

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.212

**Визуализация искусственных полинуклеосомных конструкций
методом атомно-силовой микроскопии****А.В. Любительев^{1,*} , Д.В. Багров¹ , О.В. Гераськина² , В.М. Студитский^{1,3}** ¹*Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*²*Институт биологии гена, Российская академия наук, Россия, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5;*³*Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Ave., Philadelphia, 19111, Pennsylvania, USA***e-mail: varanus-salvator@yandex.ru*

Генетический материал клетки в интерфазном ядре представлен в виде плотной ДНК-белковой структуры, называемой хроматином. Строение и динамика отдельных нуклеосом, представляющих собой первый уровень компактизации ДНК, в настоящее время хорошо изучена, тогда как сведения о структурно-функциональной организации более высоких уровней организации хроматина все еще ограничены. В настоящей работе предложен метод визуализации полинуклеосомных конструкций при помощи атомно-силовой микроскопии. Продемонстрирована сборка полинуклеосом на плазмиде с применением октамеров рекомбинантных гистонов. Установлено, что при применении глутарового альдегида для фиксации препарата перед нанесением на подложку, нуклеосомы сохраняются, а их ширина и высота хорошо соответствует литературным данным. При этом сами плазмиды выглядят расправленными, что может помочь в изучении ДНК-белковых взаимодействий.

Ключевые слова: *хроматин, нуклеосома, ДНК-белковые комплексы, атомно-силовая микроскопия*

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3S-8

Введение

В интерфазных ядрах эукариотических клеток ДНК организована в сложную ДНК-белковую структуру, называемую хроматином. Базовой структурной единицей хроматина является нуклеосома, представляющая собой октамер гистоновых белков, вокруг которого обернуто ~1,7 витка ДНК [1]. Следующим уровнем компактизации является так называемая 10-нм фибрилла, представляющая собой цепь нуклеосом, сформированных на хромосомной ДНК [2]. В присутствии низких концентраций катионов такая фибрилла формирует более компактную структуру, получившую название 30-нм фибриллы [3], для которой было предложено несколько альтернативных моделей организации [4, 5]. Долгое время считалось, что один из вариантов укладки ДНК в 30-нм фибриллу соответствует следующему уровню иерархической организации генетического материала *in vivo* [6], однако обнаружить подобные структуры *in vivo* удалось лишь для очень ограниченного числа объектов [7]. В большинстве же интерфазных клеточных ядер иерархической организации укладки хроматина не наблюдалось [8–10]. В соответствии

с этим в настоящее время считается, что интерфазный хроматин в диапазоне от сотен до тысяч п. н. не имеет четкой структуры [11, 12], а следующим уровнем иерархической укладки являются топологически ассоциированные домены (Topologically Associating Domain, TAD), возникающие в результате экструзии петель 10-нм фибриллы когезинами или конденсинами [13, 14]. В рамках этих представлений хроматин в масштабе единиц тысяч п. н. представляет собой плотно упакованные полинуклеосомные цепочки, не имеющие четкой структуры и проявляющие свойства жидкой или гелеобразной фазы [15, 16]. Отдельные нуклеосомы при этом могут взаимодействовать как с ближайшими соседями, так и с фрагментами других TAD [17, 18]. Подобная организация интерфазного хроматина обуславливает необходимость учета межинуклеосомных взаимодействий и конформационных ограничений при моделировании структур, участвующих в регуляции генетического аппарата клетки. Еще одним процессом, обуславливающим структурную и функциональную организацию хроматина, является формирование крупных надмолекулярных структур нечет-

кого состава [19], происходящее за счет разделения жидких фаз и взаимодействия между белковыми доменами со внутренней неупорядоченностью [20]. Указанные особенности ограничивают информативность моонуклеосомных моделей, традиционно применяемых для анализа динамики и регуляции работы хроматина. Экспериментальные подходы с применением ди- и тринуклеосом позволяют учесть некоторые свойства высших уровней компактизации хроматина, такие, как присутствие соседних нуклеосом и ограничение подвижности линкерной ДНК, однако, в силу небольших размеров ДНК-матриц, их применение ограничено в основном изучением сайт-специфических взаимодействий [21]. Полинуклеосомные матрицы с регулярным расположением нуклеосом моделируют межнуклеосомные взаимодействия и, в сочетании с криоэлектронной микроскопией высокого разрешения, могут применяться для визуализации взаимодействия с хроматином белков, содержащих участки со внутренней неупорядоченностью, таких, как линкерные гистоны [22]. Тем не менее, регулярные полинуклеосомные матрицы в подобных экспериментах свернуты в фибриллоподобные структуры, отсутствующие в большинстве клеточных ядер. Экспериментальные подходы, обеспечивающие визуализацию нерегулярных или квазирегулярных полинуклеосомных матриц и их комплексов с регуляторными белками могут позволить моделировать структуры, которые при помощи текущих модельных систем воспроизвести не удастся. В настоящей работе предлагается метод визуализации искусственных полинуклеосомных конструкций при помощи атомно-силовой микроскопии.

Материалы и методы

Сборка полинуклеосом. Плазмида pYP05, содержащая 13 tandemных повторов нуклеосом-позиционирующей последовательности S601 [23], была сконструирована ранее [24]. Для амплификации плазмиды применили штамм *E. coli* XL10 Gold. Клетки бактерий трансформировали электропорацией и выращивали на среде LB в течение 12 ч при 37°C. Выделение плазмиды производили при помощи набора Plasmid midiprep 2.0 (Евроген, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Октамеры рекомбинантных гистонов *Xenopus laevis* были получены с применением ранее опубликованной методики [25]). Для реконституции нуклеосом плазмиду смешивали с октамерами гистонов в буфере для диализа (2 М NaCl, 10 мМ HEPES, 0,1% NP40, 0,2 мМ ЭДТА, 5 мМ β-меркаптоэтанол). Полученную пробу диализовали против буферов с последовательно уменьшающейся концентрацией NaCl, аналогично описанной ранее процедуре [26].

Рестрикционный анализ препаратов полинуклеосом. Для оценки качества получаемых полину-

клеосом применяли метод удлинения праймера, описанный ранее [24]. Препараты полинуклеосом обрабатывали рестриктазами AluI и EcoRI (Сибзеним, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Образовавшиеся фрагменты ДНК экстрагировали из раствора с помощью смеси фенола и хлороформа. Очищенную ДНК использовали в качестве матрицы для реакции удлинения праймеров с олигонуклеотидом, меченым флуорофором Cy5 (Lumiprobe, Россия), комплементарным участку плазмидной ДНК выше последовательности S601, наиболее удаленной от сайта узнавания рестриктазы EcoRI. Полученную смесь оцДНК, несущих флуорофоры Cy5, анализировали при помощи секвенирующего электрофореза в полиакриламидном геле с мочевиной. Визуализацию полос в геле производили с помощью флуоресцентного сканера Typhoon (Amersham, США).

Атомно-силовая микроскопия (АСМ). Для измерений методом АСМ образцы полинуклеосом фиксировали с помощью 1%-ного глутарового альдегида. Фиксацию проводили в буфере (10 мМ HEPES, pH 7,5) в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем образцы разводили до концентрации ДНК ~1–3 мкг/мл и добавляли раствор MgCl₂ до концентрации 2–3 мМ. Этот раствор наносили на сколотую поверхность слюды и инкубировали в течение 1 мин. После этого каплю раствора удаляли фильтровальной бумагой и отмывали поверхность слюды водой в течение 3–5 мин. В конце слюду высушивали потоком азота.

Сканирование проводили на микроскопе Интегра Прима (ООО «Нова СПб», Россия) в полуконтактном режиме. Использовали кантилеверы HA_HR (характерная жесткость 17 Н/м, типичный радиус кривизны менее 10 нм). Обработку изображений проводили с помощью программ Nova (ООО «Нова СПб», Россия) и FemtoScan Online [27].

Результаты и обсуждение

Получение препаратов полинуклеосом. Для получения препаратов необходимого качества проводили сборку полинуклеосом на плазмиде pYP05 с разным массовым соотношением ДНК и октамеров гистонов. Долю сформировавшихся нуклеосом относительно числа позиционирующих последовательностей оценивали при помощи реакции удлинения праймера (рис. 1А). При соотношении ДНК и октамеров 5:1 наблюдалось преобладание коротких рестрикционных фрагментов в пробе при практически полном отсутствии длинных, что соответствует полинуклеосомам, на которых более одной свободной позиционирующей последовательности. При соотношении ДНК:октамер 1:1 коротких рестрикционных фрагментов практически не наблюдается, что свидетельствует о достижении концентрации, близкой к насыщающей. Соотношения ДНК:октамер, равные 2,5:1 и 1,67:1 характеризуются присутствием

полного набора рестрикционных фрагментов. При этом количество коротких и длинных рестрикционных фрагментов одинаковое в случае соотношения 2,5:1, или сдвинуто в пользу длинных фрагментов в случае соотношения 1,67:1 (рис. 1Б). Подобная картина соответствует концентрации октамера гистонов ниже насыщающей и формированию нуклеосом не менее чем на 12 позиционирующих последовательностей из 13.

Разработчики плазмиды rYP05 использовали ее для сборки полинуклеосомы с применением донорного хроматина [28]. Описанная ими методика была нами модифицирована — вместо донорного хроматина мы использовали октамеры рекомбинантных гистонов. Такой подход позволяет сформировать на ДНК-матрице одинаковые по своему составу нуклеосомы. Донорный хроматин, получаемый из клеточных ядер, включает множество вариантов гистонов, несущих трудно-характеризуемые посттрансляционные модификации. Использованный в данной работе подход позволяет получить препараты с высокой плотностью нуклеосом на последовательностях S601 и в широком диапазоне соотношений концентраций ДНК и октамера. При этом состав применяемых для сборки октамеров может быть выбран в соответствии с решаемой задачей и включать заданные варианты гистонов или миметики посттрансляционных модификаций. Для экспериментов по визуализации полинуклеосом был выбран препарат с соотношением ДНК-октамер 1,67:1, поскольку он характеризуется более высокой плотностью нуклеосом на позиционирующих последовательностях по сравнению с препаратами с меньшей концентрацией октамеров. При этом концентрация октамеров в этом препарате все еще ниже насыщающей, что снижает вероятность формирования агрегатов.

Визуализация полинуклеосом Для контроля структуры полинуклеосом использовали метод АСМ. Типичные изображения, полученные с его помощью, представлены на рис. 2А–Г. Полинуклеосомы, как и следовало ожидать, выглядели как наборы гранул, соединенных тонкими нитями ДНК. Высота ДНК над подложкой составляла 0,4–0,7 нм, как это часто бывает при нанесении молекул ДНК на слюду в присутствии ионов двухвалентных металлов [29]. Гранулы, связанные с ДНК, могут быть интерпретированы как отдельные нуклеосомы или их группы, если они расположены очень близко.

Данные о высоте и ширине отдельных гранул собраны на рис. 2Д. На графике разная форма символов соответствует разным полинуклеосомам. Видно, что высота гранул лежала в диапазоне 1,3–6,2 нм, а ширина в диапазоне 11–26 нм (ее измеряли на половине высоты, располагая линию сечения преимущественно поперек молекулы ДНК). При этом, если рассматривать взаимное расположение точек, оказывается, что гранулы можно условно разделить на «мелкие» (высота 1,3–3,5 нм, ширина 11–18 нм) и «крупные» (высота 2,0–6,2 нм, ширина 18–23 нм). Область диаграммы, в которой сосредоточены точки, соответствующие «мелким» частицам, обведена пунктирной линией, в этой области расположены 43 частицы из 67. Можно предположить, что «мелкие» частицы представляют собой отдельные нуклеосомы, а «крупные» представляют собой группы, т.е. близко расположенные пары и тройки нуклеосом. Они вариативны по размерам, потому что они могут существенно различаться по взаимному расположению нуклеосом, входящих в группу. Данные о размерах «мелких» гранул хорошо соответствуют данным о размерах отдельных нуклеосом, получаемых методом АСМ [30–32].

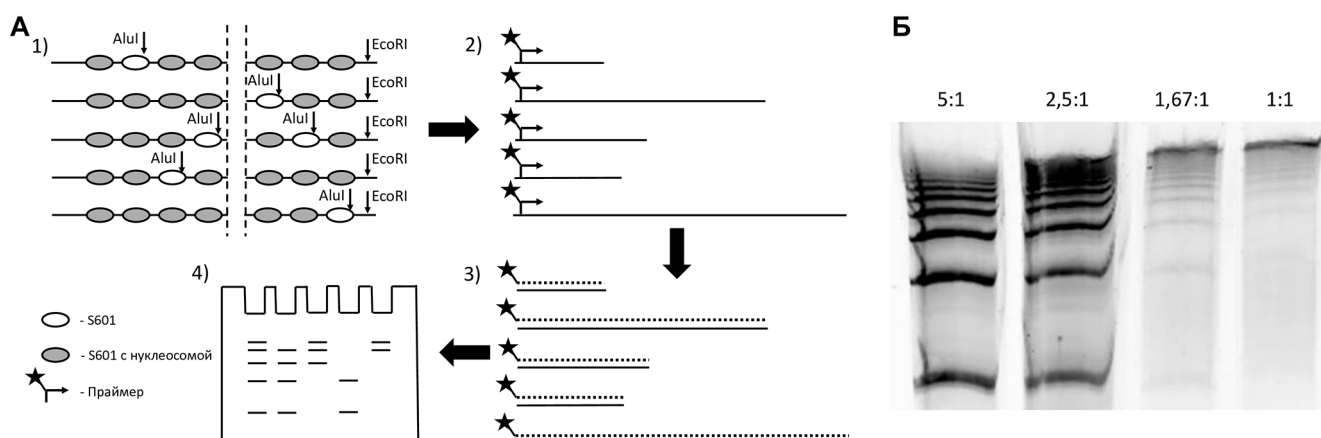


Рис. 1. Рестрикционный анализ препаратов полинуклеосом. А — Схема рестрикционного анализа и реакции удлинения праймеров. 1 — Обработка препарата полинуклеосом эндонуклеазами. 2 — Очистка получившихся фрагментов ДНК и гибридизация с праймерами, содержащими флуоресцентную метку. 3 — Удлинение праймеров полимеразой до сайта расщепления эндонуклеазой. 4 — Секвенирующий электрофорез фрагментов оцДНК с флуоресцентными метками. Б — Результаты электрофореза продуктов реакции удлинения праймеров для препаратов полинуклеосом с разным массовым соотношением ДНК и октамеров (указано над дорожками).

Характеристики кантилевера, а также параметры сканирования могут влиять на значения измеряемых характеристик — и ширины объектов, и их высоты над подложкой. Это влияние показано как для ДНК [33], так и для белков [34], и оно создает очевидные метрологические сложности. Они усугубляются тем, что кантилеверы из одной упаковки могут значительно различаться по основным характеристикам (прежде всего, по жесткости и радиусу кривизны). В данном случае возможные искажения размеров, связанных с процессом и параметрами сканирования, уже учтены на этапе построения диаграммы (рис. 2Д). На ней присутствуют точки, соответствующие гранулам, изображения которых получены разными кантилеверами (все они были одного и того же типа НА_{HR}) и при разных настройках АСМ.

При подготовке образцов ожидалось, что нуклеосомы преимущественно формируются на позиционирующих последовательностях, входящих в состав плазмиды, при этом избыток октамеров будет неспецифически связываться с оставшейся плазмидной ДНК. Оказалось, что при выбранном соотношении ДНК:октамер (1,67:1) нуклеосомы практически равномерно распределены по плазмиде, без явного сгущения в одной области. В совокупности с данными анализа методом удлинения праймеров это демонстрирует высокое неспецифическое связывание гистонов с ДНК. Оно позволяет регулировать плотность нуклеосом на плазмиде за пределами последовательностей S601 при помощи изменения концентрации октамера в пробе, однако снижает информативность оценки качества сборки препаратов полинуклео-

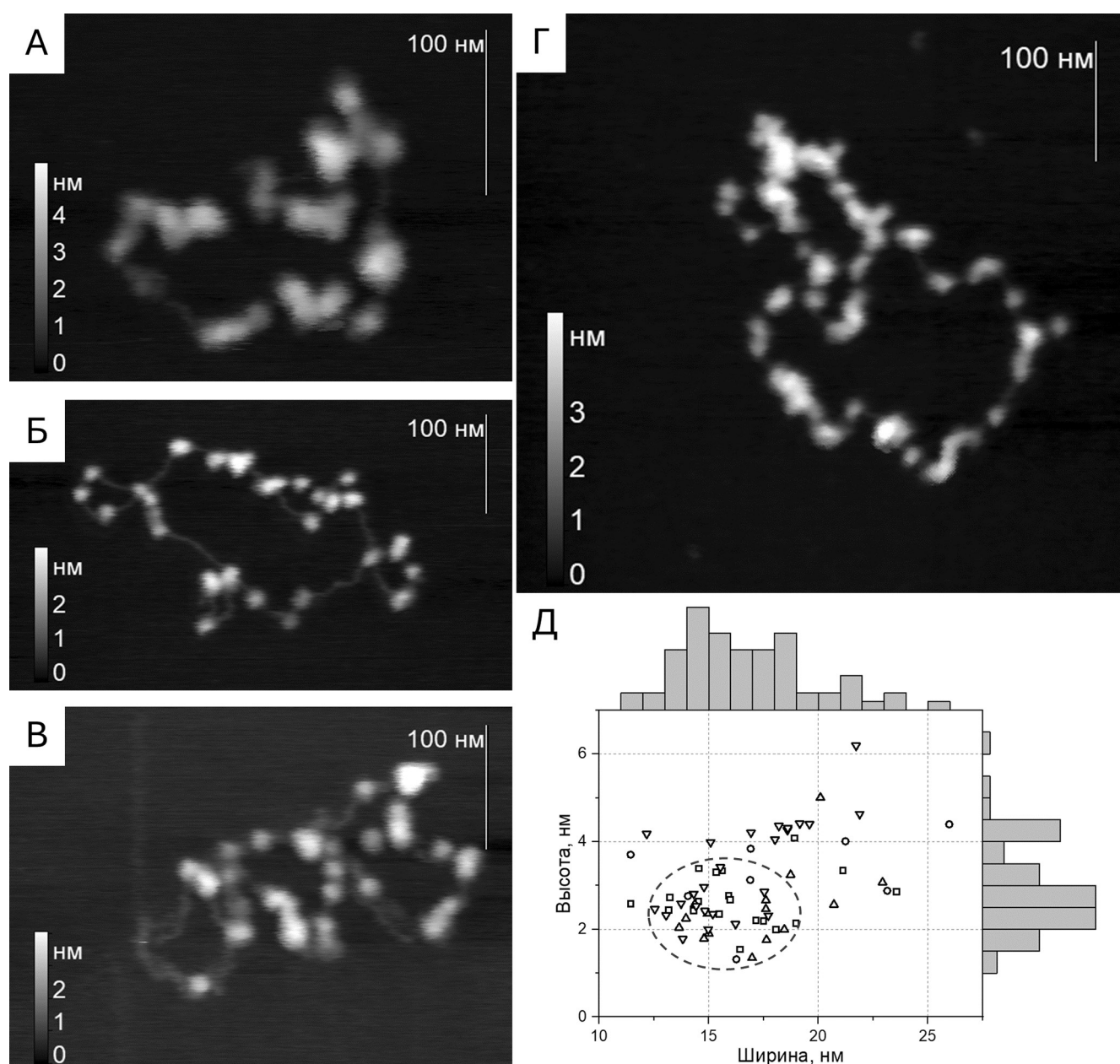


Рис. 2. Исследование полинуклеосом методом АСМ. Соотношение ДНК:октамер — 1,67:1. А–Г — изображения полинуклеосом, Д — взаимосвязь между высотой и шириной отдельных объектов, связанных с ДНК. Количество объектов на диаграмме N = 67.

сом методом удлинения праймера в силу невозможности прямого сопоставления изображений полинуклеосом с картиной распределения рестрикционных фрагментов.

Применяемые методы нанесения препарата на подложку обеспечивают фиксацию большинства плазмид в расправленном виде, что позволяет хорошо различать отдельные нуклеосомы и оценивать расстояния между ними. Релаксированная конформация ДНК, по-видимому, объясняется ее поверхностной диффузией после адсорбции на подложку [35].

Заключение

В данной работе описана методика формирования полинуклеосом с помощью плазмиды рΥР05 и рекомбинантных гистонов. Получены полинуклеосомы с высокой загрузкой октамеров на нуклеосом-позиционирующие последовательности — это показано реакцией удлинения праймеров. Методом АСМ получены изображения полинуклеосом на подложке: индивидуальные нуклеосомы имели высоту 1,3–3,5 нм и ширину 11–18 нм, что хорошо соответствует литературным данным.

АСМ является приемлемым методом визуализации, но с ним связан ряд ограничений. Например, из-за ограничения разрешения, связанного с конечным радиусом кривизны кантилевера, и соответствующего уширения объектов, не всегда удается описать близко расположенные пары и тройки нуклеосом. Чтобы предотвратить вытеснение гистонов с ДНК, полинуклеосомы фиксировали глутаровым альдегидом [36]). В данной работе фикса-

цию проводили при низкой концентрации моновалентных катионов, что препятствовало формированию межнуклеосомных взаимодействий и укладке 10-нм фибриллы в компактные структуры. Фиксация стабилизирует нуклеосомы и значительно облегчает измерения, но в общем случае может приводить к артефактам и, в том числе, гипотетически может приводить к ковалентной сшивке близко расположенных нуклеосом. Поэтому в дальнейшем мы планируем более детально проанализировать влияние условий фиксации и нанесения образца на подложку на конформацию полинуклеосом, видимую с помощью АСМ.

Изображения, получаемые методом АСМ, позволяют оценивать среднее число нуклеосом на плазмиде и проследить возможные изменения этого параметра под влиянием условий эксперимента. При таком расположении полинуклеосом также потенциально можно визуализировать молекулы белков, связывающихся с межнуклеосомными участками ДНК, и это может быть использовано для определения закономерностей регуляции активности и структурных перестроек хроматина. В то же время могут быть сложности с тем, чтобы отличить нуклеосому от крупного глобулярного белка, связанного с ДНК.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 21-64-00001-П). Настоящая работа не содержит собственных исследований с использованием людей и животных в качестве объектов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 1997;389(6648):251–260.
2. Olins D.E., Olins A.L. Chromatin history: our view from the bridge. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003;4(10):809–814.
3. Finch J.T., Klug A. Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1976;73(6):1897–1901.
4. Wu C., Bassett A., Travers A. A variable topology for the 30-nm chromatin fibre. *EMBO Rep.* 2007;8(12):1129–1134.
5. Robinson P.J.J., Fairall L., Huynh V.A.T., Rhodes D. EM measurements define the dimensions of the “30-nm” chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006;103(17):6506–6511.
6. Grigoryev S.A., Woodcock C.L. Chromatin organization — the 30 nm fiber. *Exp. Cell Res.* 2012;318(12):1448–1455.
7. Scheffer M.P., Eltsov M., Frangakis A.S. Evidence for short-range helical order in the 30-nm chromatin fibers of erythrocyte nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011;108(41):16992–16997.
8. Eltsov M., Maclellan K.M., Maeshima K., Frangakis A.S., Dubochet J. Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of 30-nm chromatin fibers in mitotic chromosomes *in situ*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008;105(50):19732–19737.
9. Nishino Y., Eltsov M., Joti Y., Ito K., Takata H., Takahashi Y., Hihara S., Frangakis A.S., Imamoto N., Ishikawa T., Maeshima K. Human mitotic chromosomes consist predominantly of irregularly folded nucleosome fibres without a 30-nm chromatin structure. *EMBO J.* 2012;31(7):1644–1653.
10. Hsieh T.H.S., Weiner A., Lajoie B., Dekker J., Friedman N., Rando O.J. Mapping nucleosome resolution chromosome folding in yeast by micro-C. *Cell*. 2015;162(1):108–119.
11. Razin S.V., Gavrillov A.A. Chromatin without the 30-nm fiber: Constrained disorder instead of hierarchical folding. *Epigenetics*. 2014;9(5):653–657.
12. Maeshima K. The shifting paradigm of chromatin structure: from the 30-nm chromatin fiber to liquid-like organization. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 2025;101(6):339–356.
13. Schwarzer W., Abdennur N., Goloborodko A., Pekowska A., Fudenberg G., Loe-Mie Y., Fonseca N.A., Huber W., Haering C.H., Mirny L., Spitz F. Two independent modes of chromatin organization revealed by cohesin removal. *Nature*. 2017;551(7678):51–56.
14. Bintu B., Mateo L.J., Su J.H., Sinnott-Armstrong N.A., Parker M., Kinrot S., Yamaya K., Boettiger A.N., Zhuang X. Super-resolution chromatin tracing reveals domains and cooperative interactions in single cells. *Science*. 2018;362(6413):eaau1783.

15. Gibson B.A., Blaukopf C., Lou T., Chen L., Doolittle L.K., Finkelstein I., Narlikar G.J., Gerlich D.W., Rosen M.K. In diverse conditions, intrinsic chromatin condensates have liquid-like material properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2023;120(18):e2218085120.
16. Zidovska A. Chromatin: Liquid or solid? *Cell.* 2020;183(7):1737–1739.
17. Maeshima K., Rogge R., Tamura S., Joti Y., Hikima T., Szerlong H., Krause C., Herman J., Seidel E., DeLuca J., Ishikawa T., Hansen J.C. Nucleosomal arrays self-assemble into supramolecular globular structures lacking 30-nm fibers. *EMBO J.* 2016;35(10):1115–1132.
18. Farr S.E., Woods E.J., Joseph J.A., Garaizar A., Collepardo-Guevara R. Nucleosome plasticity is a critical element of chromatin liquid-liquid phase separation and multivalent nucleosome interactions. *Nat. Commun.* 2021;12(1):2883.
19. Miron E., Oldenkamp R., Brown J.M., Pinto D.M.S., Xu C.S., Faria A.R., Shaban H.A., Rhodes J.D.P., Innocent C., de Ornellas S., Hess H.F., Buckle V., Schermelleh L. Chromatin arranges in chains of mesoscale domains with nanoscale functional topography independent of cohesin. *Sci. Adv.* 2020;6(39):eaba8811.
20. Watson M., Stott K. Disordered domains in chromatin-binding proteins. *Essays Biochem.* 2019;63(1):147–156.
21. Dias J.K., D'Arcy S. Beyond the mono-nucleosome. *Biochem. Soc. Trans.* 2025;53(1):BCJ20240452.
22. Li W., Hu J., Song F., et al. Structural basis for linker histone H5-nucleosome binding and chromatin fiber compaction. *Cell Res.* 2024;34(10):707–724.
23. Thåström A., Lowary P.T., Widlund H.R., Cao H., Kubista M., Widom J. Sequence motifs and free energies of selected natural and non-natural nucleosome positioning DNA sequences. *J. Mol. Biol.* 1999;288(2):213–229.
24. Polikanov Y.S., Studitsky V.M. Analysis of distant communication on defined chromatin templates *in vitro*. *DNA-Protein Interactions. Methods in Molecular Biology*, vol. 543. Eds. B. Leblanc and T. Moss. Humana Press; 2009:563–576.
25. Luger K., Rechsteiner T.J., Richmond T.J. Preparation of nucleosome core particle from recombinant histones. *Chromatin. Methods in Enzymology*, vol. 304. Academic Press; 1999:3–19.
26. Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Bondarenko V.A., Studitsky V.M. Preparation and analysis of uniquely positioned Mononucleosomes. *Chromatin Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol. 523. Ed. S.P. Chellappan. Totowa: Humana Press; 2009:109–123.
27. Yaminsky I., Akhmetova A., Meshkov G. Femtoscan online software and visualization of nano-objects in high-resolution microscopy. *NanoRus.* 2018;(6):414–416.
28. Utley R.T., Owen-Hughes T.A., Juan L.J., Côté J., Adams C.C., Workman J.L. *In vitro* analysis of transcription factor binding to nucleosomes and nucleosome disruption/displacement. *RNA Polymerase and Associated Factors, Part B. Methods in Enzymology*, vol. 274. Ed. S. Adhya. Academic Press; 1996:274:276–291.
29. Moreno-Herrero F., Colchero J., Baró A.M. DNA height in scanning force microscopy. *Ultramicroscopy.* 2003;96(2):167–174.
30. Krzemien K.M., Beckers M., Quack S., Michaelis J. Atomic force microscopy of chromatin arrays reveal non-monotonic salt dependence of array compaction in solution. *PLoS One.* 2017;12(3):e0173459.
31. Nazarov I., Chekharova I., Rychkov G., Ilatovskiy A.V., Crane-Robinson C., Tomilin A. AFM studies in diverse ionic environments of nucleosomes reconstituted on the 601 positioning sequence. *Biochimie.* 2016;121:5–12.
32. Leuba S.H., Yang G., Robert C., Samori B., Van Holde K., Zlatanova J., Bustamante C. Three-dimensional structure of extended chromatin fibers as revealed by tapping-mode scanning force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994;91(24):11621–11625.
33. Klinov D.V., Neretina T.V., Prokhorov V.V., Dobrynina T.V., Aldarov K.G., Demin V.V. High-resolution atomic force microscopy of DNA. *Biochemistry (Mosc).* 2009;74(10):1150–1154.
34. Chen X., Roberts C.J., Zhang J., Davies M.C., Tendler S.J.B. Phase contrast and attraction–repulsion transition in tapping mode atomic force microscopy. *Surface Science.* 2002;519(1–2):L593–L598.
35. Dubrovin E.V., Schächtele M., Schäffer T.E. Nanotemplate-directed DNA segmental thermal motion. *RSC Adv.* 2016;6(83):79584–79592.
36. Hizume K., Yoshimura S.H., Takeyasu K. Atomic force microscopy demonstrates a critical role of DNA superhelicity in nucleosome dynamics. *Cell Biochem. Biophys.* 2004;40(3):249–262.

Поступила в редакцию 30.06.2025

После доработки 05.08.2025

Принята в печать 13.08.2025

RESEARCH ARTICLE

Visualization of artificial polynucleosomal constructs with atomic force microscopy

A.V. Lyubitelev^{1,*} , D. V. Bagrov¹ , O. V. Geraskina² , V. M. Studitsky^{1,3} 

¹Bioengineering Department, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskiye Gory, Moscow, 119234, Russia;

²Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 34/5 Vavilov Str., Moscow, 119334, Russia

³Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Ave., Philadelphia, Pennsylvania, 19111, USA

*e-mail: varanus-salvator@yandex.ru

Genetic material of the cell in interphase nucleus is present in a form of a dense DNA-protein structure named chromatin. Structure and dynamics of single nucleosome, which is the basic unit of DNA compactization, is currently well-studied, although the data about the structural

and functional organization of higher-level chromatin folding, is still scarce. In the present work, a method of visualization of polynucleosomal constructs using atomic force microscopy is proposed. Polynucleosome assembly on a plasmid with the use of recombinant histone octamers was demonstrated. It was established that glutaraldehyde treatment of polynucleosome sample before its immobilization on a surface preserves nucleosomes, and their height and width corresponds well with previously obtained data. Plasmids themselves were predominantly in extended conformation, which may help studying DNA-protein interactions.

Keywords: *chromatin, nucleosome, DNA-protein complexes, atomic force microscopy*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project no. 21-64-00001P.

Сведения об авторах

Любителиев Александр Викторович — вед. инж. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-939-57-38; e-mail: varanus-salvator@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0768-9309>

Багров Дмитрий Владимирович — канд. физ.-мат. наук., вед. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: dbagrov@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6355-7282>

Гераськина Ольга Вячеславовна — мл. науч. сотр. Института биологии гена РАН. Тел.: 8-499-135-60-89; e-mail: olgsamsonova@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1624-7054>

Студитский Василий Михайлович — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-939-57-38; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7389-7993>