

## МЕТОДЫ

УДК 577.21

**ИЗМЕНЕНИЕ КОНФОРМАЦИИ ЛИНКЕРНОЙ ДНК ПРИ СВЯЗЫВАНИИ ГИСТОНА H1.5 С НУКЛЕОСОМОЙ: ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ ОДИНОЧНЫХ КОМПЛЕКСОВ****А.В. Любителев<sup>1</sup>, К.С. Кудряшова<sup>1,2</sup>, М.С. Михайлова<sup>1</sup>, Н.В. Малюченко<sup>1</sup>,  
О.В. Чертков<sup>1,2</sup>, В.М. Студитский<sup>1,3,\*</sup>, А.В. Феофанов<sup>1,2</sup>, М.П. Кирпичников<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, РАН; Россия, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10;

<sup>3</sup> лаборатория эпигенетики рака, Центр исследований рака Фокс Чейз; США, штат Пенсильвания, 19111, г. Филадельфия, просп. Коттмана, д. 333

\* e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu

Разработана методика синтеза флуоресцентно-меченой ДНК для сборки мононуклеосом с ДНК-линкерами длиной 40 пар нуклеотидов (п.н.). Метки Су3 и Су5 введены в линкеры на расстояниях соответственно 10 п.н. до первого и 15 п.н. после последнего нуклеотида нуклеосом-позиционирующей последовательности ДНК. В отсутствие линкерного гистона H1.5 исследование методом флуоресцентной микроскопии одиночных комплексов выявило наличие двух равновероятных состояний нуклеосом, отличающихся конформацией ДНК-линкеров: открытой — с эффективностью переноса энергии E между метками, равной 0,06, и закрытой — с E = 0,37, где линкеры сближены. Связывание гистона H1.5 с нуклеосомами происходит в наномолярном диапазоне концентраций, и скорость образования комплексов существенно выше, чем скорость их диссоциации. В комплексах происходит значительное сближение линкеров (E = 0,73), а их конформация в области меток становится более единообразной. Разработанные нуклеосомные конструкторы являются высокочувствительными флуоресцентными сенсорами для анализа структурных перестроек линкеров и в комбинации с методом микроскопии одиночных комплексов позволяют изучать структуру комплексов нуклеосом с различными архитектурными белками хроматина.

**Ключевые слова:** хроматин, нуклеосома, линкерный гистон H1, флуоресценция, микроскопия, одиночная молекула.

Эффект Фёрстеровского резонансного переноса энергии (Förster resonance energy transfer, FRET) широко используется в биологических исследованиях флуоресцентно-меченых молекул для изучения структурных перестроек биополимеров и межмолекулярных взаимодействий [1–3]. В комбинации с методом флуоресцентной микроскопии одиночных молекул и комплексов FRET позволяет изучать сложные молекулярные системы, в которых присутствуют несколько отличающихся по структуре состояний, и выявлять эти состояния, скрытые в традиционных измерениях, основанных на усреднении флуоресценции множества молекул [4–6]. Данный подход все активнее применяется в нуклеосомных исследованиях [6–13], а его результативность и спектр решаемых задач в значительной мере зависят от оптимального расположения донор-акцепторной пары флуорофоров в изучаемой молекулярной системе. Например, введение меток Су3 и Су5 в соседние сверхспиральные витки ДНК в центральной [11] или дистальной от промотора [7, 9] областях нуклеосомного ядра позволяет изучать

структурные перестройки ДНК в этих областях при транскрипции хроматина РНК-полимеразой.

Не менее важными функциональными участками, вовлеченными в процессы организации хроматина и транскрипции нуклеосом, являются межнуклеосомные области ДНК-линкеры. Именно с ними взаимодействуют линкерные гистоны, способствуя упаковке нуклеосом в структуры более высокого порядка, а также некоторые факторы, регулирующие транскрипцию. Применение рентгеноструктурного анализа и спектроскопии ЯМР для изучения взаимодействия H1/H5 с нуклеосомой затруднено из-за большого молекулярного веса комплекса и низкой структурированности области взаимодействия. В проведенных ранее исследованиях установлено, что связывание H1/H5 защищает от воздействия гидроксид-радикалов область протяженностью более 15 нуклеотидов [14] и существенно изменяет конформацию линкеров, фиксируя их [15, 16]. Расшифровка структурных основ взаимодействия линкерных гистонов с нуклеосомой позволит прояснить целый ряд важных вопро-

сов — от принципов организации хроматина до механизмов регуляции раннего эмбрионального развития.

В настоящей статье представлены данные о разработке флуоресцентных нуклеосом для изучения конформации линкеров с помощью микроскопии одиночных комплексов и результаты исследования этих нуклеосом, а также их комплексов с гистонем Н1.5 человека.

### Материалы и методы

В работе использовали реагенты, описание которых дано в работах [7, 9, 11, 17]. Хроматин без гистона Н1 выделяли из эритроцитов цыплят по методике, описанной ранее [17], и использовали как источник гистонов при сборке нуклеосом. ДНК-матрицу с позиционирующей последовательностью 603 (147 пар нуклеотидов, (п.н.)) получали при помощи двухстадийной полимеразной цепной реакции (ПЦР). На первой стадии ПЦР выполняли с укороченными праймерами, используя в качестве матрицы плазмиду рDS1 со вставкой последовательности 603 по сайтам рестрикции XhoI и SacI. Праймеры были комплементарны концевым фрагментам последовательности 603 и имели следующие последовательности:

5'-CACCGGCACGAGGGCCCGGTTTC-3';

5'-ACTTTCTGGCAAGAAAATGAGCT-3'.

ПЦР-продукт длиной 180 п.н. был очищен при помощи электрофореза (4–6 В/см, 2 ч) в 2%-ном агарозном геле на 0,5-кратном трис-боратном электродном буфере (ТВЕ — 44,5 мМ Трис, 44,5 мМ борная кислота, 1 мМ ЭДТА), содержащем 0,5 мг/мл бромистого этидия. Выделение ДНК осуществляли с помощью набора для экстракции ДНК из геля E.Z.N.A.<sup>®</sup> Gel Extraction Kit (Omega Biotek), следуя инструкциям производителя. ДНК (180 п.н.) служила матрицей для второй стадии ПЦР с праймерами, идентичными флуоресцентно меченым (см. ниже), но без меток. ПЦР-продукт (227 п.н.) был очищен, как описано выше, а отсутствие в нем ошибок подтверждено секвенированием с использованием праймеров длиной 38 п.н. Далее ДНК (227 п.н.) была использована как матрица для ПЦР со следующими флуоресцентно мечеными по тимидину олигонуклеотидами (“Синтол”, Россия) в качестве праймеров:

5'-TAAGGCGAATTCACAACCTTTTGGCT<sup>Cy5</sup>AGA  
AAATGAGCT-3';

5'-ACACGGCGCACTGCCAACCCAAACGACACC  
T<sup>Cy3</sup>GACGAG-3'.

Конечный продукт реакции выделяли, как описано выше. Включение меток в состав ДНК подтверждали при помощи электрофореза в 4,5%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) при соотношении акриламид:бисакриламид 39:1 в нативных условиях и флуоресцентного анализа геля с помощью ска-

нера Typhoon (GE Healthcare) в диапазонах возбуждения и эмиссии, характерных для Cy3 и Cy5.

Нуклеосомы собирали на (Cy3, Cy5)-меченой ДНК-матрице в ходе диализа против растворов с последовательно уменьшающейся концентрацией NaCl по протоколу, описанному в работе [17]. Сборку нуклеосом (>97%) контролировали методом электрофореза в 4,5%-ном ПААГ (ненатурные условия, 0,5-кратный буфер ТВЕ) по флуоресценции Cy3 в составе ДНК (рисунок, Б).

Полноразмерный рекомбинантный гистон Н1.5 человека был получен в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3)PlysS (Promega), любезно предоставленных проф. Димитровым [18]. Клетки выращивали в жидкой среде Лурия-Бертани в течение 3 ч, производили индукцию при помощи изопропил-бета-D-тиогалактопиранозид, ИПТГ, (0,1 мМ) и инкубировали далее 3 ч при 37°C. Биомассу бактерий осаждали центрифугированием при 5500 g в течение 15 мин, ресуспендировали в 50 мл буфера А (20 мМ Tris-HCl pH7,4, 100 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотреитол, 10%-ный глицерин) с добавкой ингибиторов протеаз и разрушали ультразвуковой обработкой. Полученную суспензию центрифугировали при 21500 g в течение 30 мин при 4°C. Гистон Н1.5 выделяли из супернатанта методом ионообменной хроматографии на колонке с фосфоцеллюлозой P11. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд, а чистоту (>95%) подтверждали с помощью денатурирующего электрофореза в 12 %-ном ПААГ.

Нуклеосомы (20 нМ) смешивали с гистонем Н1.5 (5–20 нМ) в буфере для транскрипции (ТБ-буфер), содержащем 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ 2-меркаптоэтанол и 150 мМ KCl, после чего инкубировали 15–20 мин при 37°C. (Cy3, Cy5)-меченую ДНК-матрицу, нуклеосомы или их комплексы с Н1.5 разбавляли до концентрации 0,2 нМ в ТБ-буфере с добавкой 0,1%-ного полиэтиленгликоля (380–420 Да) и переносили в лунку камеры Lab-Tek (Thermo Scientific, США) для анализа под микроскопом.

Измерения одиночных нуклеосом (и их комплексов) проводили методом двухканальной лазерной конфокальной микроскопии, используя установку, описанную в работах [7, 9, 11]. Одиночные нуклеосомы диффундировали через фокус лазерного луча, где для каждой из них измеряли интенсивности флуоресценции Cy3 (I<sub>3</sub>) и Cy5 (I<sub>5</sub>). Флуоресценцию возбуждали светом с длиной волны 514,5 нм (2 мкВт под объективом), а регистрировали в диапазонах 530–635 нм (Cy3) и 635–800 нм (Cy5) с константой интегрирования 5 мс. Диаметр конфокальной диафрагмы соответствовал 1 диску Эйри. Измерения выполняли в течение 10 мин, а величина выборки составляла 4000–6000 нуклеосом. Стабильность образцов во времени измеряли в течение 30 мин, анализируя выборки данных из последовательных пятиминутных интервалов. Алгоритм распознавания и обработки сигналов от-

дельных нуклеосом описан в работах [7, 9, 11]. Для каждой нуклеосомы по значениям  $I_3$  и  $I_5$  рассчитывали эффективность FRET (E):

$$E = (I_5 - 0,19 \times I_3) / (I_5 + 0,81 \times I_3), \quad (1)$$

где коэффициенты 0,19 и 0,81 введены для учета перекрывания спектров флуоресценции  $Su3$  и  $Su5$  в области 635–800 нм. Набор значений E, полученных в трех независимых измерениях, объединяли, графически представляли в виде гистограммы относительной частоты распределения величины E и описывали в виде суперпозиции полос Гауссовой формы. Итоговый размер выборок составил не менее 15000 нуклеосом.

### Результаты и обсуждение

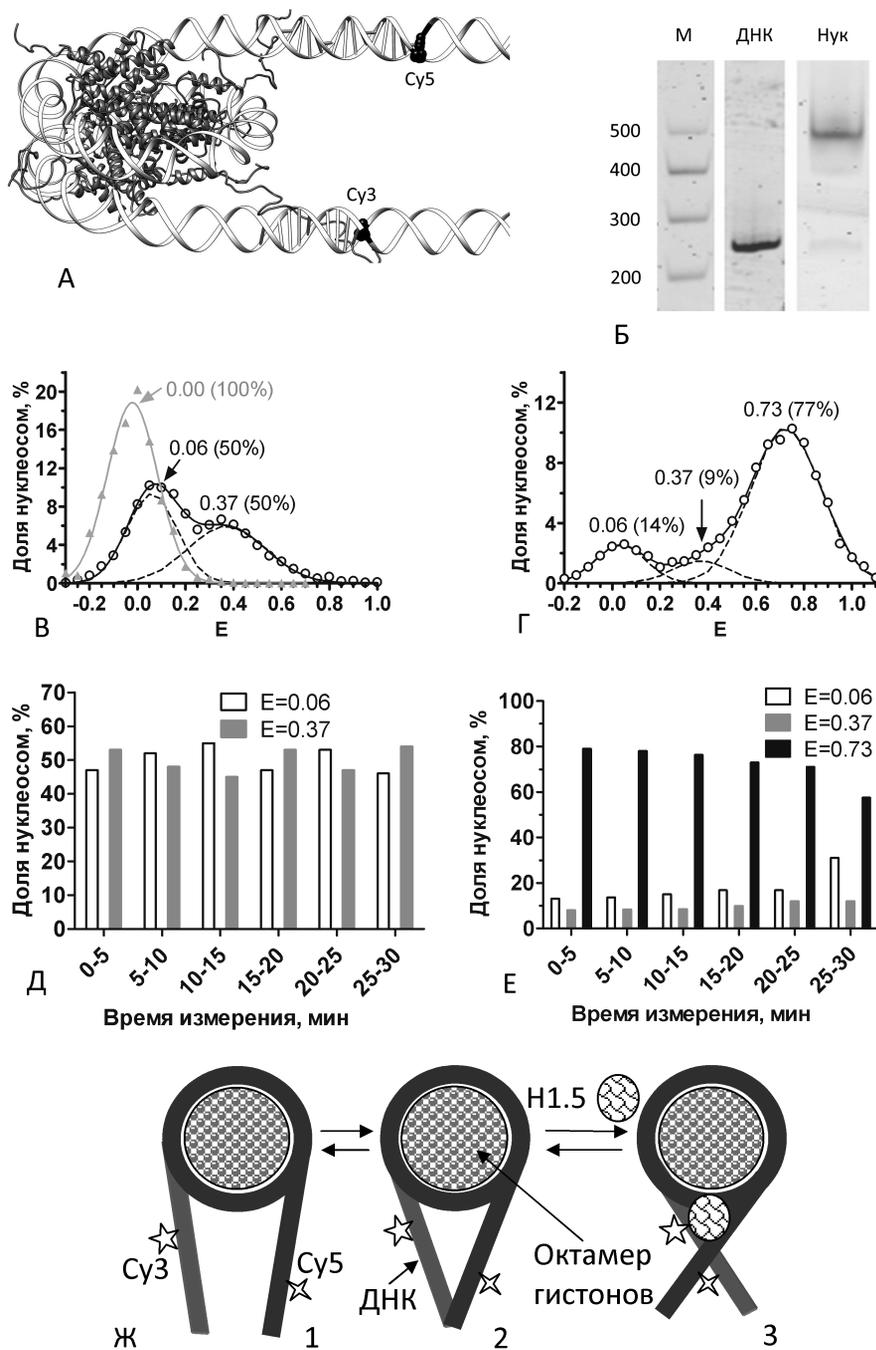
При разработке нуклеосом, меченых по линкерной ДНК, были учтены данные методов футпринтинга [18], криоэлектронной микроскопии [11, 20], молекулярного моделирования [21, 22] и рентгеноструктурного анализа [23], согласно которым глобулярный домен Н1 связывается в области входа и выхода ДНК из ядра нуклеосомы, фиксируя при этом участок, как минимум, одного из линкеров длиной 10–15 п.н. [15, 18, 23]. Существующие модели комплексов нуклеосомы с Н1 предсказывают значительное сближение участков линкеров, отстоящих от ядра нуклеосомы на 10–15 п.н. При выборе положения флуоресцентных меток  $Su3$  и  $Su5$  в линкерных участках ДНК ставилась задача соблюсти следующие условия. Метки должны находиться вне области предполагаемого связывания глобулярного домена гистона Н1, чтобы исключить их влияние на комплексообразование, а также избежать тушения флуоресценции или ограничения подвижности флуорофоров, влияющих на эффективность FRET. Эффективность FRET должна быть ненулевой при максимальном удалении линкеров друг от друга и значительно возрастать при их сближении. С учетом результатов молекулярного моделирования метка  $Su3$  была размещена на расстоянии 10 п.н. до первого нуклеотида (рисунок, А), а  $Su5$  — на расстоянии 15 п.н. после последнего нуклеотида позиционирующей последовательности ДНК-матрицы 603. При этом длина линкеров, выходящих за пределы ядра нуклеосомы, составила 40 п.н. Были подобраны условия, при которых эффективность сборки нуклеосом достигала >97% (рисунок, Б).

Измерения одиночных нуклеосом в разбавленных растворах, проведенные с помощью конфокальной микроскопии по методике, описанной ранее [7, 9, 11], выявили, что нуклеосомы гетерогенны по величине FRET (E) и могут быть описаны суммой двух нормальных распределений (состояний) с максимумами E, равными 0,06 и 0,37 (рисунок, В). Доли нуклеосом, находящихся в этих состояниях, примерно равны и не меняются во времени (рисунок, В, Д). Следовательно, состояние с  $E = 0,06$  не является результатом появления свободной ДНК

из-за диссоциации нуклеосом в разбавленном растворе. Данный вывод дополнительно подтвержден измерением распределения свободной флуоресцентно-меченой ДНК по величине E, которое достоверно отличается от состояния нуклеосом с  $E = 0,06$  и имеет максимум, равный 0,00 (рисунок, В). В свободной двухцепочечной ДНК метки  $Su3$  и  $Su5$  находятся далеко друг от друга, и FRET между ними не наблюдается. Состояние с  $E = 0,06$  не связано с тушением флуоресценции  $Su5$  или переходом  $Su5$  в долгоживущее триплетное состояние, так как в аналогичных измерениях нуклеосом с метками, введенными в области ядра близко друг к другу, доля нуклеосом с  $E = 0,0–0,2$  не превышает 3–5% [7, 9, 11].

Обнаруженное распределение (рисунок, В) соответствует двум состояниям нуклеосом, отличающимся по конформации линкеров. У нуклеосом в состоянии с  $E = 0,06$  метки  $Su3$  и  $Su5$  больше удалены друг от друга и линкеры сильнее отведены от ядра нуклеосомы, по сравнению с нуклеосомами в состоянии с  $E = 0,37$  (состояния 1 и 2 на рисунке, Ж). Электростатическое отталкивание полианионных линкеров способствует переходу в состояние с  $E = 0,06$ , а образование линкерами связей с положительно заряженными гистонами в области выхода ДНК из ядра нуклеосомы благоприятно для состояния с  $E = 0,37$ . При этом взаимодействие с противоionsами в солевых растворах способствует стабилизации нуклеосомы в одном из возможных состояний. Более открытая конформация линкеров, очевидно, облегчает взаимодействие нуклеосом с факторами (такими, как РНК-полимераза), функционирование которых требует откручивания ДНК от нуклеосомы. Сближенная конформация линкеров способствует связыванию факторов, которые взаимодействуют сразу с обоими линкерами, вызывают компактизацию нуклеосомы и препятствуют откручиванию ДНК.

К последним факторам можно отнести линкерный гистон Н1 и, в частности, его вариант Н1.5. Обнаружено, что образование комплекса Н1.5 с нуклеосомой сопровождается появлением нового состояния, максимум распределения по величине E у которого равен 0,73 (рисунок, Г). По мере увеличения концентрации гистона Н1.5 от 5 до 20 нМ доля нуклеосом в состояниях с  $E = 0,06$  и  $E = 0,37$  снижается, а доля нуклеосом с  $E = 0,73$  растет. При этом комплексы формируются за времена менее 10 мин (данные не показаны). Зарегистрировать полный переход нуклеосом в состояние с  $E = 0,73$  затруднительно из-за резкого усиления их агрегации при дальнейшем повышении концентрации Н1.5. Агрегация нуклеосом происходит под действием и других вариантов гистона Н1 [24]. Комплексы нуклеосом с Н1.5 мы исследовали при концентрации, в 100 раз меньшей, чем при их формировании. В этих условиях происходит медленная диссоциация комплексов, которая детектируется, начиная с 15 мин после разбавления комплексов, по умень-



**Рисунок.** А — Модель нуклеосомы с линкерами длиной 40 п.н. с положением меток Cy3 и Cy5 на линкерах. Б — Электрофореграммы свободной ДНК (средняя дорожка) и нуклеосом (правая дорожка), собранных на ее основе. Разделение проводили в 4,5%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) в неденатурирующих условиях. Детекция по флуоресценции Cy3 в составе ДНК; М — флуоресцеин-меченые маркеры ДНК и их размеры в п.н. В — Частотные распределения по величине E свободной ДНК (серая линия, треугольники) и нуклеосом (черная линия, кружки). Г — Частотное распределение по величине E комплексов нуклеосом с H1.5 (непрерывная линия, кружки) при молярном соотношении H1.5/нуклеосомы, равном 0,85. Прерывистые линии (В, Г) — разложения частотных распределений на сумму Гауссовых полос. Цифрами указаны максимумы этих полос и доля нуклеосом (в скобках), соответствующих каждой полосе. Д, Е — Зависимость от времени содержания нуклеосом в каждой из Гауссовых полос, на которые разложены измеренные частотные распределения, для образцов свободных нуклеосом (Д) и их комплексов с H1.5 (Е). Ж — модели конформаций линкеров в двух состояниях (1, 2) свободных нуклеосом и в комплексе с H1.5 (3). Звездочками обозначены положения на линкерах меток Cy3 и Cy5

шению доли нуклеосом с  $E = 0,73$  и возрастанию содержания нуклеосом с  $E = 0,06$  и  $E = 0,37$  (рисунок, Е). Наши исследования показали, что образование комплексов нуклеосом с H1.5 происходит в наномолярном диапазоне концентраций и скорость этого процесса существенно выше, чем ско-

рость диссоциации. Большая величина параметра E указывает на то, что в комплексах с H1.5 происходит значительное сближение линкеров (состояние 3 на рисунке, Ж), а нормальное распределение E свидетельствует, что комплексы единообразны по конформации линкеров в области положения меток.

Таким образом, проведенные исследования показали, что разработанные нами нуклеосомы с метками в области линкеров являются высокочувствительными флуоресцентными сенсорами для анализа структурных перестроек линкерных участков. Меченые нуклеосомы и метод микроскопии одиночных комплексов являются новым удобным инструментом для изучения влияния на структуру нуклеосомы различных архитектурных белков хро-

матина, а также особенностей процесса сборки хроматина.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 14-24-00031). Авторы благодарят проф. С. Димитрова за предоставление штамма-продуцента гистона H1.5 и Г. Армеева за полезные обсуждения данных моделирования.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shrestha D., Jenei A., Nagy P., Vereb G., Szöllösi J. Understanding FRET as a research tool for cellular studies // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. Vol. 16. N 4. P. 6718–6756.
2. Sustarsic M.K. Taking the ruler to the jungle: single-molecule FRET for understanding biomolecular structure and dynamics in live cells // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2015. Vol. 18. P. 52–59.
3. Arai Y.N. Extensive use of FRET in biological imaging // *Microscopy (Oxf)*. 2013. Vol. 62. P. 419–428.
4. Sugawa M.A., Iwane A.H., Ishii Y., Yanagida T. Single molecule FRET for the study on structural dynamics of biomolecules // *Biosystems*. 2007. Vol. 88. N 3. P. 243–250.
5. Lee W., Obubuafo A., Lee Y.I., Davis L.M., Soper S.A. Single-pair fluorescence resonance energy transfer (spFRET) for the high sensitivity analysis of low-abundance proteins using aptamers as molecular recognition elements // *J. Fluoresc.* 2010. Vol. 20. N 1. P. 203–213.
6. Gansen A., Tóth K., Schwarz N., Langowski J. Structural variability of nucleosomes detected by single-pair Förster resonance energy transfer: histone acetylation, sequence variation, and salt effects // *J. Phys. Chem. B*. 2009. Vol. 113. N 9. P. 2604–2613.
7. 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 Mol. Biol.* 2015. Vol. 1288. P. 395–412.
8. Ngo T.T., Ha T. Nucleosomes undergo slow spontaneous gaping // *Nucleic Acids Res.* 2015. Vol. 43. N 8. P. 3964–3971.
9. Feofanov A.V., Kudryashova K.S., Chertkov O.V., Nikitin D.V., Pestov N.A., Kulaeva O.I., Studitsky V.M., Kirpichnikov M.P. Analysis of nucleosome transcription using single-particle FRET // *Springer Proc. Phys.* 2015. Vol. 164. P. 255–260.
10. Ngo T.T., Zhang Q., Zhou R., Yodh J.G., Ha T. Asymmetric unwrapping of nucleosomes under tension directed by DNA local flexibility // *Cell*. 2015. Vol. 160. N 6. P. 1135–1144.
11. Kudryashova K.S., Nikitin D.V., Chertkov O.V., Gerasimova N.S., Valieva M.E., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Development of fluorescently labeled mononucleosomes for the investigation of transcription mechanisms by single complex microscopy // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2015. Vol. 70. N 4. P. 189–193.
12. Luo Y., North J.A., Poirier M.G. Single molecule fluorescence methodologies for investigating transcription factor binding kinetics to nucleosomes and DNA // *Methods*. 2014. Vol. 70. N 2–3. P. 108–118.
13. Simon M.N., Shimko J.C., Forties R.A., Ferdinand M.B., Manohar M., Zhang M., Fishel, R., Ottesen J.J., Poirier M.G. Histone fold modifications control nucleosome unwrapping and disassembly // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. Vol. 108. N 31. P. 12711–12716.
14. Syed S.H., Goutte-Gattat D., Becker N., Meyer S., Shukla M.S., Hayes J.J., Everaers R., Angelov D., Bednar J., Dimitrov S. Single-base resolution mapping of H1-nucleosome interactions and 3D organization of the nucleosome // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. Vol. 107. N 21. P. 9620–9625.
15. Meyer S. B., Syed S.H., Goutte-Gattat D., Shukla M.S., Hayes J.J., Angelov D., Bednar J., Dimitrov S., Everaers R. From crystal and NMR structures, footprints and cryo-electron-micrographs to large and soft structures: nanoscale modeling of the nucleosomal stem // *Nucleic Acids Res.* 2011. Vol. 39. P. 9139–9154.
16. Zhou B.R., Feng H., Kato H., Dai L., Yang Y., Zhou Y., Bai Y. Structural insights into the histone H1-nucleosome complex // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. Vol. 110. N 48. P. 19390–19395.
17. Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Bondarenko V.A., Studitsky V.M. Preparation and analysis of uniquely positioned mononucleosomes // *Methods Mol. Biol.* 2009. Vol. 523. P. 109–123.
18. Syed S.H., Goutte-Gattat D., Becker N., Meyer S., Shukla M.S., Hayes J.J., Everaers R., Angelov D., Bednar J., Dimitrov S. Single-base resolution mapping of H1-nucleosome interactions and 3D organization of the nucleosome // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. Vol. 107. N 21. P. 9620–9625.
19. Meyer S., Becker N.B., Syed S.H., Goutte-Gattat D., Shukla M.S., Hayes J.J., Angelov D., Bednar J., Dimitrov S., Everaers R. From crystal and NMR structures, footprints and cryo-electron-micrographs to large and soft structures: nanoscale modeling of the nucleosomal stem // *Nucleic Acids Res.* 2011. Vol. 39. N 21. P. 9139–9154.
20. Song F., Chen P., Sun D., Wang M., Dong L., Liang D., Xu R.M., Zhu P., Li G. Cryo-EM study of the chromatin fiber reveals a double helix twisted by tetranucleosomal units // *Science*. 2014. Vol. 344. N 6182. P. 376–380.
21. Fan L., Roberts V.A. Complex of linker histone H5 with the nucleosome and its implications for chromatin packing // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. Vol. 103. N 22. P. 8384–8289.
22. Cui F., Zhurkin V.B. Distinctive sequence patterns in metazoan and yeast nucleosomes: implications for linker histone binding to AT-rich and methylated DNA // *Nucleic Acids Res.* 2009. Vol. 37. N 9. P. 2818–2829.
23. Zhou B.R., Jiang J., Feng H., Ghirlando R., Xiao T.S., Bai Y. Structural mechanisms of nucleosome recognition by linker histones // *Mol. Cell*. 2015. Vol. 59. N 4. P. 628–638.
24. Bernier M., Luo Y., Nwokelo K.C., Goodwin M., Dreher S.J., Zhang P., Parthun M.R., Fondufe-Mittendorf Y., Ottesen J.J., Poirier M.G. Linker histone H1 and H3K56 acetylation are antagonistic regulators of nucleosome dynamics // *Nat. Commun.* 2015. Vol. 6. P. 10152.

## CHANGE IN CONFORMATION OF LINKER DNA UPON BINDING OF HISTONE H1.5 TO NUCLEOSOME: FLUORESCENT MICROSCOPY OF SINGLE COMPLEXES

*A.V. Lyubitelev<sup>1</sup>, K.S. Kudryashova<sup>1,2</sup>, M.S. Mikhaylova<sup>1</sup>, N.V. Malyuchenko<sup>1</sup>, O.V. Chertkov<sup>1,2</sup>, V.M. Studitsky<sup>1,3,\*</sup>, A.V. Feofanov<sup>1,2</sup>, M.P. Kirpichnikov<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> *Bioengineering Department, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;*

<sup>2</sup> *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Miklukho-Maklaya ul. 16/10, 117997, Moscow, Russia;*

<sup>3</sup> *Cancer Epigenetics Program Team, Fox Chase Cancer Center; Cottman Avenue 333, Philadelphia, PA 19111, USA*

\* *e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu*

The method of synthesis of fluorescently labeled DNA allowing assembly of mononucleosomes with 40 bp linkers was developed. Cy3 and Cy5 labels were introduced in the linkers at distances of 10 bp before the first and 15 bp after the last nucleotide of the nucleosome positioning DNA sequence, respectively. In the absence of histone H1.5 fluorescence microscopy of single complexes revealed the presence of two equally probable states of nucleosomes, differing in the conformation of linkers: open one with the energy transfer efficiency  $E$  between the labels being equal to 0.06 and closed one with  $E = 0.37$ . Binding of histone H1.5 with nucleosomes occurs in nanomolar range of concentrations, and the rate of complex formation is significantly higher than the dissociation rate. In the complexes, significant convergence of DNA linkers ( $E = 0.73$ ) takes place, and their conformation in the region of labels becomes more uniform. Designed nucleosomal constructs are highly sensitive fluorescent sensors for the analysis of structural rearrangements of linkers and in combination with microscopy of single complexes allow studying the structure of complexes of nucleosomes with different chromatin architectural proteins.

**Keywords:** *chromatin, nucleosome, linker histone H1, fluorescence, microscopy, single molecule.*

### Сведения об авторах:

*Любителив Александр Викторович* — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: varanus-salvator@yandex.ru

*Малюченко Наталия Валериевна* — канд. биол. наук, доцент кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-00-05; e-mail: mal\_nat@mail.ru

*Михайлова Мария Сергеевна* — студент кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: mashkuna@yandex.ru

*Кудряшова Ксения Сергеевна* — канд. биол. наук, мл. науч. сотр. ИБХ РАН, вед. инженер кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-336-64-55; e-mail: rekamoskva@mail.ru

*Чертков Олег Валерьевич* — вед. инженер кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: o\_chertkov@mail.ru

*Феофанов Алексей Валерьевич* — докт. биол. наук, руководитель лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-336-64-55; e-mail: avfeofanov@yandex.ru

*Студитский Василий Михайлович* — докт. биол. наук, гл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ; руководитель лаборатории эпигенетики рака Центра исследований рака Фокс Чейз (Филадельфия, США). Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu

*Кирпичников Михаил Петрович* — академик РАН, проф., докт. биол. наук, декан, зав. кафедрой биоинженерии биологического факультета МГУ, заведующий отделом биоинженерии ИБХ РАН. Тел.: 8-495-939-27-76; e-mail: kirpichnikov@inbox.ru