

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.21

Влияние линкерной ДНК на структуру нуклеосом по данным флуоресцентной микроскопии одиночных частиц**Т.В. Андреева¹, А.В. Любителев¹, Н.В. Малюченко¹, В.М. Студитский^{1,2},
М.П. Кирпичников^{1,3} , А.В. Феофанов^{1,3,*} **¹*Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*²*Fox Chase Cancer Center, Cottman Avenue 333, Philadelphia, 19111 Pennsylvania, USA;*³*Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Российская академия наук, Россия, 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10***e-mail: avfeofanov@yandex.ru*

Мононуклеосомы, собранные на ДНК-матрицах различной длины, содержащих нуклеосом-позиционирующую последовательность, широко применяются в молекулярно-биологических исследованиях, но их структурные особенности требуют детального изучения. Методом флуоресцентной микроскопии одиночных частиц на основе Ферстеровского резонансного переноса энергии проведено сравнительное исследование структуры нуклеосом с двумя линкерными участками ДНК длиной по 20 п.н. (2LN) и кор-нуклеосом без линкеров (CN) в растворах, содержащих 150 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂ (или без MgCl₂), а также в растворах с повышенной ионной силой (0,5 и 0,7 М KCl). Обнаружено, что эти нуклеосомы присутствуют в виде двух доминирующих субпопуляций, отличающихся по укладке ДНК на октамере гистонов. Установлено, что CN и 2LN различаются по соотношению этих субпопуляций и отличия возрастают в присутствии ионов Mg²⁺. При повышении ионной силы происходят конформационные перестройки в коровой области нуклеосом, характер которых отличается у 2LN и CN при 0,5 М KCl, но становится сходным при 0,7 М KCl. Полученные данные указывают на то, что, несмотря на похожие конформации, характерные для 2LN и CN, одни и те же факторы могут оказывать различное влияние на структуру этих нуклеосом. Это необходимо учитывать в том числе и при изучении взаимодействия мононуклеосом с различными ядерными белками *in vitro*.

Ключевые слова: структура нуклеосом, влияние ионов, флуоресценция, микроскопия, одиночная молекула, конформационные перестройки

Мононуклеосомы, которые могут быть собраны на основе октамера гистонов и ДНК-матриц различной длины, содержащих нуклеосом-позиционирующую последовательность, широко используются в молекулярно-биологических исследованиях [1–7]. В настоящее время значительная часть таких исследований выполняется на кор-нуклеосомах, не имеющих линкерных участков ДНК (линкеров) [1, 6, 7]. В других случаях изучаемые нуклеосомы имеют линкеры (один или два), а их длина изменяется в широких пределах [1, 2, 4, 5, 8]. При столь широкой вариабельности используемых мононуклеосом возникают вопросы о возможной зависимости результатов изучения молекулярных взаимодействий от наличия, числа и длины линкеров, а также о правомерности прямого сравнения данных, полученных в различных исследованиях.

Опубликованные данные свидетельствуют о том, что длина линкеров может влиять на струк-

туру коровой области и взаимодействия нуклеосом. Например, показано, что при наличии линкерной ДНК длиной 30 п.н. или меньше происходит спонтанное частичное отворачивание нуклеосомной ДНК от октамера гистонов [8]. Установлено, что укладка ДНК на октамере гистонов в нуклеосомах с одним линкером изменяется при увеличении длины линкера от 20 до 135 п.н. [9]. Продемонстрировано, что эффективность нуклеосом-белковых взаимодействий может существенно зависеть от наличия, числа и длины линкеров [10, 11].

Дополнительным фактором, способным оказывать влияние на структуру нуклеосом, является присутствие в растворе двухвалентных катионов — в частности, катионов магния. Показано, что эти ионы влияют на структуру хроматина, увеличивая степень его конденсации, а также стабилизируют ДНК-гистоновые взаимодействия в коровой области нуклеосом [12, 13]. Анализ кристаллических структур показывает, что двухвалентные катионы

предпочтительно связываются с большой бороздкой ДНК, где они могут локально влиять на конформацию ДНК, стабилизируя ее изгибы в комплексах ДНК-белок [14]. Характер влияния ионов магния на структуру нуклеосом может также зависеть от длины линкерной ДНК [9].

Поскольку в нуклеосоме при физиологических условиях могут происходить спонтанные конформационные изменения [15], некоторые из которых важны для правильной работы генетического аппарата клетки [16], знания статической структуры этого ДНК-белкового комплекса в кристаллическом состоянии оказывается недостаточно для понимания механизмов его функционирования. Необходимо изучение конформационной динамики и структурной гетерогенности нуклеосом с использованием таких методов, как ядерный магнитный резонанс, малоугловое рентгеновское рассеяние и флуоресцентная микроскопия одиночных частиц на основе Ферстеровского резонансного переноса энергии (spFRET-микроскопия) [1, 6–9, 17].

В настоящей работе методом spFRET-микроскопии изучены структурные особенности укладки ДНК на октамере гистонов в нуклеосомах с двумя линкерами и без них в присутствии и в отсутствие двухвалентных ионов магния, а также в растворах с повышенной ионной силой.

Материалы и методы

Нуклеосомы были получены с помощью двух вариантов флуоресцентно-меченых ДНК-матриц, включавших в себя либо только нуклеосом-позиционирующую последовательность 603 длиной 147 п.н. (кор-нуклеосомы без линкеров, CN), либо последовательность 603 и два участка ДНК по 20 п.н. до начала и после окончания этой последовательности (нуклеосомы с двумя линкерами длиной 20 п.н., 2LN). В обоих случаях к ДНК были присоединены флуоресцентные метки Cy3 и Cy5 соответственно в положениях 13 и 91 п.н. от начала последовательности 603.

Матрицы были получены в ходе полимеразной цепной реакции с использованием флуоресцентно-меченых праймеров CN Fw, CN Rev, 2LN Fw и 2LN Rev:

CN Fw 5'-CCCGGTTCGCGC[Cy3-dT]CCCGCCTTCGGTGTGTTGTCGTCTCTCGG-3',

CN Rev 5'-ACCCCAGGGACTTGAAGTAATAAGGACGGAGGGCCTCTTTCAACATCGATGCACGG[Cy5-dT]GGTTAG-3',

2LN Fw 5'-CAAGCGACACCGGCACTGGGCCCCGGTTCGCGC[Cy3-dT]CCCGCCTTCGGTGTGTGTCGTCTCTCGGGCGT-3',

2LN Rev 5'-GAACCATGATGGGCACTGGGTACCCCAGGGACTTGAAGTAATAAGGACGGAGGCGCTCTTTCAACATCGATGCACGG[Cy5-dT]GGTTAG-3'

ДНК-матрицы были выделены и очищены, как было описано ранее [18]. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически. В качестве источника коровых гистонов использовали хроматин из эритроцитов цыплят без гистона H1 [2]. Сборку нуклеосом на ДНК-матрице проводили в процессе диализа против уменьшающейся концентрации NaCl по протоколу из соответствующей работы [2]. Для измерений методом spFRET-микроскопии нуклеосомы разбавляли до концентрации ~1 нМ в буфере 20 мМ Tris-HCl (pH=8,0), 0,15 М KCl, 1 мМ β-меркаптоэтанол с добавлением 5 мМ MgCl₂ или без такового. Влияние ионной силы на структуру нуклеосом изучали в аналогичных растворах, увеличив концентрацию KCl до 0,5 или 0,7 М. Стабильность структуры нуклеосом CN и 2LN при высокой ионной силе оценивали, сравнивая результаты трех последовательных десятиминутных измерений после повышения концентрации KCl. Измерения выполняли в 12-луночной силиконовой камере (Ibidi GmbH, Германия), закрепленной на покровном стекле, с использованием конфокального микроскопа LSM710-Confocor3 (Zeiss, Германия), как описано ранее [18]. Интенсивность флуоресценции меток Cy3 и Cy5 в составе одиночных нуклеосом регистрировали в процессе свободной диффузии частиц через фокус лазерного луча. Для каждой измеренной нуклеосомы рассчитывали коэффициент близости K , а для выборки строили частотное распределение нуклеосом по величине K , как в соответствующих работах [4, 19]. Коэффициент K является аналогом эффективности FRET без учета поправок на квантовые выходы флуоресценции меток Cy3 и Cy5 и на отличие в чувствительности прибора в областях флуоресценции этих меток. Распределения нуклеосом представляли в виде суперпозиции трех полос Гауссовой формы, соответствующих трем субпопуляциям нуклеосом, отличающимся по величине K . Согласно критерию суммы квадратов отклонений расчетных значений от экспериментальных (χ^2) наилучшее описание K -профилей нуклеосом было достигнуто при положениях максимумов полос 0,04, 0,62 и 0,82. При использовании для описания K -профилей одной Гауссовой полосы вместо двух в области значений $K > 0,2$ точность разложения экспериментальных зависимостей согласно критерию χ^2 существенно снижалась. Размеры субпопуляций отличающихся по структуре нуклеосом определяли как процентное отношение площадей под отдельными Гауссовыми полосами к общей площади под K -профилем. Субпопуляции нуклеосом, соответствующие полосам с максимумами K 0,04, 0,62 и 0,82, обозначали, как LF, MF и HF (сокращения от английских low, middle и high FRET). Результаты были получены в трех независимых экспериментах. Размер выборки составлял не менее 8000 нуклеосом.

Результаты и обсуждение

Исследование методом *spFRET*-микроскопии показало, что в растворе нуклеосомы CN и 2LN (рисунок, А) присутствуют в виде трех субпопуляций LF, MF и HF (низкая, промежуточная и высокая эффективности FRET, соответственно), которые различаются по величине коэффициента эффективности FRET K (рисунок, Б) и, следовательно, по укладке ДНК на октамере гистонов в области расположения меток Су3 и Су5. Отметим, что метки находятся вблизи входа ДНК в нуклеосому в области, которая легче всего подвергается структурным изменениям. Минорная субпопуляция LF, описываемая Гауссовым (нормальным) распределением с максимумом 0,04, соответствует нуклеосомам с нарушенной укладкой нуклеосомной ДНК, возникающей из-за частичной (или полной) потери гистонов в разбавленных растворах. Считается, что в эту субпопуляцию могут также давать вклад нуклеосомы, в которых ДНК временно отвернута от октамера гистонов вследствие так называемого «дыхания нуклеосом» [20]. Доминирующие субпопуляции MF и HF, описываемые нормальными распределениями с расчетными максимумами 0,62 и 0,82, соответствуют, по-видимому, двум различным типам укладки супер-витков ДНК на октамере гистонов, характерным для интактных нуклеосом. Изменения в укладке ДНК могут быть вызваны близкими по свободной энергии вариантами взаимодействий между ДНК, гистонами и ионным окружением, которые отличаются расстоянием между соседними супервитками ДНК в области расположения меток при сохранении взаимодействия ДНК с гистонами, наличием локального суперскручивания двухцепочечной ДНК или отличающимся на 1–2 п.н. позиционированием ДНК на октамере гистонов. Идентификация данных структурных особенностей методом *spFRET*-микроскопии затруднена.

K -профили интактных нуклеосом CN в присутствии и в отсутствие ионов Mg^{2+} немного отличаются (рисунок, Б). Анализ показывает, что распределение нуклеосом CN между состояниями MF и HF составляет 33:67 в растворе без ионов Mg^{2+} и 35:65 в присутствии 5 мМ Mg^{2+} ($p=0,15$, различия недостоверны, рисунок, В).

Отличия K -профилей нуклеосом 2LN в растворах с ионами Mg^{2+} и без них также небольшие (рисунок, Б) и связаны с изменением распределения между состояниями MF и HF от 29:71 без Mg^{2+} до 27:73 в присутствии 5 мМ Mg^{2+} ($p=0,14$, различия недостоверны, рисунок, В). Таким образом, по данным *spFRET*-анализа в обоих типах нуклеосом двухвалентные катионы магния вызывают лишь небольшие смещения в равновесии двух вариантов укладки ДНК в области ее входа в коровую область нуклеосомы.

Сравнительный анализ K -профилей выявил достоверные отличия нуклеосом CN и 2LN в области высоких значений K (рисунок, Б), связанные с распределением нуклеосом по состояниям MF и HF. Соотношение субпопуляций HF/MF больше у нуклеосом 2LN, чем у CN-нуклеосом, в 1,2 раза ($p=0,005$) и в 1,45 раза ($p=0,009$) соответственно в отсутствие и в присутствии ионов Mg^{2+} . По-видимому, взаимодействия положительно заряженных хвостов гистонов с линкерными участками ДНК смещают равновесие между двумя структурными состояниями в сторону HF-конформации, а двухвалентные ионы магния, имеющие тенденцию к связыванию в широкой бороздке ДНК [14, 21], снижают электростатическое отталкивание между соседними супервитками ДНК и дополнительно стабилизируют эту конформацию.

Поскольку повышение ионной силы дестабилизирует нуклеосомы и потенциально способно выявить отличия в стабильности их структуры, было проведено сравнительное изучение нуклеосом CN и 2LN при концентрации одновалентных ионов 0,5 и 0,7 М (в присутствии 5 мМ Mg^{2+}).

Установлено, что повышение концентрации KCl до 0,5 М приводит к значительному увеличению субпопуляции HF по сравнению с MF у CN-нуклеосом и к противоположному эффекту у 2LN-нуклеосом (рисунок, Г, Д, Ж). В случае 2LN-нуклеосом, в отличие от CN-нуклеосом, дополнительно регистрируется небольшое увеличение субпопуляции LF (рисунок, Г). Эти структурные изменения происходят сразу после увеличения ионной силы, а в течение последующего периода наблюдения (до 30 мин) структура нуклеосом существенно не меняется (рисунок, Е).

При увеличении концентрации KCl до 0,7 М обнаружены полный переход 2LN-нуклеосом из HF- в MF-конформацию и увеличение LF-субпопуляции, а для CN-нуклеосом – значительное уменьшение HF-субпопуляции, сопровождающееся возрастанием MF- субпопуляции (рисунок, Г, Д, Ж). Устанавливаемое после увеличения ионной силы распределение нуклеосом по величине K стабильно в течение 30 мин наблюдения в случае 2LN-нуклеосом, но продолжает немного изменяться у CN-нуклеосом (рисунок, Е). При этом значительной дестабилизации структуры, регистрируемой как увеличение LF-субпопуляции, у CN-нуклеосом не наблюдается (рисунок, Д).

Таким образом, HF-конформация в случае 2LN-нуклеосом является неустойчивой при повышении ионной силы и, возможно, при других видах воздействий, влияющих на электростатические взаимодействия между ДНК и гистонами. MF-конформация в этих условиях оказывается более энергетически выгодной и эффективно препятствует дальнейшей реорганизации структуры нуклеосом с потерей гистонов, которая, по опублико-

ванным данным, является характерным процессом в растворах с высокой ионной силой [22, 23].

В случае CN-нуклеосом умеренное повышение ионной силы способствует стабилизации HF-конформации, что, возможно, связано с ослаблением влияния положительно заряженных хвостов гистонов на укладку нуклеосомной ДНК в отсутствие линкерных участков ДНК. Ослабле-

ние влияния может происходить вследствие усиления электростатического экранирования зарядов на ДНК и гистонах при увеличении концентрации свободных ионов. После экранирования влияния хвостов гистонов дальнейшее увеличение ионной силы способствует, как и в случае 2LN-нуклеосом, переходу CN-нуклеосом из HF- в MF-конформацию (рисунок, Д, Ж).

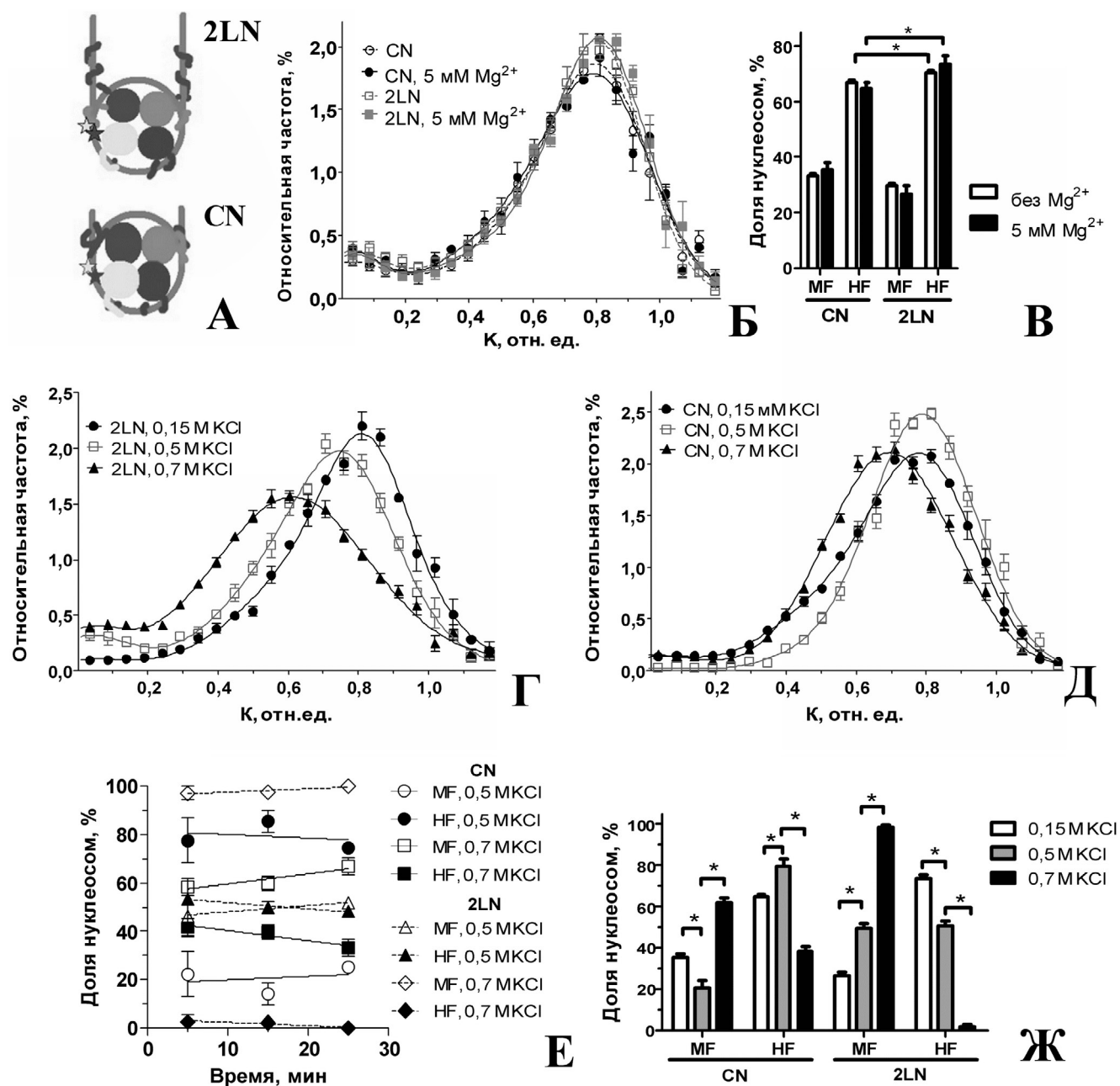


Рисунок. Влияние линкерных участков ДНК на укладку нуклеосомной ДНК в коровой области. (А) Схема структуры нуклеосом CN и 2LN и положение в них меток Cy3 и Cy5 (соответственно белая и черная звездочки). (Б) Частотные распределения нуклеосом CN и 2LN по эффективности FRET (K) при концентрации KCl 150 мМ в присутствии и в отсутствие 5 мМ Mg^{2+} . (В) Гистограммы относительного содержания MF- и HF-субпопуляций нуклеосом в образцах CN и 2LN при концентрации KCl 150 мМ в присутствии и в отсутствие 5 мМ Mg^{2+} (* — $p < 0,05$). На графиках показаны средние значения $\pm$ ошибка среднего. (Г, Д) Частотные распределения для нуклеосом CN и 2LN по эффективности FRET (K) при различной ионной силе раствора в присутствии 5 мМ ионов Mg^{2+} . (Е) Стабильность нуклеосом во времени при повышенной ионной силе. Представлены данные об изменениях в относительном содержании MF- и HF-субпопуляций нуклеосом в течение трех последовательных 10-минутных интервалов наблюдения после повышения ионной силы. (Ж) Гистограммы относительного содержания MF- и HF-субпопуляций нуклеосом в образцах CN и 2LN при различной ионной силе раствора в присутствии 5 мМ Mg^{2+} (* — $p < 0,05$). На графиках показаны средние значения $\pm$ ошибка среднего.

Полученные данные указывают на то, что, несмотря на сходные конформации, характерные для 2LN- и CN-нуклеосом, одни и те же факторы могут оказывать разнонаправленное влияние на структуру этих нуклеосом, что необходимо учитывать, в том числе, и при изучении взаимодействия моноклеосом с различными ядерными белками *in vitro*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhou K., Gaullier G., Luger K. Nucleosome structure and dynamics are coming of age // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2019. Vol. 26. N 1. P. 3–13.
2. Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Bondarenko V.A., Studitsky V.M. Preparation and analysis of uniquely positioned mononucleosomes // *Methods in Molecular Biology*, vol. 523 / Eds. S. Chellappan. N.Y.: Humana press, 2009. P. 109–123.
3. Mizuguchi G., Shen X., Landry J., Wu W.H., Sen S., Wu C. ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex // *Science*. 2004. Vol. 303. N 5656. P. 343–348.
4. Valieva M.E., Armeev G.A., Kudryashova K.S., Gerasimova N.S., Shaytan A.K., Kulaeva O.I., McCullough L.L., Formosa T., Georgiev P.G., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Large-scale ATP-independent nucleosome unfolding by a histone chaperone // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2016. Vol. 23. N 12. P. 1111–1116.
5. Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Volokh O., Shaytan A.K., Hsieh F.K., Kirpichnikov M.P., Sokolova O.S., Studitsky V.M. Structural analysis of nucleosomal barrier to transcription // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015. Vol. 112. N 43. P. 5787–5795.
6. Kim J., Wei S., Lee J., Yue H., Lee T.H. Single-molecule observation reveals spontaneous protein dynamics in the nucleosome // *J. Phys. Chem. B*. 2016. Vol. 120. N 34. P. 8925–8931.
7. Chen Y., Tokuda J.M., Topping T., Sutton J.L., Meisburger S.P., Pabit S.A., Gloss L.M., Pollack L. Revealing transient structures of nucleosomes as DNA unwinds // *Nucleic Acids Res.* 2014. Vol. 42. N 13. P. 8767–8776.
8. Huang Y.C., Su C.J., Korolev N., Berezhnoy N.V., Wang S., Soman A., Chen C.Y., Chen H.L., Jeng U.S., Nordenskiöld L. The effect of linker DNA on the structure and interaction of nucleosome core particles // *Soft Matter*. 2018. Vol. 14. N 45. P. 9096–9106.
9. Andreeva T., Maluchenko N., Chertkov O., Studitsky V., Feofanov A., Kirpichnikov M. Length of DNA linker affects nucleosomal DNA structure // *Microsc. Microanal.* 2020. Vol. 26. Suppl. S2. P. 1390–1392.
10. Clark N.J., Kramer M., Muthurajan U.M., Luger K. Alternative modes of binding of poly(ADP-ribose) polymerase 1 to free DNA and nucleosomes // *J. Biol. Chem.* 2012. Vol. 287. N 39. P. 32430–32439.
11. White A.E., Hieb A.R., Luger K. A quantitative investigation of linker histone interactions with nucleosomes and chromatin // *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6: 19122.
12. d'Erme M., Yang G., Sheagly E., Palitti F., Bustamante C. Effect of poly(ADP-ribosylation) and Mg^{2+} ions on chromatin structure revealed by scanning force microscopy // *Biochemistry*. 2001. Vol. 40. N 37. P. 10947–10955.
13. Schwarz P.M., Hansen J.C. Formation and stability of higher order chromatin structures. Contributions of the histone octamer // *J. Biol. Chem.* 1994. N 269. N 23. P. 16284–16289.
14. Guérout M., Boittin O., Mauffret O., Etchebest C., Hartmann B. Mg^{2+} in the major groove modulates B-DNA structure and dynamics // *PLoS One*. 2012. Vol. 7. N 7: e41704.
15. Armeev G.A., Gribkova A.K., Pospelova I., Komarova G.A., Shaytan A.K. Linking chromatin composition and structural dynamics at the nucleosome level // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2019. Vol. 56. P. 46–55.
16. Lai W.K.M., Pugh B.F. Understanding nucleosome dynamics and their links to gene expression and DNA replication // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017. Vol. 18. N 9. P. 548–562.
17. Shi X., Prasanna C., Nagashima T., Yamazaki T., Pervushin K., Nordenskiöld L. Structure and dynamics in the nucleosome revealed by solid-state NMR // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2018. Vol. 130. N 31. P. 9882–9886.
18. Kudryashova K.S., Chertkov O.V., Nikitin D.V., Pestov N.A., Kulaeva O.I., Efremenko A.V., Solonin A.S., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Preparation of mononucleosomal templates for analysis of transcription with RNA polymerase using spFRET // *Methods in Molecular Biology*, vol. 1288 / Eds. S. Chellappan. N.Y.: Humana press, 2015. P. 395–412.
19. Feofanov A.V., Andreeva T.V., Studitsky V.M., Kirpichnikov M.P. Reversibility of structural rearrangements in mononucleosomes induced by ionic strength // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018. Vol. 73. N 3. P. 157–161.
20. Buning R., Van Noort J. Single-pair FRET experiments on nucleosome conformational dynamics // *Biochimie*. 2010. Vol. 92. N 12. P. 1729–1740.
21. Robbins T.J., Ziebarth J.D., Wang Y. Comparison of monovalent and divalent ion distributions around a DNA duplex with molecular dynamics simulation and a Poisson-Boltzmann approach // *Biopolymers*. 2014. Vol. 101. N 8. P. 834–848.
22. Böhm V., Hieb A.R., Andrews A.J., Gansen A., Rocker A., Tóth K., Luger K., Langowski J. Nucleosome accessibility governed by the dimer/tetramer interface // *Nucleic Acids Res.* 2011. Vol. 39. N 1. P. 3093–3102.
23. Chen Y., Tokuda J.M., Topping T., Meisburger S.P., Pabit S.A., Gloss L.M., Pollack L. Asymmetric unwrapping of nucleosomal DNA propagates asymmetric opening and dissociation of the histone core // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2017. Vol. 114. N 2. P. 334–339.

Поступила в редакцию 13.05.2021 г.

После доработки 03.06.2021 г.

Принята в печать 16.06.2021 г.

RESEARCH ARTICLE

Influence of linker DNA on nucleosome structure according to single-particle fluorescence microscopy data

T.V. Andreeva¹, A.V. Lyubitelev¹, N.V. Malyuchenko¹, V.M. Studitsky^{1,2},
M.P. Kirpichnikov^{1,3} , A.V. Feofanov^{1,3,*} 

¹Bioengineering Department, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University,
Leninskie Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Fox Chase Cancer Center, Cottman Avenue 333, Philadelphia, 19111, Pennsylvania, USA;

³Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, 117997, Moscow, Russia

*e-mail: avfeofanov@yandex.ru

Mononucleosomes assembled using DNA templates of various lengths that contain a nucleosome-positioning sequence are widely used in molecular biological studies, but their structural features require detailed investigation. The single-particle fluorescence microscopy based on the Förster resonance energy transfer was used to compare the structure of nucleosomes with two 20 bp length DNA linkers and core-nucleosomes without linkers (CN) in solutions containing 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂ (or without MgCl₂), as well as in solutions with increased ionic strength (0.5 and 0.7 M KCl). It was found that these nucleosomes are present in solutions as two dominant subpopulations, which differ in the DNA folding on the histone octamer. It was revealed that CN and 2LN differ in the ratio of these subpopulations, and the differences increase in the presence of Mg²⁺ ions. With an increase in the ionic strength, conformational reorganizations occur in the core region of the nucleosomes. The character of the reorganizations differs in 2LN and CN at 0.5 M KCl, but becomes similar at 0.7 M KCl. The obtained data indicate that, despite the similar conformations of 2LN and CN, the same factors can induce different effect on the structure of these nucleosomes, and it should be taken into account when, for example, studying the interactions of mononucleosomes with various nuclear proteins *in vitro*.

Keywords: nucleosome structure, influence of ions, fluorescence, microscopy, single molecule, conformational changes

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 19-74-30003.

Сведения об авторах

Андреева Татьяна Викторовна — аспирантка кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: andreeva.tatyana.2014@post.bio.msu.ru

Любителиев Александр Викторович — мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91, e-mail: varanus-salvator@yandex.ru

Малюченко Наталия Валериевна — канд. биол. наук, доц. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ, Тел 8 495-938-00-05, e-mail: mal_nat@mail.ru

Студитский Василий Михайлович — докт. биол. наук, проф. Центра исследований рака Фокс Чейз (Филадельфия, США). Тел.: +1-888-369-2427; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu

Кирпичников Михаил Петрович — акад., проф., докт. биол. наук, зав. кафедрой биоинженерии биологического факультета МГУ, зав. отделом биоинженерии ИБХ РАН. Тел.: 8-495-939-27-76; e-mail: kirpichnikov@inbox.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8170-1607>

Феофанов Алексей Валерьевич — докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ, руководитель лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: avfeofanov@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1596-9506>