

УДК 576.315

# Микроскопия сверхвысокого разрешения в изучении структуры и функционирования клеточного ядра

С. С. Рябичко<sup>1</sup>, А. Н. Ибрагимов<sup>1</sup>, Л. А. Лебедева<sup>1</sup>, Е. Н. Козлов<sup>1</sup>, Ю. В. Шидловский<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5<sup>2</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119048, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

\*E-mail: yul.biogen@gmail.com

Поступила в редакцию 03.04.2017

Принята к печати 07.11.2017

**РЕФЕРАТ** В последние десятилетия были разработаны новые микроскопические технологии, получившие общее название микроскопия сверхвысокого разрешения. Эти технологии позволяют получать изображения клетки в свете видимого диапазона с разрешением до 10 нм. Применение микроскопии нового типа представляет большой интерес для изучения строения и функционирования клеточного ядра. В обзоре рассмотрены основные данные, полученные в этой области.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** гистоны, ДНК, микроскопия сверхвысокого разрешения, хроматин, хромосома, ядро клетки.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** МСВР – микроскопия сверхвысокого разрешения; BALM – binding activated localization microscopy (активированная связыванием локализационная микроскопия); FISH – fluorescence *in situ* hybridization (флуоресцентная гибридизация *in situ*); PALM – photoactivated localization microscopy (фотоактивированная локализационная микроскопия); SIM – structured illumination microscopy (микроскопия структурированного освещения); SMLM – single molecule localization microscopy (микроскопия единичных молекул); STED – stimulated emission depletion (истощение стимулированной эмиссией); STORM – stochastic optical reconstruction microscopy (стохастическая оптическая реконструкция).

## ВВЕДЕНИЕ

Ядро клетки выполняет важнейшую функцию хранения и реализации наследственной информации. Прогресс в изучении структуры и функций ядра долгое время тормозился недостатком адекватных методов, применимых к внутриядерным структурам. Наиболее востребованный в настоящее время метод изучения структуры ядра – сканирующая конфокальная микроскопия – имеет предел разрешающей способности около 200 и 500 нм (латеральное и аксиальное разрешение соответственно). В распоряжении исследователей имеются также и другие микроскопические методы, позволяющие изучать процессы в ядре на молекулярном уровне [1]. Однако изучение ядра в масштабах 20–200 нм представляет техническую сложность. Лишь развитие методов группы ЗС и появление метода Hi-C позволило приблизиться к пониманию принципов организации хроматина на этом уровне [2, 3]. В последние десятилетия активно развивается еще один подход, который позволил сделать прорыв в области изучения деталей

строения и функционирования клеточного ядра – микроскопия сверхвысокого разрешения (МСВР). В МСВР дифракционный предел преодолевается с использованием различных технологий, включающих как технические решения в конструкции микроскопа, так и реконструкцию изображения с помощью вычислительного аппарата [4].

## ПРИНЦИПЫ И ВОЗМОЖНОСТИ МСВР

Наиболее значительные успехи в визуализации со сверхвысоким разрешением были достигнуты при использовании микроскопии дальнего поля [5]. В 4Pi-микроскопии используются две противоположно направленные объективные линзы, фокусируемые в одной точке, что позволяет улучшить аксиальное разрешение до 100 нм. В других методах МСВР преодоление дифракционного предела достигается двумя путями. Первый – пространственное и/или временное модулирование перехода между двумя молекулярными состояниями флуорофора. Второй – сужение пика функции рассеяния точки, получае-

мой от большого количества изображений группы флуорофоров, локализованных вблизи друг друга. Основными методами первой группы являются методы истощения стимулированной эмиссией (STED), истощения основного состояния (GSD), структурированного освещения (SIM) и их некоторые комбинации с I<sup>5</sup>M-микроскопией (вариацией 4Pi) [6, 7]. Основные методы второй группы – фотоактивированная и флуоресцентная фотоактивированная локализационная микроскопия (PALM, FPALM), стохастическая оптическая реконструкция (STORM), активированная связыванием локализационная микроскопия (BALM) [7, 8].

В технологии SIM используется определенным образом структурированное освещение объекта, что позволяет удвоить разрешающую способность по каждой оси и достичь 100 нм для латерального и 300 нм для аксиального разрешения. В объеме это улучшение становится уже восьмикратным. Частое использование этого типа микроскопии связано с тем, что образцы можно готовить стандартным способом и применять стандартные флуорофоры. В методе STED образец подвергается практически одновременной обработке двумя лазерами с разной длиной волны – возбуждающим и истощающим, благодаря сочетанию которых возбуждение флуоресценции достигается в узкой области фокального центра размером порядка 50–80 нм. С помощью данного метода можно достичь разрешения 20 нм в фокальной плоскости и 45 нм во всех трех направлениях.

Методы PALM, FPALM, BALM и STORM относятся к микроскопии единичных молекул (SMLM). Образец подвергается многократному действию возбуждающего лазера малой мощности, в каждом акте активируется и точно локализуется (на основании функции рассеяния точки) небольшая доля флуорофоров. Разрешение изображения, полученного этими методами, зависит от соотношения количества фотонов от отдельного флуорофора к общему фону флуоресценции и может быть доведено в теории до 1 нм [9].

Более подробную информацию о принципах упомянутых методов, их преимуществах и недостатках можно почерпнуть в недавних обзорах, например, [10, 11]. Одна из последних разработок МСВР – методика W-4PiSMSN – позволяет визуализировать целую клетку с разрешением 10–20 нм, причем толщина клетки может достигать 10 мкм [12].

Как правило, для визуализации глобальной структуры ядра используют мечение гистонов флуоресцентными белками [13] либо флуоресцентные метки, связывающиеся с ДНК и РНК [14–16]. Гистоны могут быть слиты с флуоресцентными белками, а также модифицироваться химически [17, 18]. ДНК в опытах

с МСВР можно пометить с помощью классических красителей, таких, как Hoechst и DAPI [19], также созданы более фотостабильные и фотопереключаемые флуорофоры [15, 20, 21]. МСВР совместима с клик-химией, позволяющей ввести флуоресцентные метки в ДНК [22, 23]. Предложен метод визуализации ДНК на основе собственной флуоресценции нуклеотидов [24].

Детектировать специфические последовательности ДНК в МСВР можно с помощью классического метода флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), который сохраняет в целом тонкую структуру ядра [25]. Предложены метод DNA-PAINT, позволяющий получать многоцветное изображение с разрешением менее 10 нм [26], методы мультиплексного FISH со сменой зондов [27, 28]. Специфические последовательности ДНК могут быть также локализованы с помощью программируемых gRNA/dCas9-комплексов [29].

При визуализации ДНК с помощью SMLM разрешение составляет обычно около 25 нм, что соответствует примерно 70 п.н. линейной двухцепочечной ДНК [30, 31]. В живых клетках достигнуто разрешение 70 нм [32]. В настоящее время в методах с использованием гибридизации олигонуклеотидов удалось добиться разрешения 5 нм в плотно меченных образцах [33]. Таким образом, МСВР открыла возможность оптического генетического картирования высокого разрешения [34]. Так, изучены повторы ДНК на участке гетерохроматина Yq12 генома человека [35]. Подсчитано количество тринуклеотидных повторов в 5'-нетранслируемой области гена *FMR1* [36]. Микроскопия единичных молекул, соединенная с методикой Oligopaint, позволяет детектировать однонуклеотидные полиморфизмы и отличать таким образом гомологичные хромосомы друг от друга [37]. Предложен комплементарный метод молекулярных маяков, с помощью которого удалось визуализировать уникальную последовательность ДНК длиной 2.5 т.п.н. [38]. МСВР позволяет с высокой точностью измерять объем, который занимают отдельные генные локусы в пространстве ядра и оценивать уровень их компактизации [39], детектировать точное взаимное расположение отдельных локусов [40, 41]. Также с высокой точностью можно локализовать в ядре эпигенетические маркеры [42, 43].

Белок, который нужно обнаружить в ядре с помощью МСВР, обычно синтезируют в клетке в слитом виде с другим флуоресцентным белком. Важно, что МСВР позволяет не только локализовать флуорофор, но и определить его количество в месте локализации с точностью до одной молекулы [44–46]. Созданы методы одновременной детекции нескольких белков (в настоящее время до девяти) на одном препарате [47, 48].

МСВР применяют во многих исследованиях. Далее приведены основные результаты, полученные этим методом при изучении структуры и функций клеточного ядра.

### **ОБЩАЯ АРХИТЕКТУРА КЛЕТОЧНОГО ЯДРА И УПАКОВКА ХРОМАТИНА**

Общая архитектура ядра была изучена с высоким разрешением в различных типах клеток [49]. Например, описаны перестройки структуры клеточного ядра в процессе миелопоза у человека [50], нейрогенеза у мыши [51], в клетках ранних эмбрионов и клонированных клеток быка [52, 53], в клеточном цикле дрожжей [54]. Подобные работы часто имеют описательный характер, так как о механизмах формирования тонкой структуры ядра известно очень немного.

В одной из ранних работ тонкую организацию клеточного ядра млекопитающих изучали с помощью 3D-SIM [55]. В нуклеоплазме выявлены каналы и лакуны, начинающиеся у ядерной поры и идущей в глубь ядра (интерхроматиновый компартмент). В пределах каждой хромосомной территории внутренние участки высокоструктурированных доменов хроматина отделены от интерхроматина слоем деконденсированного, транскрипционно активного хроматина толщиной 100–200 нм (периферический хроматин). Последний обогащен маркерами активной транскрипции и репликации, в то время как маркеры сплайсинга преимущественно локализуются в интерхроматиновом компартменте. Выявлены кластеры РНК-полимеразы II, в то же время существенная доля транскрипции обнаружена вне этих кластеров. Данные, полученные с помощью МСВР и 3С-методов, позволили создать модель организации ядра, в которой активный хроматин кластеризуется и выстраивается на границах сети внутриклеточных каналов, пронизывающих основную массу неактивного хроматина [56]. Локализация областей регуляции транскрипции на периферии доменов хроматина подтверждена с помощью FISH [57].

Изучение периферии ядра в клетках человека методом SIM показало, что у ядерных пор в целом снижается количество маркеров гетерохроматина, однако как эу-, так и гетерохроматин может формировать контакты с порой. С ядерными порами ассоциированы хроматинмодифицирующие ферменты, что может говорить о роли поры в организации структуры хроматина в ядре [58].

Одна из первых работ, в которой использовали меченые гистоны, показала, что общая плотность гистонов отличается в разных типах клеток человека. С помощью dSTORM обнаружены глобальные флуктуации плотности гистонов в ядре масштаба 1–2 мкм

[59]. Измерение общей плотности гистона H2B в ядрах клеточной линии U2OS человека методом PALM позволило определить параметры модели распределения хроматина в ядре, а также подтвердить модель фрактальной глобулы [60]. Изучение динамики гистона H2B с помощью dSTORM в клетках HeLa показало, что гистоны формируют кластеры, разделенные расстоянием около 100 нм идвигающиеся со скоростью 3 нм/с в интерфазном ядре [18]. С применением PALM в клетках человека описаны кластеры гистонов со средним диаметром 160 нм, формирование которых зависит от когезина и межнуклеосомных взаимодействий, но не зависит от транскрипции. Эти домены представлены и в митотических хромосомах, и в интерфазном ядре. Возможно, они являются строительными блоками хромосом [61].

Методом PALM показано существование филamentos диаметром 70 нм в метафазном хроматине дрозофилы [62]. STED-микроскопию использовали для изучения структуры хроматина в кардиомиоцитах, в которых выявлены домены хроматина размером 40–70 нм [63]. Детальный анализ распределения нуклеосом вдоль ДНК проведен с помощью STORM в клетках мыши и человека [64]. Показано, что нуклеосомы формируют в ядре гетерогенные группы различного размера (клатчи). Среднее количество нуклеосом в группе и их плотность зависят от типа клеток: в плюрипотентных клетках эти группы менее плотные и содержат меньше нуклеосом. РНК-полимераза II преимущественно локализуется с клатчами наименьшего размера, а гистон H1 и гетерохроматин – с наибольшими клатчами.

С помощью метода 3D-STORM проведено масштабное исследование упаковки ДНК в хроматине различного типа в клетках дрозофилы [65]. Изучены транскрипционно активные, неактивные и поликомб-домены. Первые оказались наименее компактными, последние – наиболее плотными. Степень упаковки указанных доменов по-разному зависит от размера домена: чем больше размер активного домена, тем менее он плотный, тогда как, чем больше размер поликомб-домена, тем выше его плотность. Показано, что для поликомб-доменов, в отличие от доменов двух других типов, характерна высокая степень перемешивания ДНК внутри отдельного домена и практически полное отсутствие перемешивания с соседними доменами другого типа. Созданы модели укладки хроматина в доменах разного типа.

Таким образом, к настоящему времени описаны внутриядерные домены хроматина различного масштаба. Для выяснения соотношения внутриядерных доменов друг с другом и с топологически ассоциированными доменами, выявляемыми при Hi-C-анализе, требуются дальнейшие исследования.

## ГЕТЕРОХРОМАТИН

Детали строения гетерохроматина сателлитной ДНК в стареющих клетках человека изучали с применением STED-микроскопии [66]. Как в стареющих, так и в делящихся клетках сателлитная ДНК упакована в набор компактных глобул, разделенных линкерами, однако в процессе старения расстояние между глобулами увеличивается. Микроскопия LSBM (light-sheet Bayesian super-resolution microscopy) позволила увидеть, что основной белок гетерохроматина HP1 формирует в ядрах человека сетку [67].

В клетках дрожжей, как показано с помощью SIM, в интерфазе транскрипционно неактивный хроматин менее компактен, чем эухроматин. В то же время обнаружены высококонденсированные тельца, включающие около 50 т.п.н., фланкирующие неактивные теломерные области. Формирование этих телец не зависит от белка HP1, но зависит от метилирования остатка H3K36 [68].

3D-STORM в сочетании с методом Oligopaint был использован для визуализации хроматина, связанного с фактором поликомб, в эмбриональных стволовых клетках и предшественниках нейрональных клеток мыши [69]. Обнаружено формирование компактных областей в локусе генов *Notx*, причем при удалении белка Phc1 наблюдалась декомпактизация хроматина. Эти области состоят из небольших дискретных доменов, содержащих 20–140 т.п.н. ДНК, которые отличаются от топологически ассоциированных доменов (ТАД). В другой работе в ядрах клеток дрозофилы выявлено несколько сотен поликомб-кластеров, которые отличаются от поликомб-телец, изученных ранее. Количество кластеров зависит от целостности полимеризующегося SAM-мотива белка Ph и его содержания в клетке. Возможно, найденные кластеры формируют сеть дальних взаимодействий по всему геному и таким образом поддерживают глобальную архитектуру ядра [70].

Использование метода 3D-SIM позволило установить структуру телец Барра в клетках мышей [71]. Несмотря на значительное уменьшение в размерах, инактивированная X-хромосома сохраняет общую структуру, характерную для нормальной хромосомной территории. Однако при этом значительно уменьшается объем внутренних каналов. Этим же методом определена локализация РНК-связывающих белков Rbm15, Spen, Wtap на Xist РНК [72]. STORM-анализ инактивированной X-хромосомы в фибробластах мыши позволил подсчитать, что на ней присутствует лишь 50–100 молекул Xist и около 50 скоплений комплекса PRC2 [73].

## СТРУКТУРА КОНДЕНСИРОВАННЫХ ХРОМОСОМ

Хроматин расположен определенным образом не только вдоль хромосомы (полосы на полите-

ных хромосомах), но и радиально. На митотической X-хромосоме самцов дрозофилы методом SIM продемонстрирована периферическая локализация активно транскрибируемых локусов, начиная с профазы. В целом, в конденсированной митотической хромосоме молчащие области локализуются ближе к ее оси, а активные – ближе к поверхности [74]. 3D-SIM использовали для изучения явления дифференциальной доступности разных локусов метафазой хромосомы в лимфоцитах человека [75].

Схожим образом визуализация хромосом мыши на стадии пахитены с помощью SMLM позволила выявить три типа хроматина [76]. Первый расположен радиально (несет маркер активной транскрипции H3K4me3) и формирует петлеподобные структуры. Второй расположен вдоль оси хромосомы и несет маркер H3K27me3. Наконец, имеется центромерный хроматин, несущий маркер H3K9me3.

С помощью 3D-SIM изучено участие различных форм конденсина в формировании остова хромосомы в клетках курицы. В клетках с нокаутом субъединиц конденсина I митотические хромосомы становились короче и толще, имели размытый остов, а с нокаутом субъединиц конденсина II остов был более четким, хромосомы – более удлиненными и теряли жесткость в аксиальном направлении [77]. Пространственную организацию мейотической хромосомы изучали с использованием различных методов МСВР [78]. В клетках дрожжей методом 3D-SIM показано формирование оси хромосомы из мейотического когезина, а также нарушения в строении хромосом в отсутствие когезина [79, 80].

С помощью STORM визуализированы так называемые T-петли на теломерах мыши. Изучение структуры петли на фоне различных мутаций показало значимость фактора TRF2 для формирования этой структуры [81].

Микроскопию единичных молекул применили к изучению организации центромеры в клетках курицы: центромерный хроматин в них представлен слоями с чередующимися доменами, обогащенными гистонами CENP-A или H3. Во время митоза CENP-C-зависимый механизм сшивает CENP-A-блоки [82]. В клетках дрожжей с помощью PALM проведен подсчет молекул CENP-A в центромере и показано, что этот гистон загружается у дрожжей на центромеру в фазе G2, в отличие от клеток многоклеточных [83].

Методом SIM на клетках различных видов растений показано, что гистон CENH3 и модифицированный гистон H2AThr120P встраиваются в различные нуклеосомы, которые формируют различные домены [84]. У ячменя два варианта центромерного гистона, альфа- и бета-CENH3, встраиваются в различные

домены центромерного хроматина в интерфазе, причем паттерн встраивания тканеспецифичен [85].

### ТРАНСКРИПЦИЯ

МСВР использовали для визуализации процессов, происходящих при активации транскрипции генов. Методом STORM показано, что при активации гена *Hoxd* млекопитающих его локус декомпактизуется и принимает вытянутую конфигурацию [86]. В клетках мыши с помощью 3D-SIM визуализирован локус бета-глобина: неактивный локус имеет несколько различных конформаций, в процессе дифференцировки клеток локус уменьшается в размере, и его структура становится более упорядоченной [87]. На препаратах расправленного хроматина из клеток HeLa методом BALM была визуализирована локальная деконденсация хроматина в локусах активной транскрипции также. Стимуляция клеток приводила к появлению областей открытого хроматина длиной около 388 нм и толщиной около 60 нм, обогащенных активной формой РНК-полимеразы II [88]. С помощью этого же метода визуализированы дальние контакты, возникающие в геноме отдельной клетки при участии факторов транскрипции YAP, SRF, NF-κарраВ [89].

Микроскопия единичных молекул, соединенная с микроскопией светового листа, позволила провести количественный анализ транскрипционных фабрик в клетках млекопитающих [90]. Обнаружено, что более 70% сайтов транскрипции содержат только одну молекулу РНК-полимеразы II, что противоречит существующим моделям. Изучена динамика транскрипционных фабрик [31, 91]: эти фабрики не являются статичными структурами, они могут формироваться в ядре при стимуляции клетки. Формирование фабрик не блокируется ингибиторами элонгации РНК-полимеразы II, т.е. они формируются на стадии инициации транскрипции.

Концепция транскрипции на иммобилизованной транскрипционной фабрике получила подтверждение с помощью МСВР. Индукция клеток человека цитокином приводит к сближению в ядре двух генов, удаленно расположенных в геноме, причем их транскрипты также локализуются вблизи друг друга [92]. В этой же модели проведена визуализация процесса индуцированной транскрипции на матрице длинного гена (221 т.п.н.) [93]. Транскрипционная фабрика первоначально связывает промотор гена, после чего начинается протягивание матрицы ДНК через эту транскрипционную фабрику. Промотор при этом некоторое время остается рядом с РНК-полимеразой, однако затем он может терять связь и реинициация может произойти на другой фабрике.

Визуализация транскрипции на хромосомах типа ламповых щеток позволила увидеть процесс упа-

ковки новосинтезированной РНК с помощью метода dSTORM. Сплайсинг и плотная упаковка мРНК приводят к тому, что толщина транскрибируемой петли хроматина в целом остается практически неизменной вдоль активного гена [94].

У растений изучение распределения различных форм РНК-полимеразы II с помощью SIM и PALM показало существование сетей этих молекул в эухроматине, причем разные формы формируют различные сетки [95, 96]. Обнаружено увеличение количества молекул полимеразы в ядре полиплоидных клеток, в целом пропорциональное общему количеству генов. Возможно, что у растений существует другой способ организации транскрипции, отличный от транскрипционных фабрик млекопитающих.

Локализацию факторов транскрипции в ядре изучают, в основном, с помощью SMLM. Показано, что сайты связывания фактора транскрипции Sox2 у мышей кластеризуются в ядре, что играет важную роль в регуляции транскрипции его генов-мишеней [97]. Схожим образом фактор STAT1 человека формирует кластеры, причем размер и количество этих кластеров существенно возрастают при переходе от G1- к G2-фазе клеточного цикла, а также при стимуляции клетки цитокином [98]. Фактор транскрипции FoxP3 в T-клетках формирует два типа комплексов с другими факторами – активационный, располагающийся ближе к центру ядра, и репрессивный, локализующийся на периферии ядра [99]. МСВР применяли для изучения распределения гистона H2A и субъединицы хроматинремоделирующего фактора Snf2H [100], белка эухроматина MAD2L2 [101].

4Pi-микроскопию применили к изучению внутреннего строения телец PML в клетках человека. Транскрипционные факторы Sp100 и PML формируют оболочку телец толщиной 50–100 нм, проницаемую для белков. Внутренняя область телец содержит полимеризованные остатки белка SUMO, что служит основой концентрации SUMO-связывающих факторов в тельцах [102].

Изучение ядрышка в клетках человека с помощью SMLM показало, что, как и ядро в целом, оно имеет очень неоднородную структуру: содержит области с высокой и низкой концентрацией новосинтезированной РНК [103].

### РЕПЛИКАЦИЯ

Методом STED-микроскопии с использованием меченых белков PCNA и RPA изучена структура репликационных фабрик в клетках человека [104]. Показано, что диаметр репликационных фабрик составляет в среднем 160 нм. В ранней S-фазе детектируется до 1400 фабрик с двумя-тремя вилка-

ми репликации каждая. Размер фабрик в клетках мыши, оцененный с применением SIM и SMI, составил 125 нм [105]. В клетках млекопитающих в S-фазе с помощью SIM выявлено около 5000 репликационных фабрик, каждая из которых представляла отдельный сайт репликации [106].

Изучение процесса репликации в клетках дрожжей с применением SIM показало, что кластеризация репликонов в отдельных репликационных фабриках является стохастическим процессом и сильно варьирует от клетки к клетке, однако, однажды объединившись в одной фабрике, репликоны остаются стабильно связанными [107]. С помощью SIM показано, что в клетках млекопитающих репликация периферического гетерохроматина, тесно связанного с ламинной, происходит без разборки последней [108].

МСВР позволила увидеть новую функцию фактора репликации Cdt1 в формировании протяженной конформации кинетохорного комплекса Ndc80 и его стабильной связи с микротрубочками в митозе клеток человека [109]. Получены данные о расположении компонентов кинетохора хромосом дрозофилы и роли белка Spc105 в сборке этой структуры [110]. Также изучено строение кинетохора в клетках дрожжей [111] и человека [112]. Визуализация митоза позволила проследить динамику переключения направления движения сестринских кинетохоров при прохождении метафазы [113].

Координация репликации и транскрипции изучена в клетках млекопитающих [114]. Показано, что в ядрышках, где активно транскрибируются гены рРНК, между этими процессами наблюдается сильная отрицательная корреляция. В то же время в нуклеоплазме эта корреляция не выявлена.

### РЕПАРАЦИЯ И РЕКОМБИНАЦИЯ

Процесс репарации также изучен с помощью МСВР [115]. Паттерн локализации гистона gamma-H2AX (маркера двухцепочечных разрывов ДНК) и динамика сайтов его локализации изучены в ряде работ разными методами [116–118]. Также изучено взаимное расположение gamma-H2AX и репарационного комплекса Ku, подсчитано количество молекул этого комплекса на сайте репарации [119]. dSTORM был использован для выяснения молекулярных основ процесса негомологичного соединения концов в клетках человека: установлено, что концы ДНК сначала взаимодействуют друг с другом посредством белковых филаментов, затем выравниваются друг относительно друга и происходит лигирование [120].

С помощью 3D-SIM показано, что в клетках HeLa паттерн белков BRCA1 и 53BP1 внутри фокусов репарации является взаимоисключающим. Возможно, их взаимное расположение определяет выбор пути

репарации [121]. STED-микроскопию использовали для визуализации факторов репарации gamma-H2AX, 53BP1 и Rad51 в клетках HeLa после воздействия ионизирующего излучения. Первые два белка формируют области, размеры которых зависят от энергии излучения (540 нм для сильного и 412 нм для более слабого излучения), причем эти области имеют внутреннюю структуру и наблюдается отрицательная корреляция в распределении этих двух белков. Rad51 формирует области, лишенные внутренней структуры, размер которых (135 нм) не зависит от энергии излучения [122]. С помощью dSTORM установлено, что в клетках человека партнеры BRCA2 и Rad51 локализуются в разных сайтах репарируемой ДНК, что говорит об различной динамике их взаимодействия с ДНК [123]. С использованием STED и 3D-SIM на клетках человека показано, что маркер разрыва gamma-H2AX распределяется по близлежащим петлям хроматина, этот процесс контролируется белком CTCF. Таким образом, фокус репарации представляет собой тесную группу «нанофокусов», каждый из которых является петлей хроматина [124].

С использованием различных методов МСВР в клетках ячменя и пшеницы [125, 126], мыши [127], *Caenorhabditis elegans* [128], а также дрожжей [129] был визуализирован и изучен синаптонемный комплекс, формирующийся при мейозе между гомологичными хромосомами.

### ЯДЕРНАЯ ОБОЛОЧКА

Ядерная мембрана содержит множество трансмембранных белков. Для их локализации разработаны методы МСВР, имеющие аксиальное разрешение менее 10 нм [130, 131].

Структура важнейшего из компонентов периферии ядра – ядерной поры – изучена с помощью различных методов МСВР с высокой точностью. У разных организмов определены размеры поры [132], положение основных субъединиц [133, 134], визуализирован процесс ее сборки [135]. Суммирование изображений нескольких тысяч индивидуальных ядерных пор позволило провести структурный анализ поры с точностью менее 1 нм [136]. Определены локализация и распределение по оболочке отдельных субъединиц ядерной поры [137–141]. С помощью МСВР изучен контакт нуклеопоринов с транспортными рецепторами [142], показан контакт ядерной поры с активным локусом [143].

Высокоскоростная SPEED-микроскопия с разрешением 8 нм в пространстве и 2 мс во времени позволила проследить процесс транспорта через ядерную пору в клетках человека [144]. Показано, что только 36% молекул мРНК, входящих в пору, успешно

экспортируются в цитоплазму, причем время непосредственного транспорта занимает около 12 мс. Изучена также кинетика транспорта мРНК через ядерные поры в клетках мыши с разрешением 26 нм в пространстве и 20 мс по времени [145]. Показано, что процесс экспорта – это трехстадийный процесс, включающий в посадку на пору (80 мс), перенос (5–20 мс) и освобождение (80 мс) транскрипта.

Изучение периферии ядра показало, что в ламине существуют инвагинации, неразличимые с помощью конфокальной микроскопии [146]. Инвагинации описаны в интерфазном ядре в различных типах клеток, однако их функции остаются неясными. Возможно, они играют роль в транспорте мРНК [147].

SIM-микроскопия позволила изучить связь ядерной ламины с актиновым цитоскелетом в клетках человека. Оказалось, что механическое давление актиновой нити вызывает формирование впячивания на ламине и появление доменов конденсированного хроматина [148].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Актуальность световой микроскопии всегда оставалась высокой для изучения внутриядерных процессов. Интенсивно развивающаяся группа методов МСВР открывает новые перспективы в этой области [149]. Важно отметить, что теоретически МСВР мо-

жет достигнуть разрешения вплоть до 1 нм, поэтому она является уникальным инструментом, позволяющим изучать процессы в масштабе от отдельной молекулы до целой клетки. Помимо решения фундаментальных задач, МСВР находит свое применение в изучении процессов, происходящих в ядрах клеток при различных патологиях. МСВР была использована при изучении детской геродермии [150], болезни Альцгеймера [151], гипоксии и голодания кардиомиоцитов, онкогенеза [21, 152], вирусных инфекций [150, 151]. Разрабатываются методы диагностики заболеваний, в частности онкологических, с применением МСВР [153].

Приведенные в обзоре данные показывают, что МСВР уже позволила существенно расширить наши знания о функционировании ядра на разных уровнях его организации. В то же время можно видеть, насколько мало использован ресурс этого мощного метода к настоящему моменту. Несомненно, сочетание МСВР с другими современными методами станет в ближайшем будущем основой новых открытий в области биологии клеточного ядра. ●

*Работа выполнена при поддержке гранта  
Министерства образования и науки РФ  
14.613.21.0036 (уникальный идентификатор  
RFMEFI61315X0036).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Vivante A., Brozgol E., Bronshtein I., Garini Y. // *Methods*. 2017. V. 123. P. 128–137.
- Flyamer I.M., Gassler J., Imakaev M., Brandao H.B., Ulianov S.V., Abdennur N., Razin S.V., Mirny L.A., Tachibana-Konwalski K. // *Nature*. 2017. V. 544. № 7648. P. 110–114.
- Sati S., Cavalli G. // *Chromosoma*. 2017. V. 126. № 1. P. 33–44.
- Candès E.J., Fernandez-Granda C. // *Commun. Pure Appl. Mathematics*. 2014. V. 67. № 6. P. 906–956.
- Hell S.W. // *Science*. 2007. V. 316. № 5828. P. 1153–1158.
- Nienhaus K., Nienhaus G.U. // *J. Mol. Biol.* 2016. V. 428. № 2 Pt A. P. 308–322.
- Turkowsky B., Virant D., Endesfelder U. // *Analyt. Bioanal. Chem.* 2016. V. 408. № 25. P. 6885–6911.
- Han R., Li Z., Fan Y., Jiang Y. // *J. Genet. Genom. = Yi chuan xue bao*. 2013. V. 40. № 12. P. 583–595.
- Yildiz A., Forkey J.N., McKinney S.A., Ha T., Goldman Y.E., Selvin P.R. // *Science*. 2003. V. 300. № 5628. P. 2061–2065.
- Cremer C., Szczurek A., Schock F., Gourram A., Birk U. // *Methods*. 2017. V. 123. P. 11–32.
- Klementieva N.V., Zagaynova E.V., Lukyanov K.A., Mishin A.S. // *Sovrem. Tehnol. Med.* 2016. V. 8. № 2. P. 130–138.
- Huang F., Sirinakis G., Allgeyer E.S., Schroeder L.K., Duim W.C., Kromann E.B., Phan T., Rivera-Molina F.E., Myers J.R., Irnov I., et al. // *Cell*. 2016. V. 166. № 4. P. 1028–1040.
- Watanabe S., Punge A., Hoppel G., Willig K.I., Hobson R.J., Davis M.W., Hell S.W., Jorgensen E.M. // *Nat. Methods*. 2011. V. 8. № 1. P. 80–84.
- Benke A., Olivier N., Gunzenhauser J., Manley S. // *Nano Lett.* 2012. V. 12. № 5. P. 2619–2624.
- Flors C. // *Biopolymers*. 2011. V. 95. № 5. P. 290–297.
- Flors C. // *J. Microsc.* 2013. V. 251. № 1. P. 1–4.
- Klein T., Loschberger A., Proppert S., Wolter S., van de Linde S., Sauer M. // *Nat. Methods*. 2011. V. 8. № 1. P. 7–9.
- Wombacher R., Heidebreder M., van de Linde S., Sheetz M.P., Heilemann M., Cornish V.W., Sauer M. // *Nat. Methods*. 2010. V. 7. № 9. P. 717–719.
- Szczurek A.T., Prakash K., Lee H.K., Zurek-Biesiada D.J., Best G., Hagmann M., Dobrucki J.W., Cremer C., Birk U. // *Nucleus*. 2014. V. 5. № 4. P. 331–340.
- Sreedharan S., Gill M.R., Garcia E., Saeed H.K., Robinson D., Byrne A., Cadby A., Keyes T.E., Smythe C., Pellett P., et al. // *J. Am. Chem. Soc.* 2017. V. 139. № 44. P. 15907–15913.
- Szczurek A., Klewes L., Xing J., Gourram A., Birk U., Knecht H., Dobrucki J.W., Mai S., Cremer C. // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45. № 8. P. e56.
- Vranken C., Deen J., Dirix L., Stakenborg T., Dehaen W., Leen V., Hofkens J., Neely R.K. // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. № 7. P. e50.
- Zessin P.J., Finan K., Heilemann M. // *J. Struct. Biol.* 2012. V. 177. № 2. P. 344–348.
- Dong B., Almassalha L.M., Stypula-Cyrus Y., Urban B.E., Chandler J.E., Nguyen T.Q., Sun C., Zhang H.F., Backman V. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016. V. 113. № 35. P. 9716–9721.
- Markaki Y., Smeets D., Fiedler S., Schmid V.J., Schermelleh L., Cremer T., Cremer M. // *Bioessays*. 2012. V. 34. № 5. P. 412–426.
- Jungmann R., Avendano M.S., Woehrstein J.B., Dai M., Shih W.M., Yin P. // *Nat. Methods*. 2014. V. 11. № 3. P. 313–318.
- Schueder F., Strauss M.T., Hoerl D., Schnitzbauer J., Schlichthaerle T., Strauss S., Yin P., Harz H., Leonhardt H.,

- Jungmann R. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2017. V. 56. № 14. P. 4052–4055.
28. Wang Y., Woehrstein J.B., Donoghue N., Dai M., Avendano M.S., Schackmann R.C.J., Zoeller J.J., Wang S.S.H., Tillberg P.W., Park D., et al. // *Nano Lett.* 2017. V. 17. № 10. P. 6131–6139.
29. Anton T., Bultmann S., Leonhardt H., Markaki Y. // *Nucleus.* 2014. V. 5. № 2. P. 163–172.
30. Baday M., Cravens A., Hastie A., Kim H., Kudaki D.E., Kwok P.Y., Xiao M., Selvin P.R. // *Nano Lett.* 2012. V. 12. № 7. P. 3861–3866.
31. Kamiyama D., Huang B. // *Developmental Cell.* 2012. V. 23. № 6. P. 1103–1110.
32. Benke A., Manley S. // *Chembiochem.* 2012. V. 13. № 2. P. 298–301.
33. Dai M., Jungmann R., Yin P. // *Nat. Nanotechnol.* 2016. V. 11. № 9. P. 798–807.
34. Jeffert J., Kobo A., Su T., Grunwald A., Green O., Nilsson A.N., Eisenberg E., Ambjornsson T., Westerlund F., Weinhold E., et al. // *ACS Nano.* 2016. V. 10. № 11. P. 9823–9830.
35. Weiland Y., Lemmer P., Cremer C. // *Chromosome Res.* 2011. V. 19. № 1. P. 5–23.
36. Stuhlmuller M., Schwarz-Finsterle J., Fey E., Lux J., Bach M., Cremer C., Hinderhofer K., Hausmann M., Hildenbrand G. // *Nanoscale.* 2015. V. 7. № 42. P. 17938–17946.
37. Beliveau B.J., Boettiger A.N., Avendano M.S., Jungmann R., McCole R.B., Joyce E.F., Kim-Kiselak C., Bantignies F., Fonseka C.Y., Erceg J., et al. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 7147.
38. Ni Y., Cao B., Ma T., Niu G., Huo Y., Huang J., Chen D., Liu Y., Yu B., Zhang M.Q., et al. // *Elife.* 2017. V. 6. P. e21660.
39. Hildenbrand G., Rapp A., Spori U., Wagner C., Cremer C., Hausmann M. // *Biophys. J.* 2005. V. 88. № 6. P. 4312–4318.
40. Esa A., Edelmann P., Kreth G., Trakhtenbrot L., Amariglio N., Rechavi G., Hausmann M., Cremer C. // *J. Microsc.* 2000. V. 199. № 2. P. 96–105.
41. Rauch J., Knoch T.A., Solovei I., Teller K., Stein S., Buiting K., Horsthemke B., Langowski J., Cremer T., Hausmann M., et al. // *Differentiation; Res. Biolog. Diversity.* 2008. V. 76. № 1. P. 66–82.
42. Hewitson T.D., Holt S.G., Tan S.J., Wigg B., Samuel C.S., Smith E.R. // *Front. Pharmacol.* 2017. V. 8. P. 307.
43. Tajbakhsh J., Stefanovski D., Tang G., Wawrowsky K., Liu N., Fair J.H. // *Exp. Cell. Res.* 2015. V. 332. № 2. P. 190–201.
44. Karathanasis C., Fricke F., Hummer G., Heilemann M. // *Chemphyschem.: Eur. J. Chem. Phys. Phys. Chem.* 2017. V. 18. № 8. P. 942–948.
45. Wollman A.J., Leake M.C. // *Faraday Discuss.* 2015. V. 184. P. 401–424.
46. Zancchi F.C., Manzo C., Alvarez A.S., Derr N.D., Garcia-Parajo M.F., Lakadamyali M. // *Nat. Methods.* 2017. V. 14. № 8. P. 789–792.
47. Agasti S.S., Wang Y., Schueder F., Sukumar A., Jungmann R., Yin P. // *Chem. Sci.* 2017. V. 8. № 4. P. 3080–3091.
48. Georgieva M., Cattoni D.I., Fiche J.B., Mutin T., Chamoussat D., Nollmann M. // *Methods.* 2016. V. 105. P. 44–55.
49. Ricci M.A., Cosma M.P., Lakadamyali M. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2017. V. 46. P. 186–193.
50. Hubner B., Lomiento M., Mammoli F., Illner D., Markaki Y., Ferrari S., Cremer M., Cremer T. // *Epigenet. Chromatin.* 2015. V. 8. P. 47.
51. Patel N.S., Rhinn M., Semprich C.I., Halley P.A., Dolle P., Bickmore W.A., Storey K.G. // *PLoS Genet.* 2013. V. 9. № 7. P. e1003614.
52. Popken J., Graf A., Krebs S., Blum H., Schmid V.J., Strauss A., Guengoer T., Zakhartchenko V., Wolf E., Cremer T. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 5. P. e0124619.
53. Popken J., Koehler D., Brero A., Wuensch A., Guengoer T., Thormeyer T., Wolf E., Cremer T., Zakhartchenko V. // *Nucleus.* 2014. V. 5. № 6. P. 542–554.
54. Wang R., Kamgoue A., Normand C., Leger-Silvestre I., Mangeat T., Gadal O. // *J. Cell. Sci.* 2016. V. 129. № 24. P. 4480–4495.
55. Markaki Y., Gunkel M., Schermelleh L., Beichmanis S., Neumann J., Heidemann M., Leonhardt H., Eick D., Cremer C., Cremer T. // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 2010. V. 75. P. 475–492.
56. Cremer T., Cremer M., Hubner B., Strickfaden H., Smeets D., Popken J., Sterr M., Markaki Y., Rippe K., Cremer C. // *FEBS Lett.* 2015. V. 589. № 20 Pt A. P. 2931–2943.
57. Cremer M., Schmid V.J., Kraus F., Markaki Y., Hellmann I., Maiser A., Leonhardt H., John S., Stamatoyannopoulos J., Cremer T. // *Epigenetics Chromatin.* 2017. V. 10. № 1. P. 39.
58. Fiserova J., Efenberkova M., Sieger T., Maninova M., Uhlirva J., Hozak P. // *J. Cell. Sci.* 2017. V. 130. № 12. P. 2066–2077.
59. Bohn M., Diesinger P., Kaufmann R., Weiland Y., Muller P., Gunkel M., von Ketteler A., Lemmer P., Hausmann M., Heermann D.W., et al. // *Biophys. J.* 2010. V. 99. № 5. P. 1358–1367.
60. Recamier V., Izeddin I., Bosanac L., Dahan M., Proux F., Darzacq X. // *Nucleus.* 2014. V. 5. № 1. P. 75–84.
61. Nozaki T., Imai R., Tanbo M., Nagashima R., Tamura S., Tani T., Joti Y., Tomita M., Hibino K., Kanemaki M.T., et al. // *Mol. Cell.* 2017. V. 67. № 2. P. 282–293.
62. Matsuda A., Shao L., Boulanger J., Kervrann C., Carlton P.M., Kner P., Agard D., Sedat J.W. // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 9. P. e12768.
63. Mitchell-Jordan S., Chen H., Franklin S., Stefani E., Bentolila L.A., Vondriska T.M. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2012. V. 53. № 4. P. 552–558.
64. Ricci M.A., Manzo C., Garcia-Parajo M.F., Lakadamyali M., Cosma M.P. // *Cell.* 2015. V. 160. № 6. P. 1145–1158.
65. Boettiger A.N., Bintu B., Moffitt J.R., Wang S., Beliveau B.J., Fudenberg G., Imakaev M., Mirny L.A., Wu C.T., Zhuang X. // *Nature.* 2016. V. 529. № 7586. P. 418–422.
66. Swanson E.C., Rapkin L.M., Bazett-Jones D.P., Lawrence J.B. // *Nucleus.* 2015. V. 6. № 4. P. 254–260.
67. Hu Y.S., Zhu Q., Elkins K., Tse K., Li Y., Fitzpatrick J.A., Verma I.M., Cang H. // *Opt. Nanoscopy.* 2013. V. 2. № 1. P. e7.
68. Matsuda A., Chikashige Y., Ding D.Q., Ohtsuki C., Mori C., Asakawa H., Kimura H., Haraguchi T., Hiraoka Y. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 7753.
69. Kundu S., Ji F., Sunwoo H., Jain G., Lee J.T., Sadreyev R.I., Dekker J., Kingston R.E. // *Mol. Cell.* 2017. V. 65. № 3. P. 432–446.
70. Wani A.H., Boettiger A.N., Schorderet P., Ergun A., Munger C., Sadreyev R.I., Zhuang X., Kingston R.E., Francis N.J. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 10291.
71. Smeets D., Markaki Y., Schmid V.J., Kraus F., Tattermusch A., Cerase A., Sterr M., Fiedler S., Demmerle J., Popken J., et al. // *Epigenetics Chromatin.* 2014. V. 7. P. 8.
72. Moindrot B., Cerase A., Coker H., Masui O., Grijzenhout A., Pintacuda G., Schermelleh L., Nesterova T.B., Brockdorff N. // *Cell. Rep.* 2015. V. 12. № 4. P. 562–572.
73. Sunwoo H., Wu J.Y., Lee J.T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. № 31. P. E4216–4225.
74. Strukov Y.G., Sural T.H., Kuroda M.I., Sedat J.W. // *PLoS Biol.* 2011. V. 9. № 1. P. e1000574.
75. Khan W.A., Rogan P.K., Knoll J.H. // *Mol. Cytogenet.* 2015. V. 8. P. 65.
76. Prakash K., Fournier D., Redl S., Best G., Borsos M., Tiwari V.K., Tachibana-Konwalski K., Ketting R.F., Parekh S.H.,



- Cremer C., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. № 47. P. 14635–14640.
77. Green L.C., Kalitsis P., Chang T.M., Cipetic M., Kim J.H., Marshall O., Turnbull L., Whitchurch C.B., Vagnarelli P., Samejima K., et al. // *J. Cell. Sci.* 2012. V. 125. № 6. P. 1591–1604.
78. Carlton P.M. // *Biophys. Rev.* 2013. V. 5. № 4. P. 313–322.
79. Ding D.Q., Haraguchi T., Hiraoka Y. // *Curr. Genet.* 2016. V. 62. № 3. P. 499–502.
80. Ding D.Q., Matsuda A., Okamasa K., Nagahama Y., Haraguchi T., Hiraoka Y. // *Chromosoma*. 2016. V. 125. № 2. P. 205–214.
81. Doksanı Y., Wu J.Y., de Lange T., Zhuang X. // *Cell*. 2013. V. 155. № 2. P. 345–356.
82. Ribeiro S.A., Vagnarelli P., Dong Y., Hori T., McEwen B.F., Fukagawa T., Flors C., Earnshaw W.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 23. P. 10484–10489.
83. Lando D., Endesfelder U., Berger H., Subramanian L., Dunne P.D., McColl J., Klenerman D., Carr A.M., Sauer M., Allshire R.C., et al. // *Open Biol.* 2012. V. 2. № 7. P. 120078.
84. Demidov D., Schubert V., Kumke K., Weiss O., Karimi-Ashtiyani R., Buttler J., Heckmann S., Wanner G., Dong Q., Han F., et al. // *Cytogenet. Genome Res.* 2014. V. 143. № 1–3. P. 150–156.
85. Ishii T., Karimi-Ashtiyani R., Banaei-Moghaddam A.M., Schubert V., Fuchs J., Houben A. // *Chromosome Res.* 2015. V. 23. № 2. P. 277–284.
86. Fabre P.J., Benke A., Joye E., Nguyen Huynh T.H., Manley S., Duboule D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. № 45. P. 13964–13969.
87. van de Corput M.P., de Boer E., Knoch T.A., van Cappellen W.A., Quintanilla A., Ferrand L., Grosveld F.G. // *J. Cell. Sci.* 2012. V. 125. № 19. P. 4630–4639.
88. Wang Y., Maharana S., Wang M.D., Shivashankar G.V. // *Sci. Rep.* 2014. V. 4. P. 4477.
89. Wang Y., Ratna P., Shivashankar G.V. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 42422.
90. Zhao Z.W., Roy R., Gebhardt J.C., Suter D.M., Chapman A.R., Xie X.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. № 2. P. 681–686.
91. Chen X., Wei M., Zheng M.M., Zhao J., Hao H., Chang L., Xi P., Sun Y. // *ACS Nano*. 2016. V. 10. № 2. P. 2447–2454.
92. Papantonis A., Larkin J.D., Wada Y., Ohta Y., Ihara S., Kodama T., Cook P.R. // *PLoS Biol.* 2010. V. 8. № 7. P. e1000419.
93. Larkin J.D., Papantonis A., Cook P.R., Marenduzzo D. // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. № 4. P. 2216–2227.
94. Kaufmann R., Cremer C., Gall J.G. // *Chromosome Res.* 2012. V. 20. № 8. P. 1009–1015.
95. Schubert V. // *Cytogenet. Genome Res.* 2014. V. 143. № 1–3. P. 69–77.
96. Schubert V., Weisshart K. // *J. Exp. Botany*. 2015. V. 66. № 6. P. 1687–1698.
97. Liu Z., Legant W.R., Chen B.C., Li L., Grimm J.B., Lavis L.D., Betzig E., Tjian R. // *Elife*. 2014. V. 3. P. e04236.
98. Gao J., Wang F., Liu Y., Cai M., Xu H., Jiang J., Wang H. // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 9045.
99. Kwon H.K., Chen H.M., Mathis D., Benoist C. // *Nat. Immunol.* 2017. V. 18. № 11. P. 1238–1248.
100. Gunkel M., Erdel F., Rippe K., Lemmer P., Kaufmann R., Hormann C., Amberger R., Cremer C. // *Biotechnol. J.* 2009. V. 4. № 6. P. 927–938.
101. Rahjouei A., Pirouz M., Di Virgilio M., Kamin D., Kessel M. // *Stem Cell Repts.* 2017. V. 8. № 4. P. 813–821.
102. Lang M., Jegou T., Chung I., Richter K., Munch S., Udvarhelyi A., Cremer C., Hemmerich P., Engelhardt J., Hell S.W., et al. // *J. Cell. Sci.* 2010. V. 123. № 3. P. 392–400.
103. Szczurek A., Xing J., Birk U.J., Cremer C. // *Front. Genet.* 2016. V. 7. P. 114.
104. Cseresnyes Z., Schwarz U., Green C.M. // *BMC Cell. Biol.* 2009. V. 10. P. 88.
105. Baddeley D., Chagin V.O., Schermelleh L., Martin S., Pombo A., Carlton P.M., Gahl A., Domaing P., Birk U., Leonhardt H., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2010. V. 38. № 2. P. e8.
106. Chagin V.O., Casas-Delucchi C.S., Reinhart M., Schermelleh L., Markaki Y., Maiser A., Bolius J.J., Bensimon A., Fillies M., Domaing P., et al. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 11231.
107. Saner N., Karschau J., Natsume T., Gierlinski M., Retkute R., Hawkins M., Nieduszynski C.A., Blow J.J., de Moura A.P., Tanaka T.U. // *J. Cell. Biol.* 2013. V. 202. № 7. P. 1001–1012.
108. Zhironkina O.A., Kurchashova S.Y., Bratseva A.L., Cherepanynets V.D., Strelkova O.S., Belmont A.S., Kireev, II. // *Tsitologiya*. 2014. V. 56. № 12. P. 899–906.
109. Varma D., Chandrasekaran S., Sundin L.J., Reidy K.T., Wan X., Chasse D.A., Nevis K.R., DeLuca J.G., Salmon E.D., Cook J.G. // *Nat. Cell. Biol.* 2012. V. 14. № 6. P. 593–603.
110. Venkei Z., Przewloka M.R., Ladak Y., Albadri S., Sossick A., Juhasz G., Novak B., Glover D.M. // *Open Biol.* 2012. V. 2. № 2. P. 110032.
111. Joglekar A.P., Bloom K., Salmon E.D. // *Curr. Biol.* 2009. V. 19. № 8. P. 694–699.
112. Wan X., O'Quinn R.P., Pierce H.L., Joglekar A.P., Gall W.E., DeLuca J.G., Carroll C.W., Liu S.T., Yen T.-J., McEwen B.F., et al. // *Cell*. 2009. V. 137. № 4. P. 672–684.
113. Burroughs N.J., Harry E.F., McAinsh A.D. // *Elife*. 2015. V. 4. P. e09500.
114. Smirnov E., Borkovec J., Kovacic L., Svidenska S., Schrofel A., Skalnikova M., Svindrych Z., Krizek P., Ovesny M., Hagen G.M., et al. // *J. Struct. Biol.* 2014. V. 188. № 3. P. 259–266.
115. Uphoff S., Kapanidis A.N. // *DNA Repair (Amst.)*. 2014. V. 20. P. 32–40.
116. Bach M., Savini C., Krufczik M., Cremer C., Rosl F., Hausmann M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. № 8. P. 1726.
117. Bewersdorf J., Bennett B.T., Knight K.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. № 48. P. 18137–18142.
118. D'Abrantes S., Gratton S., Reynolds P., Kriechbaumer V., McKenna J., Barnard S., Clarke D., Botchway S.W. // *Radiat. Res.* 2017. doi: 10.1667/RR14594.1.
119. Britton S., Coates J., Jackson S.P. // *J. Cell. Biol.* 2013. V. 202. № 3. P. 579–595.
120. Reid D.A., Keegan S., Leo-Macias A., Watanabe G., Strande N.T., Chang H.H., Oksuz B.A., Fenyo D., Lieber M.R., Ramsden D.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. № 20. P. E2575–2584.
121. Chapman J.R., Sossick A.J., Boulton S.J., Jackson S.P. // *J. Cell. Sci.* 2012. V. 125. № 15. P. 3529–3534.
122. Reindl J., Girst S., Walsh D.W., Greubel C., Schwarz B., Siebenwirth C., Drexler G.A., Friedl A.A., Dollinger G. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 40616.
123. Sanchez H., Paul M.W., Grosbart M., van Rossum-Fikkert S.E., Lebbink J.H.G., Kanaar R., Houtsmuller A.B., Wyman C. // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45. № 8. P. 4507–4518.
124. Natale F., Rapp A., Yu W., Maiser A., Harz H., Scholl A., Grulich S., Anton T., Horl D., Chen W., et al. // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 15760.
125. Colas I., Darrier B., Arrieta M., Mittmann S.U., Ramsay L., Sourdille P., Waugh R. // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8. P. 1235.
126. Phillips D., Nibau C., Wnetrzak J., Jenkins G. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 6. P. e39539.
127. Qiao H., Chen J.K., Reynolds A., Hoog C., Paddy M., Hunter N. // *PLoS Genet.* 2012. V. 8. № 6. P. e1002790.

128. Sato-Carlton A., Li X., Crawley O., Testori S., Martinez-Perez E., Sugimoto A., Carlton P.M. // *PLoS Genet.* 2014. V. 10. № 10. P. e1004638.
129. Lao J.P., Cloud V., Huang C.C., Grubb J., Thacker D., Lee C.Y., Dresser M.E., Hunter N., Bishop D.K. // *PLoS Genet.* 2013. V. 9. № 12. P. e1003978.
130. Chizhik A.M., Ruhlandt D., Pfaff J., Karedla N., Chizhik A.I., Gregor I., Kehlenbach R.H., Enderlein J. // *ACS Nano.* 2017. doi: 10.1021/acsnano.7b04671.
131. Mudumbi K.C., Schirmer E.C., Yang W. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 12562.
132. Huve J., Wesselmann R., Kahms M., Peters R. // *Biophys. J.* 2008. V. 95. № 2. P. 877–885.
133. Loschberger A., Franke C., Krohne G., van de Linde S., Sauer M. // *J. Cell. Sci.* 2014. V. 127. № 20. P. 4351–4355.
134. Loschberger A., van de Linde S., Dabauvalle M.C., Rieger B., Heilemann M., Krohne G., Sauer M. // *J. Cell. Sci.* 2012. V. 125. № 3. P. 570–575.
135. Otsuka S., Szyborska A., Ellenberg J. // *Meth. Cell. Biol.* 2014. V. 122. P. 219–238.
136. Szyborska A., de Marco A., Daigle N., Cordes V.C., Briggs J.A., Ellenberg J. // *Science.* 2013. V. 341. № 6146. P. 655–658.
137. Chatel G., Desai S.H., Mattheyses A.L., Powers M.A., Fahrenkrog B. // *J. Struct. Biol.* 2012. V. 177. № 1. P. 81–89.
138. Dahan-Pasternak N., Nasereddin A., Kolevzon N., Pe'er M., Wong W., Shinder V., Turnbull L., Whitchurch C.B., Elbaum M., Gilberger T.W., et al. // *J. Cell. Sci.* 2013. V. 126. № 14. P. 3055–3069.
139. Gottfert F., Wurm C.A., Mueller V., Berning S., Cordes V.C., Honigsmann A., Hell S.W. // *Biophys. J.* 2013. V. 105. № 1. P. L01–03.
140. Kinoshita Y., Kalir T., Dottino P., Kohtz D.S. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 4. P. e36137.
141. Ma J., Kelich J.M., Junod S.L., Yang W. // *J. Cell. Sci.* 2017. V. 130. № 7. P. 1299–1306.
142. Ma J., Goryaynov A., Yang W. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2016. V. 23. № 3. P. 239–247.
143. Rohner S., Kalck V., Wang X., Ikegami K., Lieb J.D., Gasser S.M., Meister P. // *J. Cell. Biol.* 2013. V. 200. № 5. P. 589–604.
144. Ma J., Liu Z., Michelotti N., Pitchiaya S., Veerapaneni R., Androsavich J.R., Walter N.G., Yang W. // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. P. 2414.
145. Grunwald D., Singer R.H. // *Nature.* 2010. V. 467. № 7315. P. 604–607.
146. Schermelleh L., Carlton P.M., Haase S., Shao L., Winoto L., Kner P., Burke B., Cardoso M.C., Agard D.A., Gustafsson M.G., et al. // *Science.* 2008. V. 320. № 5881. P. 1332–1336.
147. Schoen I., Aires L., Ries J., Vogel V. // *Nucleus.* 2017. P. 506–514.
148. Versaevel M., Braquenier J.B., Riaz M., Grevesse T., Lantoine J., Gabriele S. // *Sci. Rep.* 2014. V. 4. P. 7362.
149. Cremer C., Birk U. // *Front. Physics.* 2016. V. 4. P. 11.
150. Chojnowski A., Ong P.F., Wong E.S., Lim J.S., Mutalif R.A., Navasankari R., Dutta B., Yang H., Liow Y.Y., Sze S.K., et al. // *Elife.* 2015. V. 4. P. e07759.
151. Garcia A., Huang D., Righolt A., Righolt C., Kalaw M.C., Mathur S., McAvoy E., Anderson J., Luedke A., Itorralba J., et al. // *J. Cell. Physiol.* 2016. V. 232. № 9. P. 2387–2395.
152. Kirmes I., Szczurek A., Prakash K., Charapitsa I., Heiser C., Musheev M., Schock F., Fornalczyk K., Ma D., Birk U., et al. // *Genome Biol.* 2015. V. 16. P. 246.
153. Hausmann M., Ilic N., Pilarczyk G., Lee J.H., Logeswaran A., Borroni A.P., Krufczik M., Theda F., Waltrich N., Bestvater F., et al. // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. № 10. P. 2066.