральном, так и в вертикальном направлении.

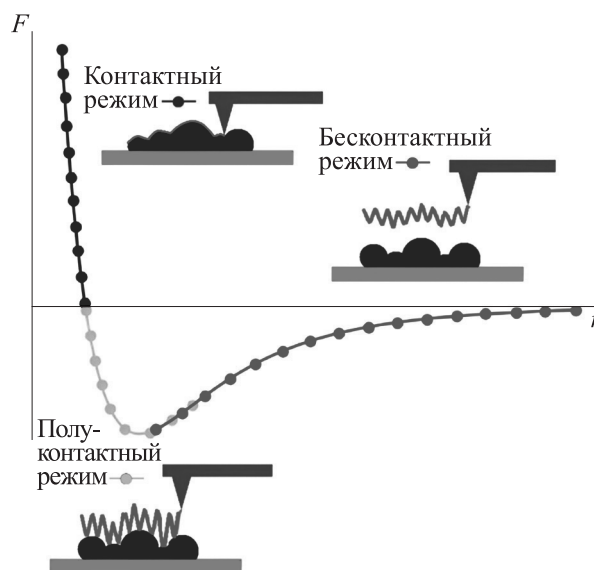


Рис. 1. Схема работы АСМ и характерная кривая «сила—расстояние», на которой показаны области применения режимов: контактный (синие символы), полуконтактный (желтые символы) и бесконтактный (красные символы) режимы.

Мы здесь опишем установку с частотной модуляцией (ЧМ). Детали описания других установок, включая различные комбинации БАСМ с туннельной и сканирующей микроскопией, можно найти в работе [5]. Общий вид ЧМ-БАСМ установки представлен на рис. 2.

Сама установка включает электронно-механический привод (ЭМП), к которому крепится упругая консоль (кантилевер). На конце кантилевера крепится ультратонкий нанозонд с характерными размерами закругления 1–50 нм. Характерный коэффициент жесткости зонда варьируется в пределах 10^{-3} – 10 Н/м. У самого кантилевера имеется светоотражающая панель, на которую подается сигнал от лазерного диода. Кантилевер подвергается периодическому механическому возмущению с постоянной амплитудой. После того, как сигнал поступает на фотодетектор, он усиливается и далее поступает в систему автоматического управления сигналом, работающую в системе обратной связи, и в электронный блок для сравнения с предыдущим значением сигнала. Система автоматического управления сигналом включает предварительный усилитель, автоматическую регулировку усиления и пропорциональный интегрально-дифференциальный регулятор. После фотодетектора сигнал поступает на предварительный усилитель, который необходим для того, чтобы увеличить уровень сигнала для достаточной обработки. Автоматическая регулировка усиления требуется для поддержки выходного сигнала с постоянной амплитудой с помощью

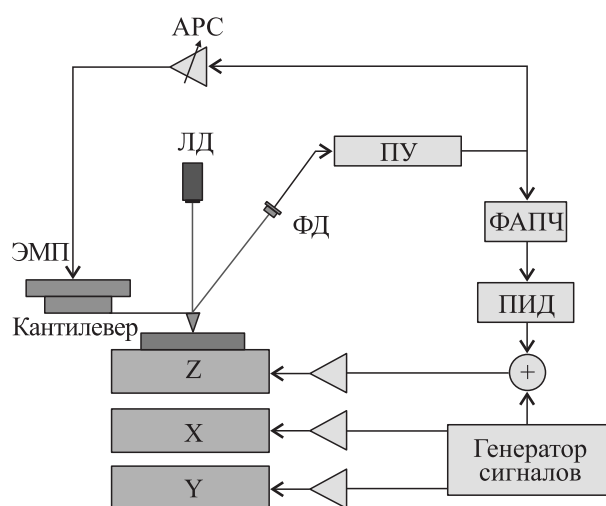


Рис. 2. Схема установки ЧМ-БАСМ. ПУ — предварительный усилитель, АРС — автоматическая регулировка усиления, ЛД — лазерный диод, ФД — фотодетектор, ФАПЧ — фазовая автоподстройка частоты, ПИД — пропорциональный интегральный дифференциальный регулятор, ЭМП — электронно-механический привод. Адаптировано с разрешения из [T. Fukuma, Y. Ueda, Sh. Yoshioka, and H. Asakawa, Phys. Rev. Lett. 104, 016101, 2010]. Copyright (2010) American Physical Society.

электронного усилителя с автоматической поддержкой. Пропорциональный интегрально-дифференциальный регулятор представляет собой устройство в управляющем контуре с обратной связью, которое необходимо для того, чтобы формировать управляющий сигнал. Это происходит следующим образом: сигнал поступает на компаратор, где сравнивается с заранее выбранным значением. Таким образом, мы получаем сигнал ошибки и подаем его на ЭМП.

Суть работы БАСМ заключается в следующем. При движении ЭМП над образцом меняется сила, действующая на кантилевер со стороны образца, что, в свою очередь, приводит к сдвигу частотного отклика сигнала, который регистрируется фотодетектором. Измеряя этот сдвиг, можно определить изменение силы, действующей на нанозонд. В динамическом режиме работы кантилевер при сканировании образца совершает колебания, близкие к резонансу. Примеры изменения силы и частоты показаны на рис. 3 [6], а именно, результаты измерений в контактном (а, б) и бесконтактных (в, г) режимах. Режим (а, в) — это регистрация латеральной силы, которая позволяет создавать двумерное изображение образца, режим (б, г) — это регистрация кривых «сила—расстояние» (КСР).

Отметим также важную особенность проведения ЧМ-БАСМ в жидкости. На рис. 4 показано сравнение КСР в воде и в воздухе [7].

Причина этих различий — высокая вязкость жидкости, в результате чего можно существенно изменить частоту колебаний нанозонда. С учетом того, что резонансная кривая в жидкости за счет сил вязкости в десятки раз уже, чем в воздухе, характерный масштаб регистрируемых сил можно снизить до пиконьютонов, а характерное разрешение можно увеличить до долей нанометра.

2. ПРИМЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ БАСМ ДЛЯ БИОМОЛЕКУЛ

Изучение ДНК. Исследованию ДНК, адсорбированной на различных подложках, посвящено довольно большое число работ (см., например, работы [8–11]). Это достаточно удобный объект для изучения, что обусловлено двумя факторами. Во-первых, это простота нанесения ДНК на подложку, что обусловлено высокой адгезией ДНК к полярным и слабозаряженным подложкам. Во-вторых, большая длина ДНК и специфичность ее конформации позволяют легко отличить ДНК в процессе визуализации от любых других адсорбированных примесей или комплексов. В качестве примера приведем работу [8], в которой исследователи визуализировали ДНК и распределение заряда на поверхности ДНК (рис. 5). Заметим, что БАСМ позволяет определить не только тип конформации ДНК (рис. 5), но и детали гидратации ее различных участков. Так, на рис. 5б показано отличие профиля ДНК в В- и Z-конформациях, а на рис. 5д темные участки на ДНК соответствуют повышенной плотности воды в большом желобе ДНК.

Авторами работы [9] было обнаружено, что наиболее высокой плотностью гидратная оболочка ДНК обладает вблизи желобков ДНК. Использование специального протокола экспериментов, позволяющего получать конформации адсорбированной ДНК с аномально высокой длиной персистенции [10], также дает возможность визуализировать не только саму ДНК, но и образование комплексов «ДНК-белок» [10]. Помимо визуализации, БАСМ позволяет оценить отдельные молекулярные характеристики. Например, авторы работы [11] определили среднюю плотность поверхностного заряда ДНК на основе анализа КСР. Используя аналитическое решение уравнения Пуассона—Больцмана и эмпирические оценки заряда зонда, они нашли, что эта плотность составляет порядка $0.11 \text{ Кл}\cdot\text{м}^{-2}$. Авторам работы [8] удалось определить, что распределение заряда на ДНК достаточно неоднородно и зависит как от растворителя, так и от конформации ДНК. Для

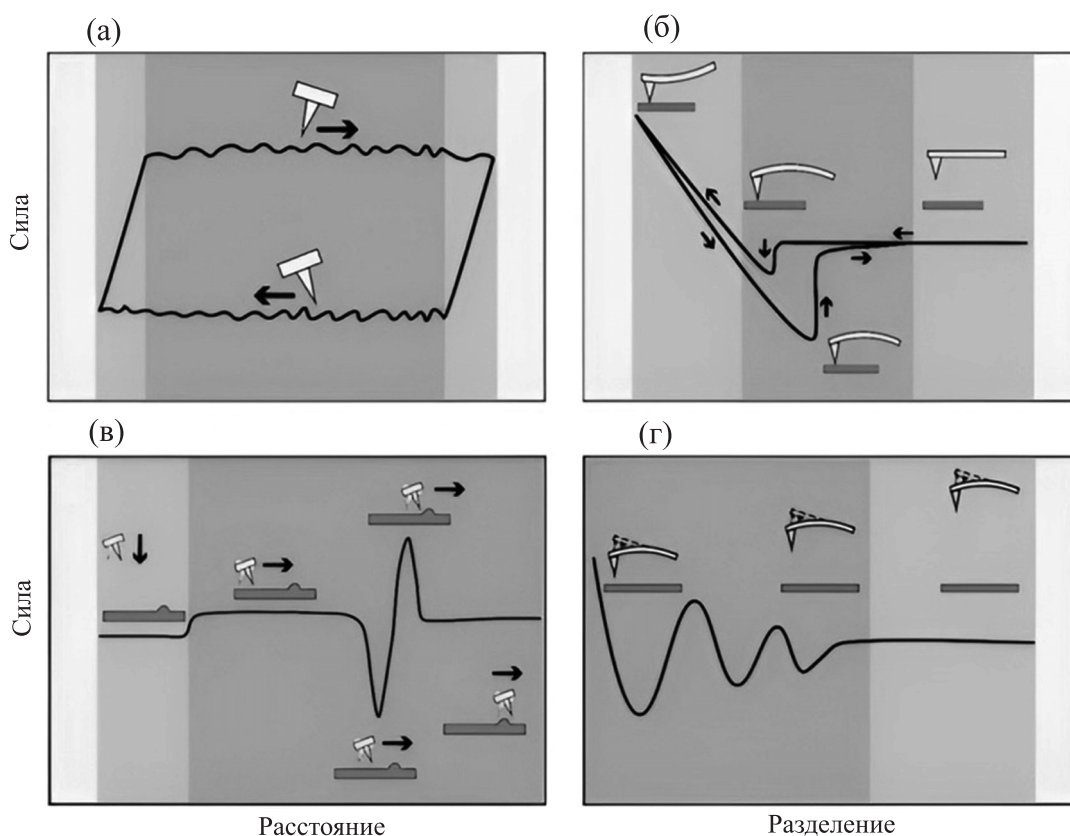


Рис. 3. Принцип регистрации кривых: (а) – типичная квазистатическая кривая боковой силы, (б) – типичная квазистатическая кривая (СР), (в) – типичная кривая динамической боковой силы, (г) – типичная динамическая кривая (СР). Воспроизведено из работы [6] с разрешения издательства John Wiley & Sons, Inc. (2022).

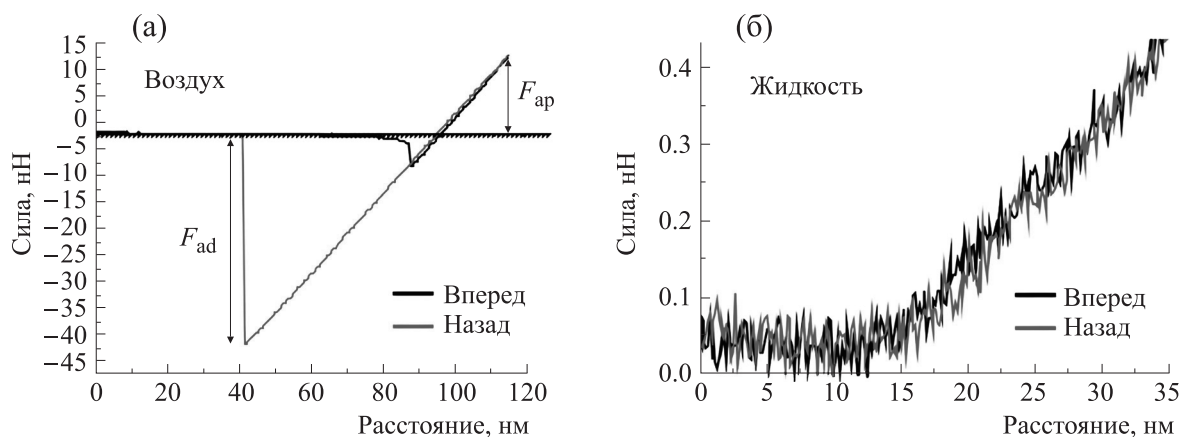


Рис. 4. Кривые «сила–расстояние» в воздухе (а) и в жидкостях (б). Воспроизведено из работы [7] с разрешения издательства John Wiley & Sons, Inc. (2012).

Z- и В-форм они определили, что эта плотность составляет 0.116 и $0.163 \text{ Кл} \cdot \text{м}^{-2}$ соответственно.

Получение изображения хромосом. Другим интересным объектом приложения БАСМ является визуализация хромосом. Так, авторы работы [12], используя метод полуконтактной АСМ, получили их изображения (рис. 6). Кроме того, они смо-

делировали аналогичные изображения на основе данных кривых «расстояние–сила» и упрощенных моделей хромосомы как полимерной цепочки, а зонда – как незаряженной сферической частицы. Сравнение полученных результатов показывает удивительное совпадение изображений (рис. 6).

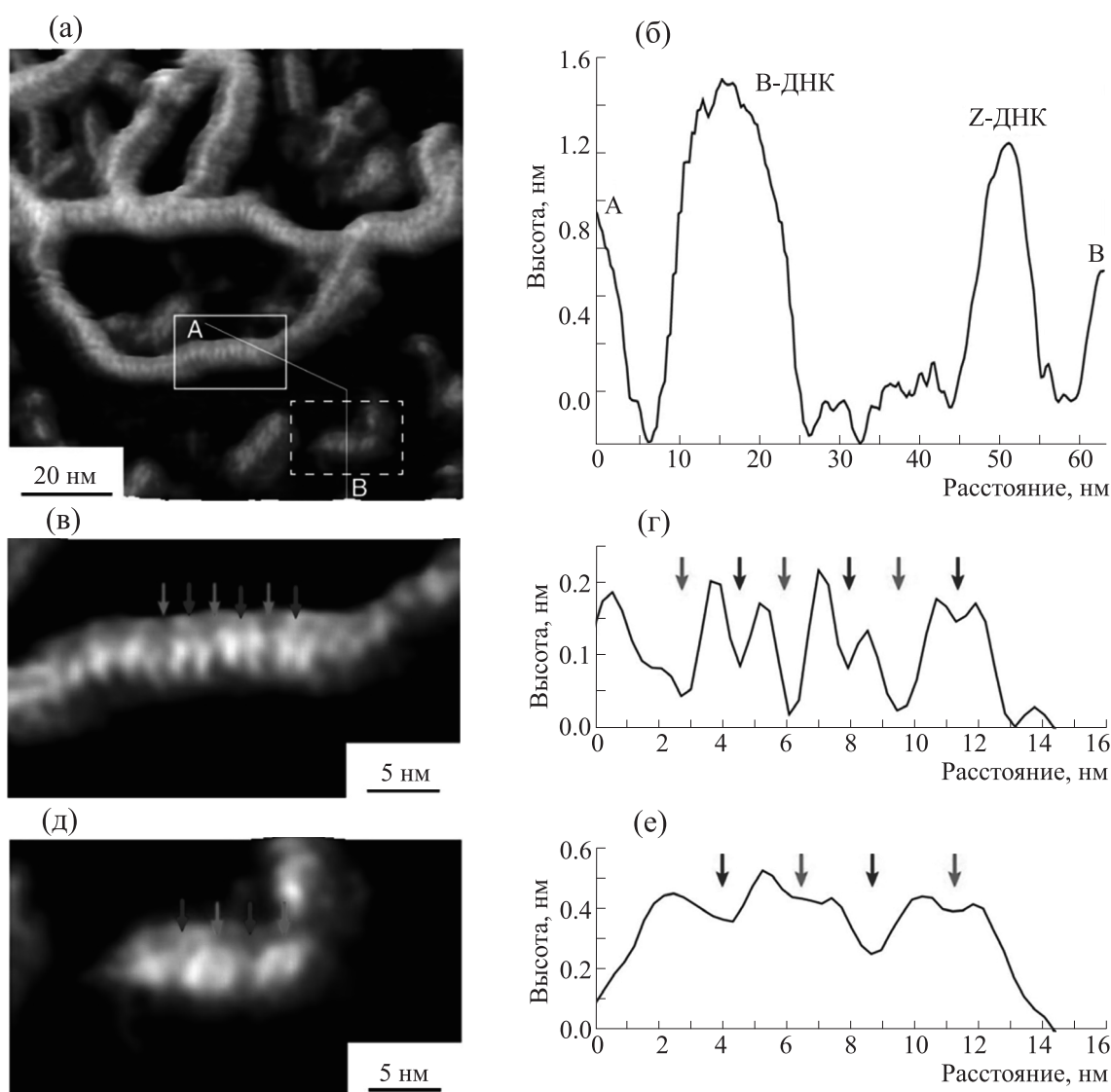


Рис. 5. В-ДНК и Z-ДНК, исследованные с помощью БАСМ: (а) — изображение плазмидной В- и Z-ДНК в 50 мМ растворе NiCl_2 ; (б) — усредненный профиль поперечного сечения вдоль линии А–В; (в) — увеличенное изображение области, обозначенной белым сплошным прямоугольником; (г) — усредненный профиль поперечного сечения вдоль оси спирали ДНК; (д) — увеличенное изображение области, обозначенной белым пунктирным прямоугольником; (е) — усредненный профиль поперечного сечения вдоль оси спирали ДНК. Адаптировано из работы [8] с разрешения издательства Springer Nature (2019).

Гидратированные мембранные белки. Метод БАСМ обладает столь высокой степенью разрешения, что позволяет определять не только конформацию гидратированных биомолекул, но и структурные особенности их гидратации. В работе [13] методом атомно-силовой микроскопии были изучены молекулы воды, связанные со структурированными мембранными белками (рис. 7). Авторы проводили изучение молекулярной структуры гидратированных нативных мембранных участков, состоящих из белков протонной помпы. На рис. 7 показаны БАСМ-изображения трансмембранных белков как в поперечном, так и в продольном сечениях.

Можно отчетливо различить как тримеры белков, так и структуру гидратной оболочки белков. Полезно сопоставить эти данные (рис. 7а,б) с молекулярной структурой тримера (рис. 7г). Видно, что БАСМ позволяет визуализировать особенности структуры гидратной оболочки и определить влияние молекулярной организации образца (белкового тримера) на распределение молекул воды.

Другим ярким примером является определение распределения электрического поля, создаваемого белками в трансмембранном канале [14]. Для этого авторы использовали изображения

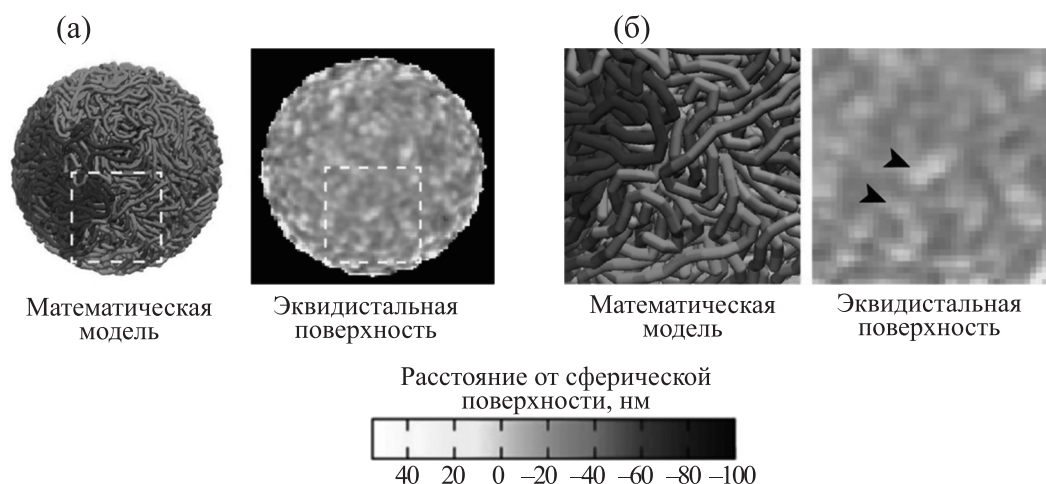


Рис. 6. (а) — Модель и АСМ-изображения хромосомы, (б) — увеличенное изображение выделенных квадратами областей. Адаптировано с разрешения из [12]. Copyright (2019) American Chemical Society.

тримера нативного порина OmpF с разрешением 0.5 и 0.1 нм по горизонтали и вертикали соответственно (см. рис. 3 из работы [14]). Используя полученные данные о структуре белков и параметризуя заряд атомов на основе силового поля

CHARMM [15], авторы рассчитали электростатический потенциал, создаваемый белками. Численное моделирование показало [14], что измерения воспроизводятся с высокой степенью точности при включении в расчеты АСМ-зонда. Мы

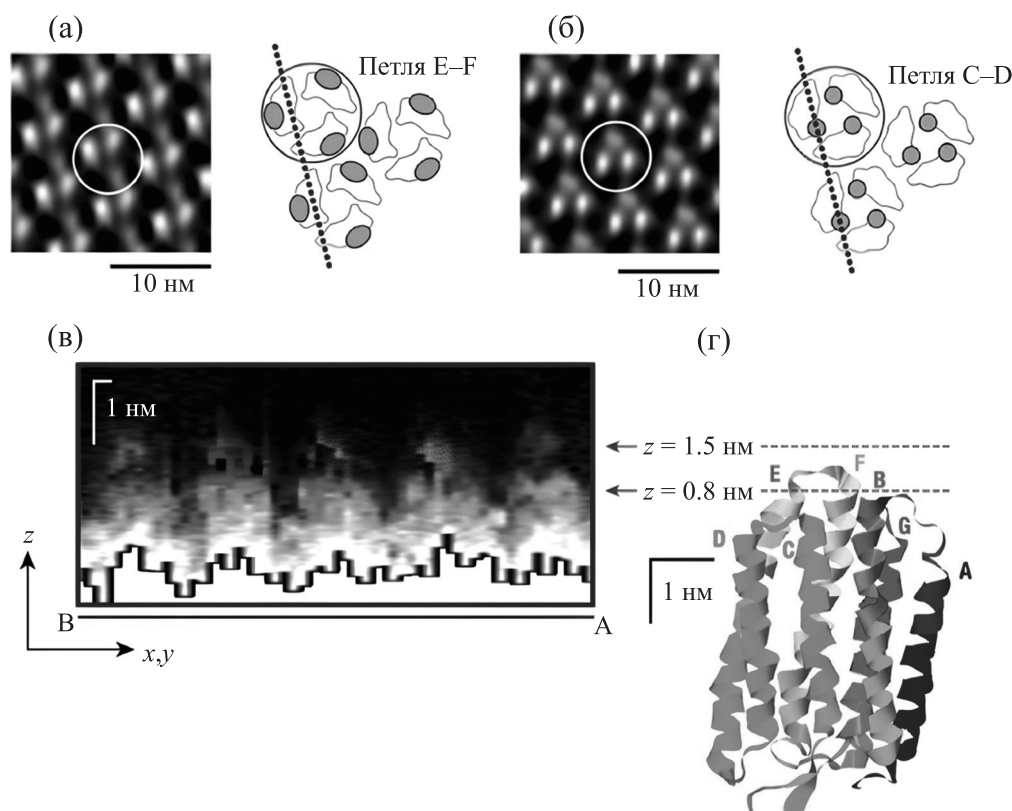


Рис. 7. БАСМ-изображения трансмембранных белков. (а) и (б) — Двумерные изображения цитоплазматической стороны мембраны, включающей трансмембранные белковые тримеры. Последние выделены белыми кружками; (а) — расстояние между зондом и мембраной 0.8 нм, (б) — 1.5 нм. (в) — Двумерное изображение КСР; (г) — молекулярная структура тримера. Адаптировано с разрешения из работы [13]. Copyright (2022) American Chemical Society.

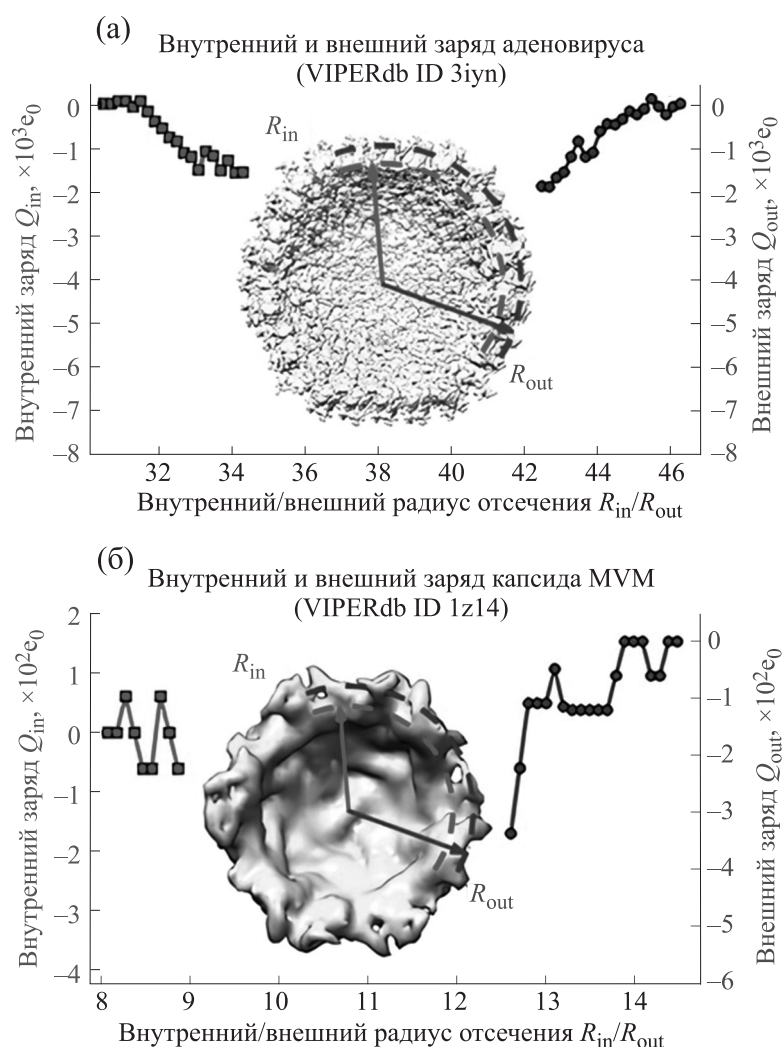


Рис. 8. Внутренний (Q_{in}) и внешний (Q_{out}) заряды аденовируса (а) и капсида MVM (б), полученные путем БАСМ. Адаптировано из работы [16] с разрешения издательства RCS Pub (2015).

считаем, что этот метод открывает новые возможности для изучения электростатического потенциала поверхностей нативных белков.

Исследование электростатики вируса. Еще одним ярким примером использования БАСМ являются исследования вирусов и их вирусных оболочек. Адсорбированные на подложке вирусы, будучи достаточно большими объектами, легко идентифицируются с помощью БАСМ, и их визуализация не представляет большого труда (рис. 8). Как и для ДНК, для вирусов разработана методика измерения распределения электростатического поля на основе КСР. В работе [16] для изучения зарядов отдельных вирусов в жидкой среде измеряли электростатическую силу между вирусной частицей и зондом атомно-силового микроскопа. Данные силового спектроскопии адсорбированных головок бактериофага ф29 и зрелых вирионов и аденовируса были использованы

для получения изображений плотности заряда каждого вируса. Было установлено, что различия в плотности заряда между вирусными частицами согласуются с теоретическими оценками, полученными на основе рентгеноструктурных данных о структуре вирусов. Следует отметить, что метод АСМ позволяет определить не только полный заряд вируса, но и распределение заряда на поверхности вирусных оболочек. Для этого авторы работы [17] использовали нанозонд, функционализированный либо заряженной (NH_3^+), либо гидрофобной (CH_3) группой. Измеряя взаимодействия между зондом и вирусом и определяя разницу между этими взаимодействиями для указанных двух типов зондов, авторы смогли определить и построить 3D-картину распределения гидрофобных и заряженных участков на поверхности капсида вирусов. Заряд рассчитывали при нейтральном pH, включая только аминокислоты

внутри внутренней поверхности вируса. Поскольку эти поверхности не определены однозначно, их соответствующий радиус R_{in} (R_{out}) варьируется, что приводит к разным значениям внутреннего (красного) и внешнего (синего) общего заряда (рис. 8).

Полный заряд определялся как сумма двух этих зарядов. Радиус внутренней и внешней поверхности варьировали от их значений на полуширине полной ширины (FWHM) распределения массовой плотности капсидов: $R_{in} = 34.3$ нм, $R_{out} = 42.4$ нм для аденовируса и $R_{in} = 7.79$ нм, $R_{out} = 12.5$ нм для MVM. Метод оказался настолько точным, что удалось также определить разницу в распределении зарядов в случае замены заполненной оболочки на пустой капсид [17].

3. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОЦЕНКИ И МОДЕЛИРОВАНИЕ

Аналитические оценки. Как было показано выше, в большинстве случаев при исследовании биомолекул методом БАСМ, удается либо визуализировать биомолекулы на подложке, либо получить двумерные или трехмерные КСР. Однако для количественной оценки последних необходимо проводить теоретические расчеты. Наиболее популярным подходом для таких оценок является теория Дерягина–Ландау–Фервея–Овербека (ДЛФО) [18] или ее расширенная версия [19], которая часто используется для оценки стабильности коллоидных систем. В рамках этой теории предполагается, что сила взаимодействия F_{tot} двух коллоидных наночастиц включает три основных вклада:

$$F_{tot} = F_{edl} + F_{vdw} + F_{NDLVO}, \quad (1)$$

где первый член – сила электростатического взаимодействия, второй вклад обусловлен ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями, а последний вклад рассматривается лишь в расширенной версии (ДЛФО) и учитывает все прочие типы взаимодействий. Первый вклад можно рассчитать путем численного решения уравнения Пуассона–Больцмана. Этот вклад определяется через поверхностный потенциал и зависит от ионной силы раствора. Во многих случаях вместо поверхностного потенциала используют электрокинетический потенциал наночастиц (дзета-потенциал) [20], так как последний может быть измерен экспериментально. В случаях, когда заряд распределен равномерно по поверхности, а геометрия взаимодействующих объектов достаточно проста (например, «плоскость–плоскость», «сфера–плоскость» или «сфера–сфера») возможна аналитическая оценка этого вклада. Аналогичные оценки можно получить и для вклада ван-дер-Ваальса F_{vdw} . Примеры таких оце-

нок даны в работах [20, 21]. Последний вклад (F_{NDLVO}) может включать различные типы взаимодействий, обусловленные сольватационными, поляризационными и стерическими эффектами. Как правило, оценка этого вклада является эмпирической и аппроксимируется экспоненциальной зависимостью от расстояния [22]. Заметим, что на расстояниях, превышающих 5–10 нм, можно пренебречь, тогда задача редуцируется к оценке энергии электростатических взаимодействий. В случае, когда плотность поверхностного заряда биомолекулы на порядок и более превышает аналогичную зарядовую плотность нанозонда, оценку плотности поверхностного заряда можно получить путем сравнения выражения (1) с экспериментальными данными КСР [8]. Однако в общем случае для оценки плотности поверхностного заряда биомолекул требуются данные о распределении заряда на поверхности зонда. Для этого проводятся дополнительные эксперименты, которые позволяют оценить этот заряд [23, 24].

Заметим, что, хотя теория ДЛФО и позволяет оценить ряд характеристик биомолекул, многие ее положения (например, о равномерном распределении заряда на поверхности, описании жидкости как бесструктурной полярной среды и т.д.) игнорируют большое число аспектов, связанных с молекулярной структурой, как жидкости, так и взаимодействующих нанообъектов.

Оценки, полученные с помощью приближенных уравнений молекулярных жидкостей. Альтернативой теории ДЛФО являются методы теории жидкостей, основанные на аппарате функций распределения, поскольку они учитывают детальную молекулярную структуру биомолекулы и нанозонда, а также рассматривают жидкость как статистическое распределение частиц (атомов, молекул или ионов). В этом случае сила взаимодействия $F(R\Omega)$ между нанозондом и биомолекулой, определяется как производная от потенциала средней силы $W(R\Omega)$:

$$F(R\Omega) = -\frac{dW(R\Omega)}{dR}. \quad (2)$$

В свою очередь, потенциал средней силы $W(R\Omega)$ можно разделить на два вклада: $U(R\Omega)$ – потенциал прямого взаимодействия между зондом и биомолекулой и избыточный химический потенциал $\Delta A(R\Omega)$, определяемый работой, которую надо выполнить, чтобы переместить зонд из бесконечности в положение, которое характеризуется как координатами R , так и относительной ориентацией зонда Ω :

$$W(R\Omega) = U(R\Omega) + \Delta A(R\Omega). \quad (3)$$

В общем случае для определения $W(R\Omega)$, как и для $\Delta A(R\Omega)$, необходим расчет бинарной функ-

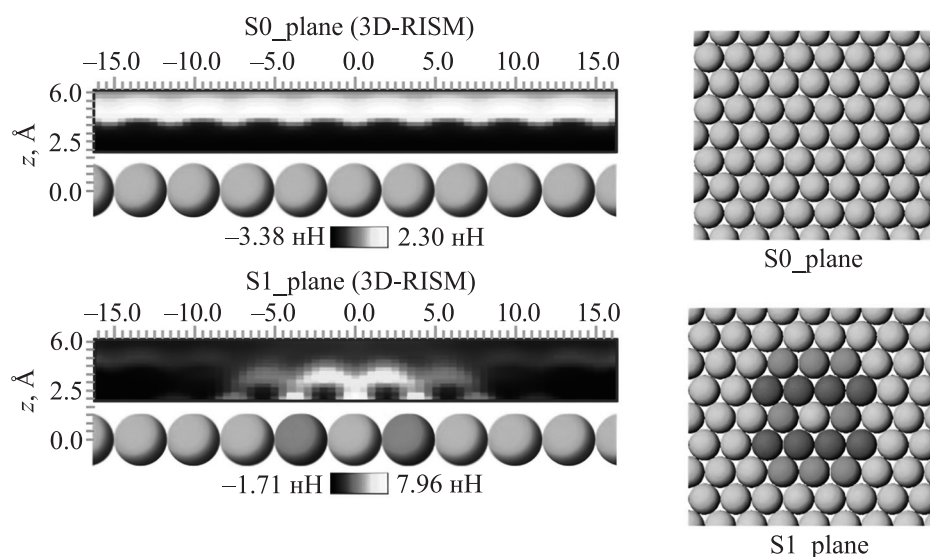


Рис. 9. Двумерное изображение КСР на неоднородной и однородной гидратированных подложках. Слева схематически показаны молекулярные структуры соответствующих подложек. Адаптировано с разрешения из работы [M. Harada and M. Tsukada, Phys. Rev. B., **82**, 035414 (2010)]. Copyright (2010) American Physical Society.

ции распределения на основе теории интегральных уравнений жидкости [25–37], что требует очень больших вычислительных ресурсов из-за наноскопических размеров биомолекулы и зонда. Поэтому для оценки (3) обычно используют два дополнительных приближения. Избыточный химический потенциал $\Delta A(R\Omega)$ считают в приближении бесконечного разбавления и выражают через атомные плотности $\rho_i(\mathbf{r})$, определяя распре-

деление i -х атомов молекул растворителя (s) вокруг растворенного вещества:

$$\rho_i(\mathbf{r}) = \sum_{s=1}^N \delta(\mathbf{r} - \mathbf{x}_{si}), \quad (4)$$

где N — общее число молекул растворителя, $\mathbf{x}_{si}$ — их мгновенные положения.

В результате $\Delta A(R\Omega)$ определится как:

$$\Delta A(R\Omega) = - \sum_{ij} \int \int \rho_i(\mathbf{r}_1) X_{ij}^{-1}(|\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2|) \rho_j(\mathbf{R} - \mathbf{r}_2, \Omega) d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2, \quad (5)$$

где $X(\mathbf{r})$ — обобщенная восприимчивость чистого раствора. В свою очередь, эти атомные плотности могут быть вычислены путем решения системы нелинейных интегральных уравнений (см. детали в работе [38]) на основе модели взаимодействующих силовых центров (RISM) [39–41]. В качестве примера таких расчетов приведем работу [42]. В этой работе были смоделированы КСР и силовые карты измерений атомно-силовой микроскопии для гипотетических наноструктур в водной среде с использованием метода 3D-RISM (рис. 9).

Исследователями были выявлены различные особенности силы взаимодействия. Например, было показано, что направления сил в жидкости противоположно направлению сил в вакууме. На основании этих особенностей и распределения величины плотности воды по периферии наноструктур, полученного с помощью теории 3D-RISM, была обнаружена тесная корреляция между свободной энергией системы и распределением плотности воды вокруг нанозонда. Отметим,

что, хотя метод 3D-RISM позволяет достаточно эффективно оценивать $F(R\Omega)$ в зависимости от состава растворителя, он требует в качестве входных параметров данные о молекулярной структуре как биомолекулы, так и нанозонда. Однако для последнего структура чаще всего неизвестна.

Применение метода молекулярной динамики. Другим примером моделирования кривых «сила-расстояние» является использование метода молекулярной динамики. Как уже было указано выше, для расчета сил взаимодействия необходимо явное определение молекулярной структуры и силовых параметров для нанозонда. Однако в самой простой версии (simple tip approximation — STA) в качестве нанозонда можно рассматривать саму молекулу растворителя. В этом случае задача существенно упрощается и сводится к расчету функции распределения молекул растворителя, а сила определяется как [43]:

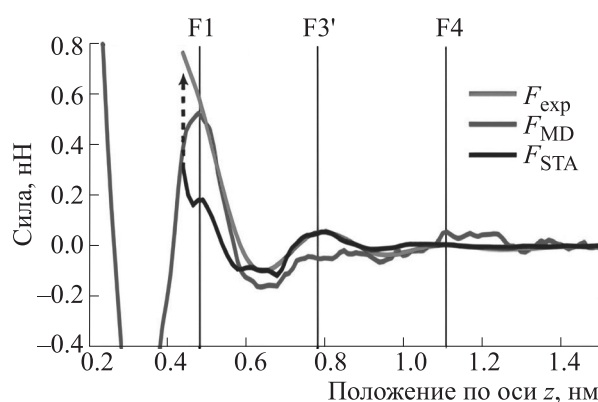


Рис. 10. Экспериментальные и рассчитанные КСР, определенные по положению Са на границе раздела «флюорит–вода». Адаптировано из работы [44] с разрешения издательства RCS Pub (2016).

$$F(R) = -kT \frac{d \ln \frac{\rho_o(R)}{\rho}}{dR}, \quad (6)$$

где $\rho_o(R)$ — функция распределения атомов кислорода, ρ — средняя плотность воды. В отличие от расчетов по формуле (2) расчеты в приближении STA в десятки раз менее затратны, так как расчеты по формуле (2) требуют термодинамического интегрирования. В работе [44] проведено сравнение сил взаимодействия, полученное как по формуле (2), так и по формуле (6). Расчеты проводили для нанозонда, расположенного на границе раздела неорганического минерала (флюорита) и воды (рис. 10). На рис. 10 показано также сравнение с экспериментальными данными.

Хотя приведенные расчеты показывают хорошую корреляцию, существуют физические причины наблюдаемых расхождений между STA и экспериментом. Это связано с тем, что модель STA не рассматривает реальный зонд и, как следствие, не рассматривает образование гидратной структуры вокруг зонда. Последний может существенно искажать гидратную структуру образца, а интерференция этих гидратных структур усиливается по мере уменьшения расстояния между зондом и образцом.

Моделирование для улучшения качества изображений. Моделирование также активно используется для улучшения качества АСМ-изображения. Одним из способов улучшения является молекулярная динамика с дополнительной подгонкой (molecular dynamics flexible fitting — MDFF) [45]. Это расширение метода молекулярной динамики, в котором для определения равновесной структуры в потенциальную энергию взаимодействия, определяемую стандартными силовыми параметрами, добавляется дополнительный потенциал, который учитывает экспериментальные данные. Для этого вводится дополнительный потенциал V_{AFM} , который учитывает разницу между

моделированием и экспериментом (детали см. в [46]). В работе [46], где исследовался миозин, меняющий свое химическое состояние, было определено конформационно отличное состояние для каждого АСМ-изображения миозина, связанного с актиновой нитью, в двух конформационных состояниях «вниз–вверх» и «вниз–вниз». Затем для ранее полученного АСМ-изображения миозина, связанного с актиновой нитью, исследователи выполнили MDFF-моделирование. Сравнивая результаты подгонки, они сделали вывод о его конформационном и химическом состоянии по АСМ-изображению. На рис. 11 представлено сравнение изображения и моделирования с гибкой подгонкой, из которого можно сделать вывод, что метод MDFF может давать существенное увеличение разрешения изображений в том случае, если конформационные изменения при наложении на АСМ-изображения относительно невелики или выбор таких изменений заранее определен.

Другим широко распространенным методом обработки АСМ-изображений является подход на основе сверточных нейронных сетей [47]. Идея последних заключается в комбинации сверточных и субдискретизирующих слоев. Как правило, для обучения используется метод обратного распространения ошибки. Заметим, что этот метод очень часто используется для распознавания изображений. Примеры использования этого метода для улучшения качества АСМ-изображений представлены в работе [48]. Однако до сих пор применение метода ограничивается изображениями очень небольших молекул, так как с увеличением числа атомов вариabельность конформаций резко возрастает.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленном обзоре кратко рассмотрены возможности БАСМ для исследования биологи-

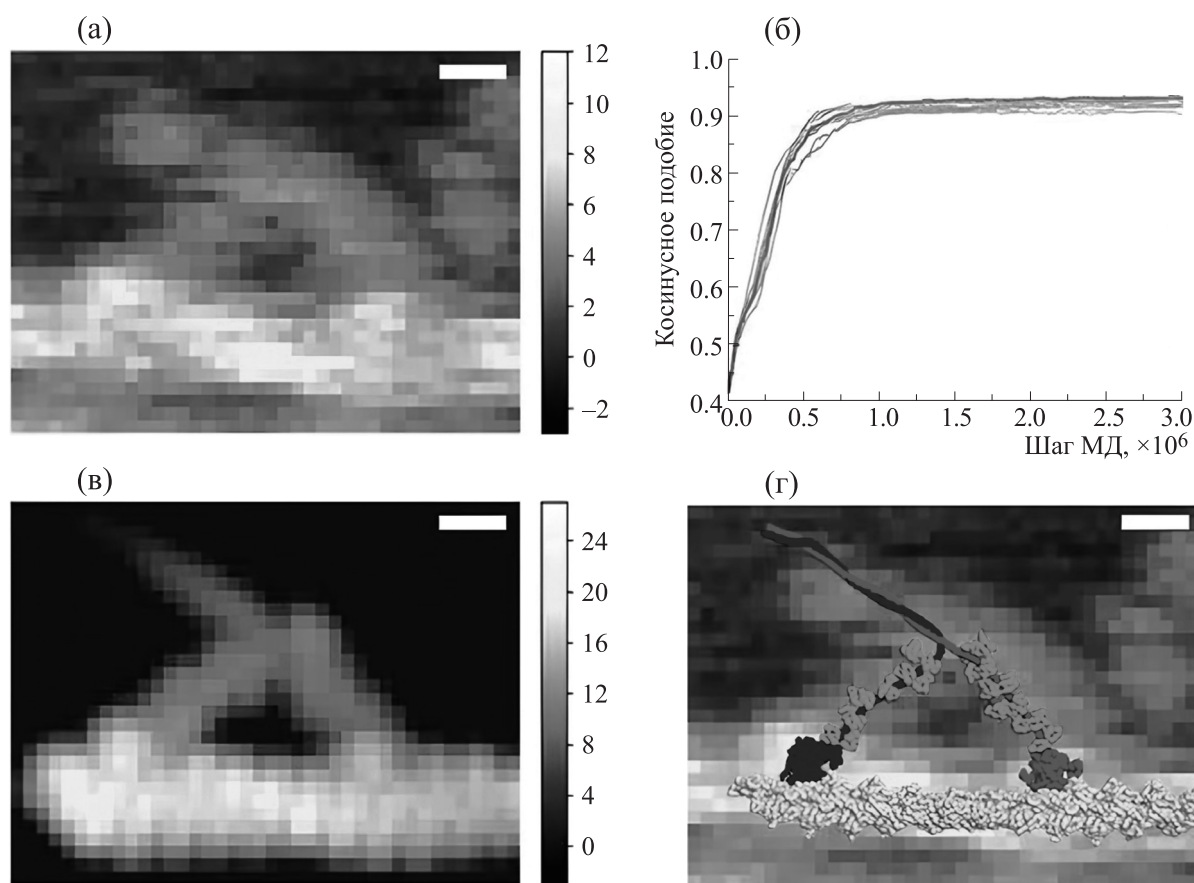


Рис. 11. MDFF-моделирование актин-миозинового комплекса в состоянии «вниз–вверх». (а) — Экспериментальное изображение, используемое в качестве эталона (масштабная линейка — 10 нм, цветовая полоса в нм). (б) — Временная зависимость изменения сходства между эталоном и результатами моделирования для десяти независимых запусков моделирования. Трактория, включающая наибольшее значение, окрашена в красный цвет. (в) — АСМ-изображение с наибольшим сходством. (г) — Молекулярная модель структуры актин-миозинового комплекса, с наибольшим сходством наложенная на эталон. Воспроизведено из работы [46] с разрешения издательства Frontiers Media S.A. (2022).

ческих образцов. Приведенные примеры показывают, что БАСМ является эффективным методом для исследования адсорбированных биомолекул и биомолекулярных комплексов на границе раздела фаз или на поверхности мембраны. По существу, у метода нет ограничений по объектам: это могут быть как небольшие биомолекулы (олигопептиды), так и комплексы, включающие миллионы атомов (вирусы и вирусные оболочки). Основное достоинство метода в том, что он является неразрушающим и позволяет исследовать биологические образцы при физиологических условиях (температура, pH, концентрация ионов и т.д.). При этом метод обеспечивает субнанометровое разрешение не только для самих образцов, но и структуры гидратной оболочки биомолекулы. В определенных случаях (например, для сильнозаряженных объектов) с помощью БАСМ можно получить не только изображение образца с субнанометровым разрешением, но и определить его отдельные характе-

ристики (распределение заряда по поверхности, гидрофильность или гидрофобность той или иной аминокислоты и т.д.). Для дальнейшего развития этого метода требуется интеграция БАСМ с различными методами моделирования и машинного обучения. Однако количество таких работ пока невелико. В первую очередь, проблемой является отсутствие информации о детальной молекулярной структуре зонда. Во-вторых, существуют проблемы с наноскопическими размерами как образцов, так и АСМ зонда, что приводит к тому, что моделирование этих объектов с учетом всех атомных деталей чрезвычайно затратно. Поэтому особую роль в моделировании БАСМ должны играть как приближенные теории (ДЛФО, 3D-RISM), так и методы машинного обучения. Обсужденные выше примеры показывают, что удачная комбинация БАСМ с этими подходами является скорее искусством, чем универсальным способом, тем не менее, перспективность этого направления не вызывает сомнений.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов, с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Binnig G. and Rohrer H. Scanning tunneling microscopy. *Helvetica Phys. Acta*, **55**, 726–735 (1982).
2. Binnig G., Quate C. F., and Gerber C. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.*, **56** (9), 930–933 (1986). DOI: 10.1103/PhysRevLett.56.930
3. García R., *Amplitude modulation atomic force microscopy* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2010). DOI: 10.1002/9783527632183
4. Morris V. J., Kirby A. R., and Gunning A. P. *Atomic force microscopy for biologists* (Imperial College Press, 2009).
5. Melitz W., Shen J., Kummel A. C., and Lee S. Kelvin probe force microscopy and its application. *Surface Sci. Rep.*, **66** (1), 1–27 (2011). DOI: 10.1016/j.surfrep.2010.10.001
6. Chen X., Li B., Liao Z., Li J., Li X., Yin J., and Guo W. Principles and applications of liquid-environment atomic force microscopy. *Adv. Mater. Interfaces*, **9** (35), 2201864 (2022). DOI: 10.1002/admi.202201864
7. Baro A. M. and Reifengerger R. G. *Atomic force microscopy in liquid* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2012). DOI: 10.1002/9783527649808
8. Kominami H., Kobayashi K., and Yamada H. Molecular-scale visualization and surface charge density measurement of Z-DNA in aqueous solution. *Sci. Rep.*, **9**, 6851 (2019). DOI: 10.1038/s41598-019-42394-5
9. Kuchuk K. and Sivan U. Hydration structure of a single DNA molecule revealed by frequency-modulation atomic force microscopy. *Nano Lett.*, **18** (4), 2733–2737 (2018). DOI: 10.1021/acs.nanolett.8b00854
10. Heenan P. R. and Perkins T. T. Imaging DNA Equilibrated onto mica in liquid using biochemically relevant deposition conditions. *ACS Nano*, **13** (4), 4220–4229 (2019). DOI: 10.1021/acsnano.8b09234
11. Sotres J. and Baró A. M. AFM imaging and analysis of electrostatic double layer forces on single DNA molecules. *Biophys. J.*, **98** (9), 1995–2004 (2010). DOI: 10.1016/j.bpj.2009.12.4330
12. Sumikama T., Foster A. S., and Fukuma T. Computed atomic force microscopy images of chromosomes by calculating forces with oscillating probes. *J. Phys. Chem. C*, **124** (3), 2213–2218 (2020). DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b10263
13. Ido S., Kobayashi K., Oyabu N., Hirata Y., Matsushige K., and Yamada H. Structured water molecules on membrane proteins resolved by atomic force microscopy. *Nano Lett.*, **22** (6), 2391–2397 (2022). DOI: 10.1021/acs.nanolett.2c00029
14. Philippsen A., Im W., Engel A., Schirmer T., Roux B., and Müller D. J. Imaging the electrostatic potential of transmembrane channels: atomic probe microscopy of OmpF porin. *Biophys. J.*, **82** (3), 1667–1676 (2003). DOI: 10.1016/S0006-3495(02)75517-3
15. MacKerell A. D., Bashford D., Bellott M., Dunbrack R. L., Evanseck J. D., Field M. J., Fischer S., Gao J., Guo H., Ha S., Joseph-McCarthy D., Kuchnir L., Kuczera K., Lau F. T., Mattos C., Michnick S., Ngo T., Nguyen D. T., Prodhom B., Reiher W. E., Roux B., Schlenkrich M., Smith J. C., Stote R., Straub J., Watanabe M., Wiórkiewicz-Kuczera J., Yin D., and Karplus M. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B*, **102** (18), 3586–3616 (1998). DOI: 10.1021/jp973084f
16. Hernando-Pérez M., Cartagena-Rivera A. X., Lošdorfer Božič A., Carrillo P. J., San Martín C., Mateu M. G., Raman A., Podgornik R., and Pablo P. Quantitative nanoscale electrostatics of viruses. *J. Nanoscale*, **7** (41), 17289–17298 (2015). DOI: 10.1039/C5NR04274G
17. Heldt C. L., Areo O., Joshi P. U., Mi X., Ivanova Y., and Berrill A. Empty and full AAV capsid charge and hydrophobicity differences measured with single-particle AFM. *Langmuir*, **39** (16), 5641–5648 (2023). DOI: 10.1021/acs.langmuir.2c02643
18. Дерягин Б. В., Чураев Н. В., и Муллер В. М. *Поверхностные силы* (Наука, М., 1985).
19. van Oss C. J. The extended DLVO theory. *Interface Sci. Technol.*, **16**, 31–48 (2008). DOI: 10.1016/S1573-4285(08)00203-2
20. Sharma P. K. and Hanumantha R. K. Adhesion of paenibacillus polymyxa on chalcopyrite and pyrite: surface thermodynamics and extended DLVO theory. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **29** (1), 21–38 (2003). DOI: 10.1016/S0927-7765(02)00180-7
21. Liang Y., Hilal N., Langston P., and Starov V. Interaction forces between colloidal particles in liquid: theory and experiment. *J. Adv. Colloid Interface Sci.*, **134–135**, 151–166 (2007). DOI: 10.1016/j.cis.2007.04.003
22. Klaassen A., Liu F., Mugele F., and Siretanu I. Correlation between electrostatic and hydration forces on silica and gibbsite surfaces: an atomic force microscopy study. *Langmuir*, **38** (3), 914–926 (2022). DOI: 10.1021/acs.langmuir.1c02077
23. Li L., Eppell S., and Zypman F. Method to quantify nanoscale surface charge in liquid with atomic force microscopy. *Langmuir*, **36** (15), 4123–4134 (2020). DOI: 10.1021/acs.langmuir.9b03602
24. Li L., Steinmetz N., Eppell S., and Zypman F. Charge calibration standard for atomic force microscope tips in liquids. *Langmuir*, **36** (45), 13621–13632 (2020). DOI: 10.1021/acs.langmuir.0c02455
25. Blum L. J. Invariant Expansion for two-body correlations: thermodynamic functions, scattering, and the Ornstein–Zernike equation. *J. Chem. Phys.*, **56**, 303–310 (1972). DOI: 10.1063/1.1676864

26. Ikeguchi M. and Doi J. Direct numerical solution of the Ornstein–Zernike integral equation and spatial distribution of water around hydrophobic molecules. *J. Chem. Phys.*, **103** (12), 5011–5017 (1995). DOI: 10.1063/1.470587
27. Ishizuka R. and Yoshida N. Extended molecular Ornstein–Zernike integral equation for fully anisotropic solute molecules: formulation in a rectangular coordinate system. *J. Chem. Phys.*, **139** (8), 084119 (2013). DOI: 10.1063/1.4819211
28. Fedotova M. V. and Kruchinin S. E. Ion-binding of glycine zwitterion with inorganic ions in biologically relevant aqueous electrolyte solutions. *Biophys. Chem.*, **190–191**, 25–31 (2014). DOI: 10.1016/j.bpc.2014.04.001
29. Dmitrieva O. A. and Fedotova M. V. Characterization of selective binding of biologically relevant inorganic ions with the proline zwitterion by 3D-RISM theory. *New J. Chem.*, **39** (11), 8594–8601 (2015). DOI: 10.1039/C5NJ01559F
30. Fedotova M. V. and Dmitrieva O. A. Proline hydration at low temperatures: its role in the protection of cell from freeze-induced stress. *Amino Acids*, **48** (7), 1685–1694 (2016). DOI: 10.1007/s00726-016-2232-1
31. Fedotova M. V., Kruchinin S. E., and Chuev G. N. Hydration structure of osmolyte TMAO: concentration/pressure-induced response. *New J. Chem.*, **41** (3), 1219–1228 (2017). DOI: 10.1039/C6NJ03296F
32. Fedotova M. V. and Kruchinin S. E. Hydration and ion-binding of glycine betaine: How they may be involved into protection of proteins under abiotic stresses. *J. Mol. Liq.*, **244**, 489–498 (2017). DOI: 10.1016/j.molliq.2017.08.117
33. Fedotova M. V. Compatible osmolytes – bioprotectants: Is there a common link between their hydration and their protective action under abiotic stresses? *J. Mol. Liq.*, **292**, 111339 (2019). DOI: 10.1016/j.molliq.2019.111339
34. Fedotova M. V., Kruchinin S. E., and Chuev G. N. Hydration features of the neurotransmitter acetylcholine. *J. Mol. Liq.*, **304**, 112757 (2020). DOI: 10.1016/j.molliq.2020.112757
35. Kumawat N., Tucs A., Bera S., Chuev G. N., Valiev M., Fedotova M. V., Kruchinin S. E., Tsuda K., Sljoka A., and Chakraborty A. Site density functional theory and structural bioinformatics analysis of the SARS-CoV spike protein and hACE2 complex. *Molecules*, **27** (3), 799 (2022). DOI: 10.3390/molecules27030799
36. Kruchinin S. E., Kislinkaya E. E., Chuev G. N., and Fedotova M. V. Protein 3D hydration: a case of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Int. J. Mol. Sci.*, **23** (23), 14785 (2022). DOI: 10.3390/ijms232314785
37. Kruchinin S. E., Chuev G. N., and Fedotova M. V. Molecular insight on hydration of protein tyrosine phosphatase 1B and its complexes with ligands. *J. Mol. Liq.*, **384**, 122281 (2023). DOI: 10.1016/j.molliq.2023.122281
38. Кручинин С. Е., Федотова М. В., Кислинская Е. Е. и Чуев Г. Н. *In silico* исследование сольватационных эффектов в растворах биомолекул: возможности подхода, основанного на 3D-распределении атомной плотности растворителя. *Биофизика*, **68** (5), 837–849 (2023). DOI: 10.31857/S0006302923050010
39. Chandler D. and Andersen H. C. Optimized cluster expansions for classical fluids. II. Theory of molecular liquids. *J. Chem. Phys.*, **57** (5), 1930 (1972). DOI: 10.1063/1.1678513
40. Hirata F., Rossky P. J., and Pettitt B. M. The interionic potential of mean force in a molecular polar solvent from an extended RISM equation. *J. Chem. Phys.*, **78** (6), 4133–4144 (1983). DOI: 10.1063/1.445090
41. Perkyns J. and Pettitt B. M. A site–site theory for finite concentration saline solutions. *J. Chem. Phys.*, **97** (10), 7656–7666 (1992). DOI: 10.1063/1.463485
42. Harada M. and Tsukada M. Tip-sample interaction force mediated by water molecules for AFM in water: Three-dimensional reference interaction site model theory. *J. Physical Review B*, **82** (3), 035414 (2010). DOI: 10.1103/PhysRevB.82.035414
43. Watkins M. and Reischl B. A simple approximation for forces exerted on an AFM tip in liquid. *J. Chem. Phys.*, **138** (15), 154703 (2013). DOI: 10.1063/1.4800770
44. Miyazawa K., Kobayashi N., Watkins M., Shluger A., Amano K., and Fukuma T. A relationship between three-dimensional surface hydration structures and force distribution measured by atomic force microscopy. *J. Nanoscale*, **8**, 7334–7342 (2016). DOI: 10.1039/C5NR08092D
45. Trabuco L. G., Villa E., Mitra K., Frank J., and Schulten K. Flexible fitting of atomic structures into electron microscopy maps using molecular dynamics. *J. Structure*, **16** (5), 673–683 (2008). DOI: 10.1016/j.str.2008.03.005
46. Fuchigami S. and Takada S. Inferring conformational state of myosin motor in an atomic force microscopy image via flexible fitting molecular simulations. *J. Frontiers in Molecular Biosciences*, **9**, 882989 (2022). DOI: 10.3389/fmolb.2022.882989
47. LeCun Y., Boser B., Denker J. S., Henderson D., Howard R. E., Hubbard W., and Jackel L. D. Back-propagation applied to handwritten zip code recognition. *J. Neural Computation*, **1** (4), 541–551 (1989). DOI: 10.1162/neco.1989.1.4.541
48. Oinonen N., Xu C., Alldritt B., Canova F. F., Urtev F., Cai S., Krejčí O., Kannala J., Liljeroth P., and Foster A. S. Correction to electrostatic discovery atomic force microscopy. *J. ACS Nano*, **16**, 89 (2022). DOI: 10.1021/acsnano.2c08130
49. Fukuma T., Ueda Y., Yoshioka Sh., and Asakawa H. Atomic-scale distribution of water molecules at the mica-water interface visualized by three-dimensional scanning force microscopy. *Phys. Rev. Lett.*, **104** (1), 016101 (2010). DOI: 10.1103/PhysRevLett.104.016101

Noncontact Atomic Force Microscopy for Studying Biomolecules in Liquids

T. Mamedov*, A. Shvirst*, M.V. Fedotova**, and G.N. Chuev*

**Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***G.A. Krestov Institute of Solution Chemistry, Russian Academy of Sciences, Akademicheskaya ul. 1, Ivanovo, 153045 Russia*

Noncontact atomic force microscopy, a type of scanning probe microscopy, has been actively used in the last two decades to study hydrated biomolecules. Analysis of modern literature shows that noncontact atomic force microscopy is a very promising method for studying adsorbed biomacromolecules and biomacromolecular complexes at the membrane interface or surfaces. This mini-review describes the foundations of this method, its application to biomolecules, discusses the requirements for the method and the possibility of its extension through additional processing of the obtained experimental data using theoretical analysis, molecular modeling or machine learning.

Keywords: hydrated biomolecules, noncontact atomic force microscopy, molecular modeling, machine learning