

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.2:577.32

### S-ФОРМА ДНК – СУПЕРСПИРАЛЬНАЯ ДНК С 1.94–2.19 Å РАССТОЯНИЕМ МЕЖДУ ПАРАМИ ОСНОВАНИЙ ВДОЛЬ ОСИ ДУПЛЕКСА

© 2006 г. Л. А. Лиманская<sup>1</sup>, А. П. Лиманский<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова академии медицинских наук Украины,  
Харьков, Украина, 61057

<sup>2</sup>Laboratory of Plasma Membrane and Nuclear Signaling, Graduate School of Biostudies,  
Kyoto University, Kyoto, 606–8502, Japan

Поступила в редакцию 13.05.2005 г.

Суперспиральная ДНК pGEMEX длиной 3993 п.н., иммобилизованная на четырех субстратах (свежесколотой слюде, стандартной аминокслюде, модифицированной аминокслюде с повышенной и пониженной поверхностной плотностью заряда по сравнению со стандартной аминокслюдой), визуализирована посредством атомносиловой микроскопии (АСМ) в воздухе. На модифицированной аминокслюде, характеризующейся повышенной поверхностной плотностью заряда, визуализированы как плектономичные молекулы суперспиральной ДНК, так и единичные молекулы с чрезвычайно высоким уровнем компактизации, степень суперспирализации которых значительно выше по сравнению с ранее достигнутыми экспериментально и рассмотренными теоретически. Измерение контурной длины этих единичных сверхсуперспиральных молекул ДНК непосредственно из АСМ-изображений позволило определить расстояние между парами нуклеотидов вдоль оси двойной спирали, которое изменялось от 1.94 до 2.19 Å. Такие сжатые, подобно пружине, суперспиральные молекулы ДНК с уменьшенным межнуклеотидным расстоянием по сравнению с известными формами ДНК были отнесены к новой форме ДНК – S-ДНК. Построена модель молекул S-ДНК, которые, как предполагают авторы, могут являться промежуточным этапом при компактизации единичных суперспиральных молекул ДНК до уровня сфероидов и минитороидов. Наши результаты показывают, что сверхсуперспирализация с последующим сжатием суперспиральных молекул ДНК обусловлена высокой поверхностной плотностью заряда аминокслюды, на которой иммобилизованы молекулы ДНК.

*Ключевые слова:* суперспиральная ДНК, атомносиловая микроскопия (АСМ), аминокслюда, S-ДНК, сверхсуперспирализация.

S-DNA IS OVERSUPERCOILED DNA WITH 1.94–2.19 Å RISE PER BASE PAIR, by L. A. Limanskaya<sup>1</sup>, A. P. Limanskiy<sup>1,2,\*</sup> (<sup>1</sup>Institute of Microbiology and Immunology of UAMS, Kharkov, 61057 Ukraine, \*e-mail: o.lymunskiy@mail.ru; <sup>2</sup>Laboratory of Plasma Membrane and Nuclear Signaling, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kyoto, 606–8502, Japan). Supercoiled pGEMEX DNA with length of 3993 nucleotides was immobilized on four substrates (freshly cleaved mica, standard amino mica, modified amino mica with increased and decreased surface charge density compared with standard amino mica) and it was visualized by atomic force microscopy (AFM) in air. Plectonomically supercoiled DNA molecules as well as single molecules with extremely high level of compaction (i.e. molecules with significantly higher superhelix density values on comparison with previously experimentally measured and theoretically investigated ones) were visualized on modified amino mica which was characterized by increased surface charge density. Distance between base pairs along duplex axis was determined by measurements of contour length of single oversupercoiled DNA molecules. Determined rise per base pair was varied from 1.94 to 2.19 Å. These compressed supercoiled DNA molecules like a spring with decreased rise/base pair on comparison with well-known DNA forms were called new DNA form – S-DNA. A model of S-DNA was built. Formation of the S-DNA molecules was suggested to be an intermediate stage on the compaction of the single supercoiled DNA molecules up to the spheroids and minitoroids. Oversupercoiling and further compression of the supercoiled DNA molecules was shown to cause by high surface charge density of amino mica on which DNA molecules were immobilized.

*Key words:* supercoiled DNA, atomic force microscopy, AFM, amino mica, supercoiled DNA, S-DNA, oversupercoiling.

\*Эл. почта: o.lymunskiy@mail.ru

Структурные и физико-химические параметры различных семейств и форм молекул ДНК – А-, В-, С-, D-, Z-, Н-ДНК – являются устойчивыми общеизвестными данными, установленными на основе физических, биофизических, биохимических, молекулярно-генетических методов [1–3]. Одними из основных критериев, позволяющими дифференцировать наиболее широко изученные и распространенные А- и В-семейства ДНК, являются конформации рибозного кольца ( $C_3'$ -эндо – для А-ДНК и  $C_2'$ -эндо – для В-формы) и расстояние между парами нуклеотидов вдоль оси дуплекса. Принято считать, что расстояние между парами нуклеотидов вдоль оси двойной спирали зависит от различных факторов (влажность, ионные условия и т.д.) и изменяется от 0.34–0.30 нм для В-формы ДНК до 0.33–0.25 нм для А-ДНК [2].

С другой стороны, хорошо известно, что ДНК является эластичной молекулой, которая может быть вытянута подобно пружине. И такие вытянутые молекулы ДНК с увеличенным расстоянием между нуклеотидами вдоль оси дуплекса получены и изучены. С помощью современных методов микроманипулирования с единичными молекулами установлено, что молекулу ДНК можно растянуть в 1,7 раза до межнуклеотидного расстояния  $H = 5.8 \text{ \AA}$  в отличие от  $H = 3.4 \text{ \AA}$  для В-ДНК [4, 5]. Использование метода оптического пинцета позволило исследовать зависимость скорости процесса репликации ДНК-полимеразы в зависимости от силы натяжения, приложенной к матрице ДНК. Установлено, что приложенная сила значительно влияет на скорость репликации: она увеличивается при небольшой силе. При силе, превышающей 4 пН, она уменьшается, а при силе более 20 пН репликация прекращается [4].

Кроме одно- и двухцепочечных ДНК изучены и более высокоупорядоченные структуры. Для единичного хроматинового волокна (нуклеосомы) была установлена сильная зависимость скорости сборки нуклеопротеиновой структуры (молекулы ДНК, навитой на гистоновый октамер) от приложенной силы. При силе, превышающей 10 пН, процесс сборки прерывался с последующим резким увеличением длины хроматинового волокна. Однако данный процесс был обратимым – при уменьшении приложенной силы сборка нуклеосомы возобновлялась [6, 7].

Поскольку молекула ДНК, в силу своей эластичности, может быть растянута, то возникает вопрос: а может ли молекула ДНК, подобно пружине, быть сжатой? Анализ результатов исследований комплексов ДНК–белок с помощью АСМ показывает, что контурная длина молекул ДНК в отсутствие протеинов, измеренная непосредственно из АСМ-изображений, всегда меньше ожидаемого теоретического значения, характерного

для В-ДНК (соответствующего расстоянию между нуклеотидами вдоль оси спирали  $H = 3.4 \text{ \AA}$ ). В качестве возможных причин данного эффекта приводили такие факторы, как наличие этапа высушивания образца в процессе иммобилизации ДНК на слюду, разрешающая способность атомно-силового микроскопа, а также погрешности алгоритма измерения контурной длины ДНК [8]. Однако, по нашему мнению, основной вклад в изменение конформации ДНК, адсорбированной на слюде, вносят поверхностные свойства слюды – поверхностная плотность заряда, которая обуславливает, в свою очередь, гидрофобные свойства субстрата. Ранее посредством измерения контурной длины ДНК из АСМ-изображений показано, что при иммобилизации линейной ДНК на поверхность свежесколотой слюды (характеризующейся относительно низкой поверхностной плотностью заряда) происходит частичный переход из В- в А-форму [9]. Необходимо также принять во внимание то, что вышеупомянутая методика иммобилизации ДНК на поверхность слюды в буфере, содержащем ионы  $Mg^{2+}$ , имеет существенные ограничения. Она (как и другие методы иммобилизации ДНК на слюду с использованием поликатионов – полилизина, спермина, спермидина) позволяет производить исследования ДНК в узком интервале ионной силы  $10 \text{ mM Na}^+ < I < 200 \text{ mM Na}^+$ , а следовательно, и при невысокой степени экранирования фосфатных групп ДНК.

Как альтернатива методике иммобилизации ДНК из буфера, содержащего ионы  $Mg^{2+}$ , развиты иные методы, основанные на силиконировании слюды в парах производного аminosилана [10, 11] и в водном растворе аminosилатрана [12]. Основными особенностями подготовленной таким образом аminosлюды является возможность проведения измерений в широком интервале рН и ионной силы. Отметим также, что данная аminosлюда характеризуется более высокой плотностью заряда по сравнению со свежесколотой (немодифицированной) слюдой [13], но сила адгезии, характеризующая поверхностные свойства аminosлюды, остается постоянной, незначительно изменяясь в зависимости от технических особенностей процедуры приготовления субстрата.

Модифицировав процедуру получения аminosлюды в парах производного аminosилана, мы разработали методику получения аminosлюды с регулируемой поверхностной плотностью заряда. В результате нами получена аminosлюда как с повышенной поверхностной плотностью заряда (протонированных аминогрупп) по сравнению со стандартной аminosлюдой [10, 11], так и с пониженной плотностью заряда.

В данной работе проведено сравнительное исследование поверхностных свойств четырех субстратов для АСМ-визуализации ДНК (свежесколо-

той слюды, стандартной аминокислоты, аминокислоты с повышенной и аминокислоты с пониженной плотностью заряда) на конформацию как спиральных, так и линейных молекул ДНК. Использование модифицированной аминокислоты с повышенной поверхностной плотностью заряда и гидрофобностью позволило визуализировать различные стадии сверхсуперспирализации кольцевых молекул ДНК как с образованием суперспиральной оси молекул второго и третьего порядка, так и компактизацию единичных молекул суперспиральных ДНК в полусфероиды и сфероиды. Кроме высококомпактизованных молекул ДНК, нами визуализированы единичные молекулы суперспиральной ДНК, которые, как мы предполагаем, возникают в процессе перехода от плектономичных молекул ДНК к высококомпактизованным структурам, образованным как мономерами, так и димерами и тримерами. Посредством измерения контурной длины суперспиральных молекул ДНК из АСМ-изображений определено расстояние между парами нуклеотидов вдоль оси двойной спирали для таких сверхсуперспиральных молекул. Полученные значения межнуклеотидного расстояния ( $H = 1.94\text{--}2.19 \text{ \AA}$ ) показывают, что одним из механизмов компактизации ДНК является уменьшение расстояния между нуклеотидами вдоль оси дуплекса. Такие суперспиральные молекулы ДНК, характеризующиеся значением  $H = 1.94\text{--}2.19 \text{ \AA}$ , отнесены нами к новой форме ДНК – S-ДНК (S – от английского слова “spring” – пружина). И действительно, эластичные суперспиральные молекулы ДНК на поверхности слюды подобны пружине – они могут как сжиматься с уменьшением межнуклеотидного расстояния, так и растягиваться (в данной работе нами получены изображения вытянутых молекул суперспиральных ДНК с межнуклеотидным расстоянием  $H = 4.87\text{--}5.36 \text{ \AA}$ ).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Приготовление образцов ДНК для АСМ.** В работе использовали суперспиральную ДНК pGEMEX1 длиной 3993 п.н. (“Promega”, США), а также линейную ДНК длиной 1414 п.н., полученную амплификацией линейаризованной ДНК pGEMEX. Свежесколотую слюду, стандартную аминокислоту и модифицированную аминокислоту, с пониженной и повышенной по сравнению со стандарт-

ной аминокислотой поверхностной плотностью аминокислот, применяли в качестве субстрата. Для нанесения ДНК на свежесколотую слюду использовали 10 mM HEPES-буфер, содержащий 2.5 mM  $MgCl_2$ . На полоску аминокислоты или модифицированной аминокислоты размером  $1 \text{ см}^2$  наносили каплю раствора ДНК с концентрацией 0.1–1 мкг/мл в TE буфере (10 mM Трис-НСl, pH 7.9, 1 mM EDTA) объемом 10 мкл, промывали после двухминутной экспозиции деионизованной водой, обдували потоком аргона и выдерживали образец при давлении 100 мм рт. ст. в течение 20 мин. Процедуру получения стандартной аминокислоты осуществляли согласно [14] посредством модификации свежесколотой слюды аминокислотами в парах перегнанного 3-аминопропилтриэтоксисилана (АПТЭС) и N,N-диизопропилэтиламина. Реактивы получены от “Aldrich” (США) и “Wakenyaku” (Япония). Дистилляцию АПТЭС проводили при уменьшенном давлении в атмосфере аргона. Для аминомодификации свежесколотую слюду инкубировали в стеклянном эксикаторе объемом 2.5 л, заполненном аргоном, с растворами АПТЭС и N,N-диизопропилэтиламина 1 ч. Модифицированную слюду хранили в эксикаторе в атмосфере аргона на протяжении одного месяца. Для приготовления буферных растворов и образцов ДНК использовали ультрачистую воду с удельным сопротивлением  $\sim 17 \text{ МОм см}$ , полученную с помощью установки Milli Q (Millipore, США). Модифицированная аминокислота получена с помощью небольших изменений технологии получения стандартной аминокислоты. Аминокислоту с уменьшенной поверхностной плотностью аминокислот получали посредством обработки свежесколотой слюды в парах неперегнанного АПТЭС аналогично процедуре получения стандартной аминокислоты.

**Приготовление образцов ДНК для ПЦР.** Для проведения ПЦР использовали линейную ДНК, полученную ферментативной обработкой суперспиральной ДНК pGEMEX рестриктазой ScaI (“New England Biolabs”, Англия). Сконструированные нами праймеры L1 и L2 ограничивали фрагмент ДНК, содержащий промотор и область терминации транскрипции T7 РНК-полимеразы.

Праймеры L1 и L2, последовательности которых с соответствующими позициями на ДНК pGEMEX приведены ниже, были получены от “Sigma” (США):

5'-cgc tta caa ttt cca ttc gcc att c-3'      прямой праймер L1 (3748–3772)

5'-ctg att ctg tgg ata acc gta tta ccg-3'      обратный праймер L2 (1168–1142)

ПЦР с горячим стартом проводили в объеме реакционной смеси 50 мкл на амплификаторе GeneAmp 9700 (“Perkin Elmer”, США) при следующих температурных и временных параметрах: начальная инкубация – 95°C, 2 мин; денатурация –

95°C, 1 мин; отжиг – 69–73°C, 1 мин; синтез – 74°C, 1 мин; количество циклов – 35. Для проведения ПЦР использовали термостабильную ДНК-полимеразу высокой точности двух видов – Ru-robest ДНК-полимеразу (“TaKaRa Co.”, Япония) и

Invitrogen Platinum ДНК-полимеразу (“Invitrogen”, Япония). Реакционная смесь содержала 2.5 ед. ДНК-полимеразы, реакционный буфер – 2.5 мМ  $MgCl_2$ , 0.2 мМ dNTP, 1 мкМ каждого из праймеров и матрицу ДНК. Температуру отжига определяли теоретически с помощью программы Oligo. С целью минимизации амплификации неспецифических фрагментов проводили несколько постановок ПЦР при различных температурах отжига – 69, 71, 73°C. Для визуализации ампликонов 15 мкл ПЦР-продукта разделяли посредством электрофореза в 2%-ном (по объему) ТАЕ агарозном геле с последующей окраской бромистым этидием.

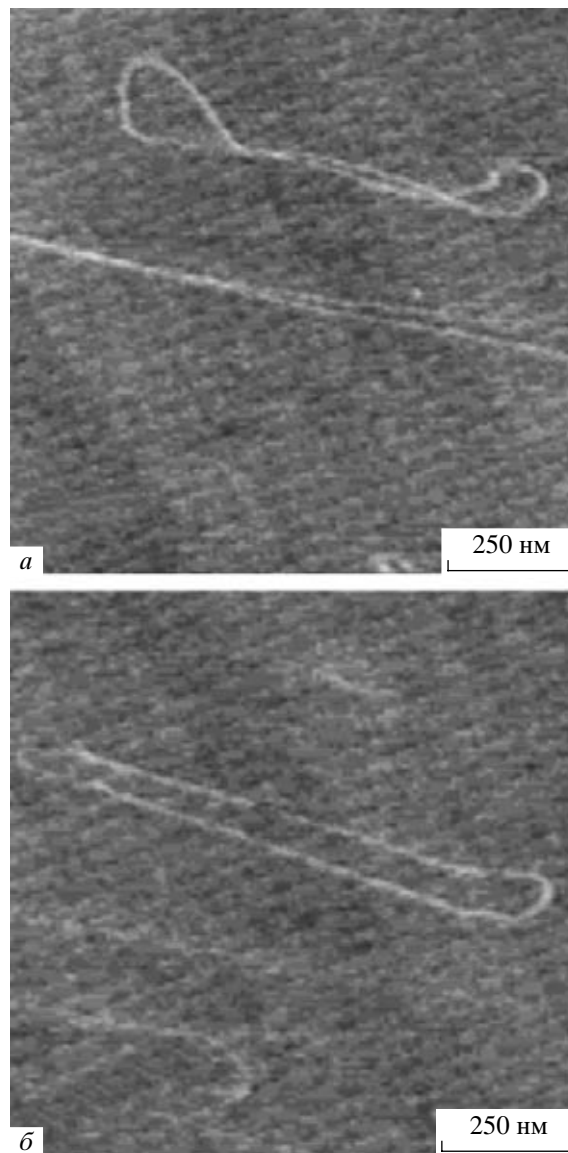
Для очистки амплифицированного фрагмента ДНК использовали следующую процедуру. После проведения электрофореза вырезали полоску геля, содержащую ампликон, с использованием длинноволнового УФ-источника излучения низкой интенсивности (“BioRad”, США). Для дальнейшей очистки ампликона от нуклеотидов, праймеров, ДНК-полимеразы, бромистого этидия использовали набор QIAquick PCR purification kit (“QIAGEN”, Япония) согласно рекомендациям производителя, а также экстракцию фенол/хлороформом с последующим переосаждением этанолом.

**Атомносиловая микроскопия.** Использовали атомносиловую микроскоп Nanoscope IV MultiMode System (Veeco Instruments Inc., США) с E-сканером (имеющим максимальный диапазон 12 мкм). АСМ-изображения ДНК записаны посредством вибрирующего варианта АСМ в воздухе в режиме “высота” при комнатной температуре. Сканирование проводили с помощью OMCL-AC160TS кантиллеров (“Olympus Optical Co.”, Япония), характеризующихся резонансной частотой 340–360 кГц и константой жесткости 42 Н/м, при частоте сканирования 3 Гц. Изображения получены в формате  $512 \times 512$  пикселей, сглажены и проанализированы с помощью программного обеспечения Nanoscope (версия 5.12r3, Veeco Instruments Inc., США).

Объем молекул ДНК рассчитывали на основе реально измеренных параметров молекул из АСМ-изображения – высоты, длины и ширины, без поправки на уширение диаметра ДНК. Для более точного измерения объема молекул использовали построение продольных, как правило, и поперечных сечений молекул с помощью встроенной опции программного обеспечения Nanoscope.

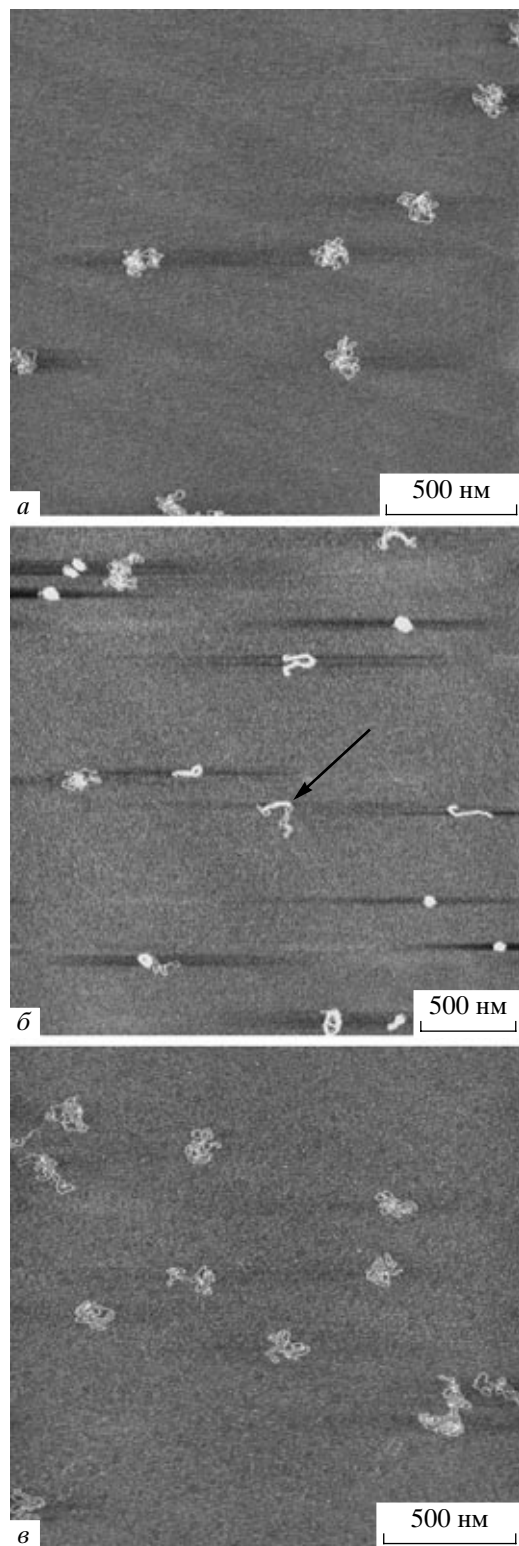
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поверхность слюды, стандартного субстрата для иммобилизации биомолекул при АСМ-исследованиях, отрицательно заряжена в буферных растворах при нейтральных значениях рН и невысокой ионной силе [15]. Поэтому для адсорбции на поверхности слюды при данных условиях отрицательно заряженных молекул ДНК используют



**Рис. 1.** АСМ-изображение вытянутых суперспиральных молекул ДНК pGEMEX, иммобилизованных на аминослюде с уменьшенной плотностью аминок групп. *а* – Контурная длина ДНК  $L = 1943$  нм, что соответствует расстоянию между парами нуклеотидов вдоль оси двойной спирали  $H = 4.87$  Å. Размер кадра  $1.13 \times 1.13$  мкм. *б* – Контурная длина ДНК  $L = 2140$  нм;  $H = 5.36$  Å. Размер кадра  $1.07 \times 1.07$  мкм.

несколько подходов, позволяющих изменить суммарный поверхностный заряд слюды с отрицательного на положительный. Наиболее простой метод заключается в том, что капля раствора ДНК, помещенная на поверхность свежесколотой слюды, содержит ионы  $Mg^{2+}$  или  $Ni^{2+}$  [16]. Альтернативные методы предполагают модификацию поверхности слюды различными поликатионами – полилизинном, спермином, спермидином [17–19]. Но все эти подходы имеют существенный недостаток – иммобилизацию ДНК на



**Рис. 2.** Изображение суперспиральной ДНК рGEMEX (длина 3993 п.н.) в воздухе, полученное с помощью атомносилового микроскопа после нанесения раствора ДНК в ТЕ буфере на поверхность стандартной аминокслоды (*а*) и модифицированной аминокслоды (*б*), которая характеризуется более высокой поверхностной плотностью аминогрупп (т.е. повышенной плотностью заряда) по сравнению со стандартной аминокслодой. Представлены суперспиральные молекулы ДНК с разным уровнем компактизации: от плектономичных (*а*, *в*) до сверхсуперспиральных молекул (*б*) с разной длиной суперспиральной оси. Размер кадра: *а* –  $2 \times 2$  мкм, *б* –  $2.7 \times 2.7$  мкм, *в* –  $2 \times 2$  мкм. *а*, *б* – Свежеприготовленная слюда, *в* – модифицированная аминокслода после 2 недель хранения. Стрелка указывает на сверхсуперспиральную молекулу ДНК, АСМ-изображение которой с большим разрешением представлено на рис. 3б.

слюду можно проводить в очень узком интервале рН и ионной силы, что исключает возможность значительного изменения поверхностной плотности заряда субстрата.

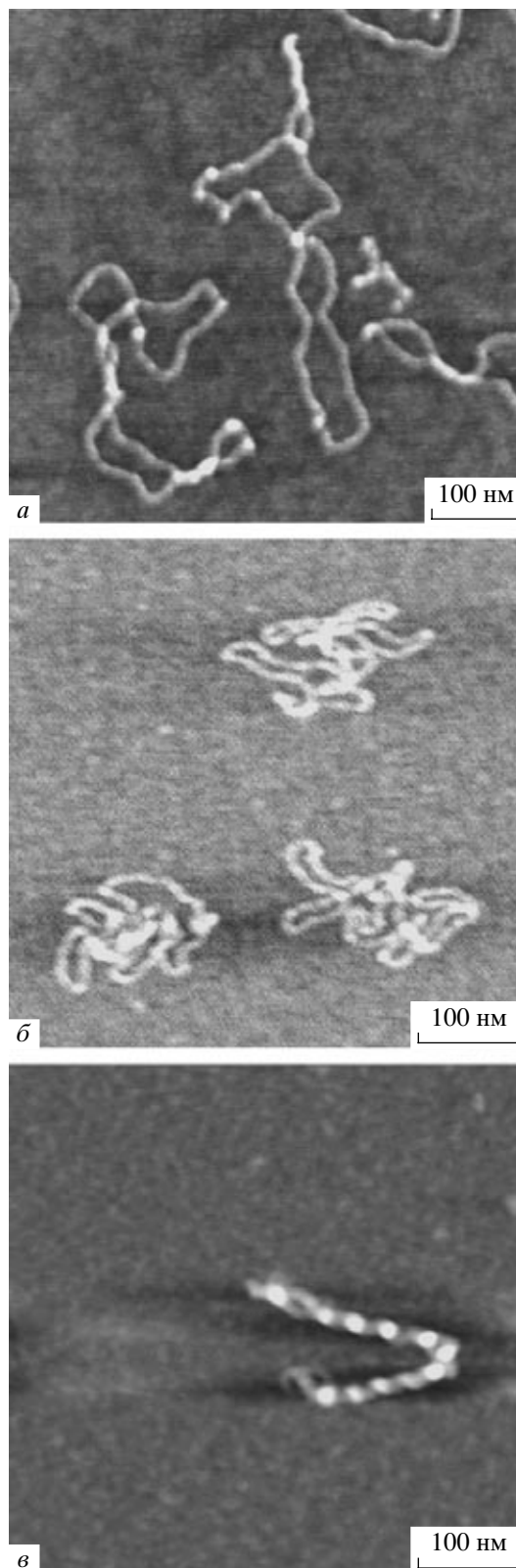
Разработанная нами ранее методика аминомодификации АСМ зондов в парах производного аminosилана (АПТЭС) [20] модифицирована и использована для получения аминокслоды с заданными свойствами, т.е. с регулируемой поверхностной плотностью заряда. В результате модификации стандартной процедуры получения аминокслоды (поверхность которой имеет положительный заряд в широком интервале рН и ионной силы раствора) в данной работе использована аминокслода как с повышенным значением поверхностной плотности заряда, так и с пониженным по сравнению с плотностью заряда стандартной аминокслоды. Далее под модифицированной аминокслодой мы будем понимать аминокслоду с повышенной поверхностной плотностью заряда, если не оговорено другое.

На рис. 1 приведены АСМ-изображения вытянутых суперспиральных молекул ДНК рGEMEX, иммобилизованных на аминокслоде с пониженной плотностью заряда. Ранее нами отработана методика получения вытянутых молекул ДНК фага  $\lambda$  при помещении капли раствора ДНК на поверхность аминокслоды с уменьшенной поверхностной плотностью заряда [21]. Вытянутые молекулы ДНК формируются при приготвлении образца для АСМ в процессе промывки слюды ультрачистой водой после экспозиции с раствором ДНК. Увеличение контурной длины вытянутых суперспиральных молекул ДНК рGEMEX до  $L = 1943$  нм (рис. 1*а*) и  $L = 2140$  нм (рис. 1*б*) означает, что вытягивание суперспиральной ДНК приводит к возрастанию межнуклеотидного расстояния до  $H = 4.87$  Å и  $H = 5.36$  Å соответственно. Полученные данные для вытянутых молекул ДНК рGEMEX хорошо согласуются с ранее опубликованными результатами исследования вытянутых ДНК различными методами [22].

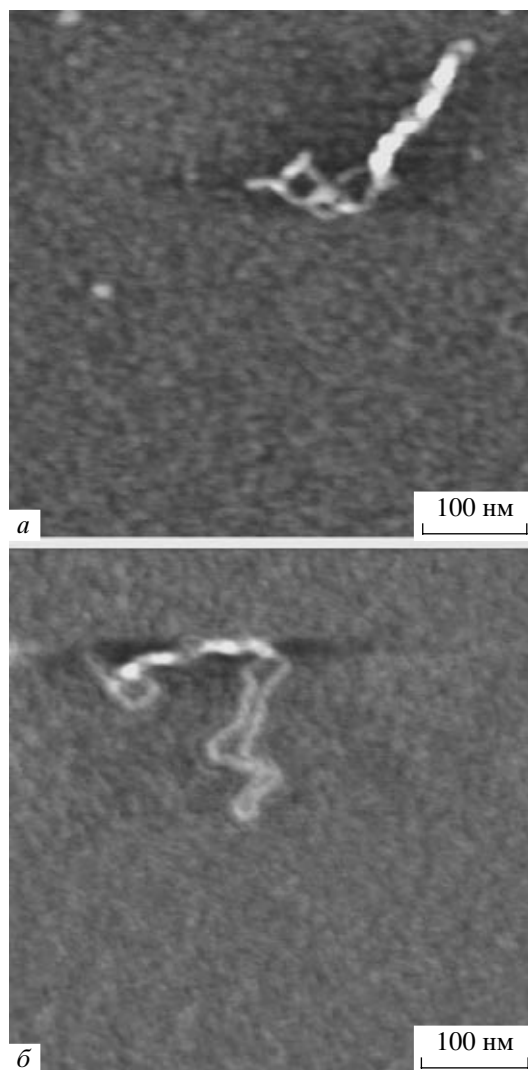
Приведенные на рис. 2 АСМ-изображения суперспиральной ДНК рGEMEX показывают колоссальное влияние поверхностных свойств аминокслоды на конформацию молекул. Молекулы ДНК, иммобилизованные на стандартной аминокслоде (рис. 2*а*), находятся в приближенной к плектономичной конформации, в то время как повышение поверхностной плотности заряда приводит к разительной компактизации молекул

ДНК (рис. 2б). Кроме множества высококомпактизованных молекул нами также визуализированы сверхспиральные молекулы ДНК, которые по форме резко отличаются как от плектономичных молекул ДНК (полученных как на стандартной слюде (рис. 2а), так и на модифицированной аминослюде с повышенной плотностью заряда после двух недель хранения слюды перед иммобилизацией ДНК (рис. 2в)). Одна из таких суперспиральных молекул ДНК показана стрелкой на рис. 2б. Приведенные кадры довольно большого размера (~2 × 2 мкм) демонстрируют, что поверхность аминослюды содержит только молекулы ДНК и свободна от загрязнений, примесных наночастиц, сопровождающих некоторые АСМ-исследования.

Крайне важным для оценки свойств поверхности модифицированной слюды является тот факт, что изображение (форма и количество молекул) ДНК на модифицированной аминослюде после ее хранения на протяжении двух недель (рис. 2в) подобно АСМ-изображению молекул на свежеприготовленной стандартной аминослюде (рис. 2а). Это означает, что, во-первых, количество активных (т.е. протонированных) аминогрупп на поверхности модифицированной аминослюды значительно превышает количество аминогрупп на поверхности стандартной аминослюды (кстати, в ранее проведенных исследованиях посредством рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии [23] показано, что только 50% аминогрупп на поверхности стандартной аминослюды являются активными), а во-вторых, их устойчивость к окислению значительно превышает устойчивость аминогрупп стандартной аминослюды. Ранее нами показано, что количество активных аминогрупп на поверхности стандартной аминослюды значительно уменьшается после двух недель хранения, а период полуактивности стандартной аминослюды оценен именно в две недели. Таким образом, модифицированная аминослюда по своей стабильности и поверхностной плотности аминогрупп значительно превосходит стандартную аминослюду. Именно благодаря этим отличиям иммобилизация суперспиральной ДНК на модифицированную аминослюду позволила нам получить изображение единичных молекул ДНК с таким чрезвычайно высоким уровнем суперспирализации, который ранее не был исследован ни экспериментально, ни даже рассмотрен теоретически. Важно также то, что к поверхностным свойствам субстрата суперспиральная ДНК гораздо более чувствительна по сравнению с линей-



**Рис. 3.** АСМ-изображение единичных суперспиральных молекул ДНК pGEMEX, иммобилизованных на различных субстратах: свежесколотой слюде (а), полученное после нанесения капли раствора ДНК в 10 мМ HEPES буфере, содержащем 2.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, стандартной аминослюде (б) и модифицированной аминослюде (в). Размер кадра: а – 583 × 583 нм; б – 500 × 500 нм; в – 500 × 500 нм. Контурная длина ДНК pGEMEX составляет: (а) – 1243 нм; (б) – 1216 нм; (в) – 873 нм. Длина суперспиральной оси молекул ДНК: (а) – 466 нм; (в) – 382 нм.



**Рис. 4.** АСМ-изображение сверхспирализованных молекул ДНК рGEMEX на модифицированной аминослюде. Размер кадра для обоих изображений –  $500 \times 500$  нм. *a* – Контурная длина молекулы ДНК составляет 776 нм, что соответствует расстоянию между парами нуклеотидов вдоль оси двойной спирали  $H = 1.94$  Å. *б* – Контурная длина молекулы ДНК – 852 нм; межнуклеотидное расстояние вдоль оси дуплекса –  $H = 2.11$  Å.

ной ДНК. Проанализируем более детально эти сверхспиральные молекулы ДНК.

Для характеристики топологии суперспиральных ДНК (молекул, ось которых может быть закручена в виде спирали, в отличие от линейных молекул ДНК) принято использовать несколько параметров – суперспиральную плотность, количество узлов (супервитков), длину суперспиральной оси. Суперспиральную плотность  $\sigma$  можно определить как отношение числа супервитков к числу витков двойной спирали, находящейся в релаксированном состоянии [24].

Изображения молекул ДНК, полученные с более высоким разрешением и показанные на рис. 3, позволяют видеть громадные отличия в топологии молекул ДНК, иммобилизованных на свежеисколотой слюде из буфера, содержащего 2.5 мМ  $MgCl_2$  (рис. 3*a*), стандартной аминослюде (рис. 3*б*) и модифицированной аминослюде (рис. 3*в*). На рис. 3*a* представлены изображения плектономических суперспиральных молекул ДНК, характеризующихся невысоким значением суперспиральной плотности (7 суперспиральных витков, или узлов,  $\sigma = -0.018$ ). Ранее аналогичные изображения получены для плазмидных ДНК на субстратах, обработанных поликатионами полилизинном, спермином [18, 19]. Суперспиральные молекулы ДНК рGEMEX на стандартной аминослюде (*б*) более компактизованы, однако их контурная длина, измеренная из АСМ-изображения, лишь незначительно меньше ( $L = 1216$  нм) по сравнению с контурной длиной плектономических молекул ДНК на слюде с ионами  $Mg^{2+}$  ( $L = 1243$  нм, рис. 3*a*).

Молекула суперспиральной ДНК на рис. 3*в*, иммобилизованная на модифицированной аминослюде, резко отличается по своим параметрам от молекул ДНК на рис. 3*a* и 3*б*: количество узлов возросло до 11, длина суперспиральной оси уменьшилась до 382 нм, а рассчитанная из АСМ-изображения контурная длина составила  $L = 873$  нм (!).

Измерение контурной длины единичной нативной молекулы ДНК с субнанометровым разрешением, являющимся отличительной особенностью АСМ, позволяет определить, зная количество пар нуклеотидов в данной молекуле, расстояние между парами нуклеотидов вдоль оси двойной спирали ДНК (подъем). И если для ДНК рGEMEX, изображенной на рис. 3*a*, межнуклеотидное расстояние  $H = 3.11$  Å, то для сверхспирализованной ДНК на рис. 3*в* рассчитанное значение составило  $H = 2.19$  Å (!). Значение  $H = 3.11$  Å согласуется с ранее приведенными фактами незначительного уменьшения контурной длины ДНК, высушенной на слюде, в предположении В-формы ДНК [8]. Однако величина  $H = 2.19$  Å указывает на то, что суперспиральные молекулы ДНК, иммобилизованные на аминослюде с повышенной плотностью заряда, претерпевают значительные внутримолекулярные превращения, приводящие не только к увеличению уровня суперспирализации, но и к значительному уменьшению межнуклеотидного расстояния.

На рис. 4 приведены другие АСМ-изображения единичных суперспиральных молекул ДНК рGEMEX на модифицированной аминослюде. Рассчитанные значения межнуклеотидного расстояния составляют  $H = 1.94$  Å и  $H = 2.11$  Å для сверхспиральных молекул ДНК на рис. 4*a* и 4*б* соответственно. В качестве одного из параметров, который позволяет отличить единичную молекулу от димера и других высококомпактизо-



**Таблица 1.** Параметры суперспиральных молекул ДНК рGEMEX (контурная длина молекулы, расстояние между нуклеотидами вдоль оси спирали, объем молекулы и др.), определенные из АСМ-изображений

№	Молекула	Высота $h_{\max}$ , нм	Высота $h_{\min}$ , нм	Контурная длина сверхспиральной молекулы $L$ , нм	Длина суперспиральной оси $l$ , нм	Контурная длина релаксированной молекулы $L_{\text{relax}}$ , нм	Расстояние между нуклеотидами $H$ , Å	Объем $V$ , нм <sup>3</sup>
1 <sup>a</sup>		0.80	0.35*	1243	466	1243	3.11	3510
2 <sup>b</sup>		0.99	0.35*	1216	–	1216	3.05	3530
3		2.00	0.35*	390	370	873	2.19	3830
4		1.80	0.27*	577	282	776	1.94	3830
5		1.33	0.35*	642	390	852	2.11	3800

Примечание. Теоретическое значение исключенного объема ДНК рGEMEX составляет  $V = 4010 \text{ нм}^3$ .

\* Двунитевая ДНК.

<sup>a</sup> ДНК иммобилизована на слюде в буфере, содержащем  $\text{MgCl}_2$ .

<sup>b</sup> ДНК иммобилизована на стандартной аминослюде.

ванных структур, образованных несколькими молекулами, мы выбрали объем молекулы ДНК, рассчитанный непосредственно из АСМ-изображения соответствующей молекулы. Его значение для единичных молекул ДНК незначительно отличается от теоретически рассчитанного значения исключенного объема молекулы ( $V_{\text{искл}} = 4010 \text{ нм}^3$ ) и позволяет надежно дифференцировать единичные молекулы ДНК от агрегатов. Для более точного вычисления объема мы использовали не измеренное в одной точке значение высоты молекулы (которое значительно изменяется для сверхспиральных ДНК: при характерной высоте одной нити двойной спирали  $h = 0.3\text{--}0.4 \text{ нм}$  высота в узлах, образованных двумя пересекающимися нитями ДНК, может достигать 1.3–1.8 нм), а, как правило, продольное сечение молекулы секущей плоскостью, перпендикулярной плоскости слюды.

По приведенным в табл. 1 параметрам молекул ДНК можно видеть, что значение объема для сверхспиральных молекул ДНК (№ 3–5 в табл. 1, рис. 3в и рис. 4) совпадает со значением объема для единичной суперспиральной молеку-

лы ДНК, иммобилизованной как на свежесколотой слюде, так и на стандартной аминослюде (№ 1, 2 в табл. 1, рис. 2а и 2б) в пределах погрешности измерения. В то же время величина объема  $V$  для димеров (№ 3–6, табл. 2) и тримеров (№ 7, табл. 2) равна удвоенному и утроенному значению объема единичной молекулы ДНК соответственно. Обращает на себя внимание тот факт, что такие высококомпактизованные структуры, как полусфероид (№ 1, табл. 2) и сфероид (№ 2, табл. 2) также образованы единичными молекулами. Существенно меньшее значение объема сфероида (№ 2, табл. 2) по сравнению с объемом единичной молекулы объясняется тем, что не был учтен объем выступающих из сфероида нитей ДНК.

#### *Сверхспиральные молекулы образованы единичными молекулами ДНК*

Вычисление объема конденсированной структуры позволяет однозначно дифференцировать агрегаты (димеры, тримеры и т.д.) от единичных молекул ДНК. Для расчета объема сверхспер-



**Таблица 2.** Параметры компактизованных структур, образованных единичными (1, 2), двумя (3–6) и тремя (7) суперспиральными молекулами ДНК рGEMEX, определенные из АСМ-изображений

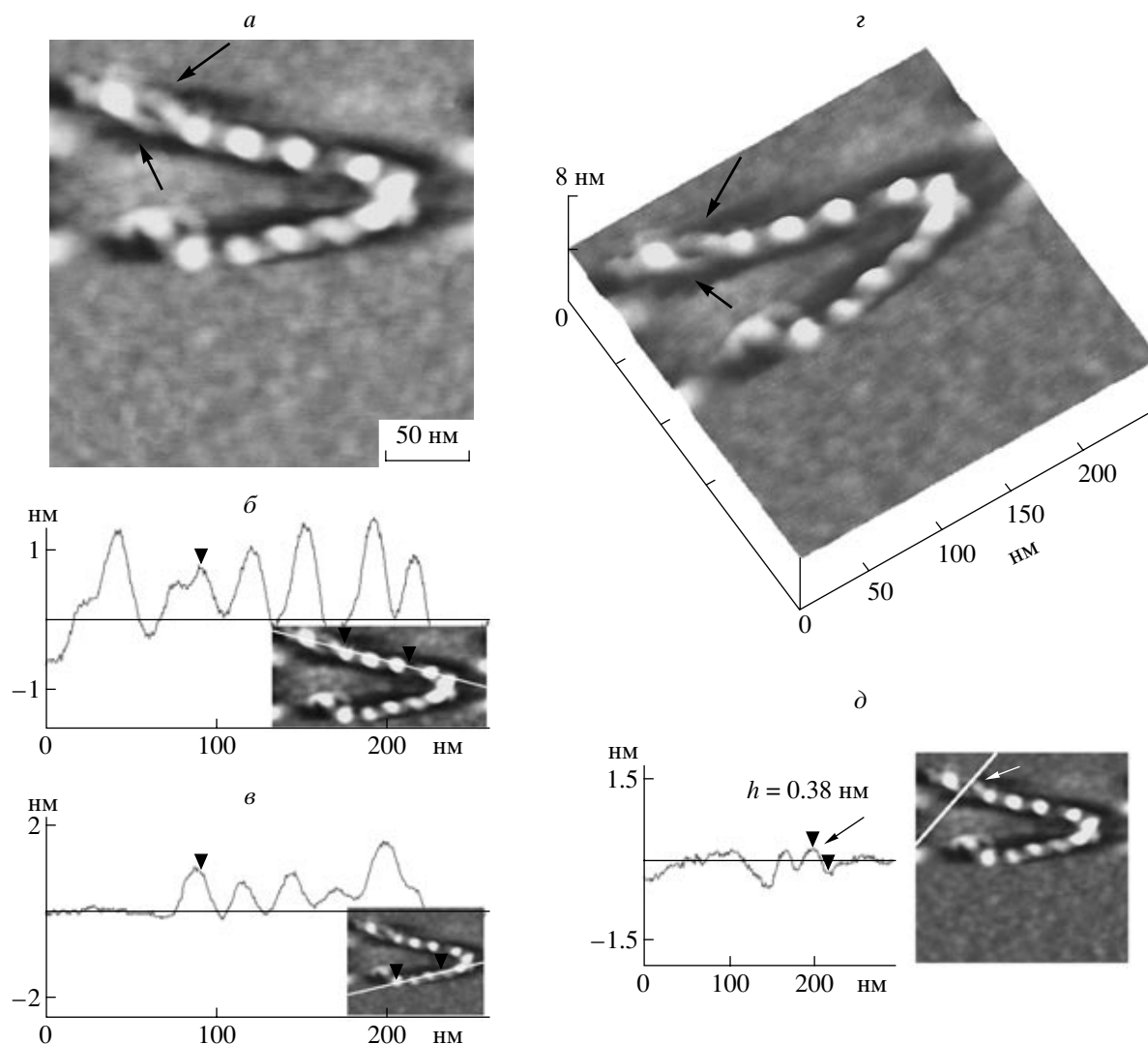
№	Молекулы	Высота $h_{\max}$ , нм	Высота $h_{\min}$ , нм	Контурная длина суперспиральной молекулы $L$ , нм	Длина суперспиральной оси $l$ , нм	Объем $V$ , нм <sup>3</sup>
1		2.60	1.85	–	–	3620
2		3.45	0.30*	–	–	3140
3		1.40	0.35*	548	548	6300
4		2.00	0.87	269	269	7080
5		2.00	0.45*	–	401	6840
6		2.10	0.30*	267	267	6570
7		3.50	1.00	260	260	10650

\* Двунитевая ДНК.

спиральной молекулы ДНК, АСМ-изображение которой приведено на рис. 5а, использовали построение трех продольных сечений фрагментов молекулы, два из которых показаны на рис. 5б и 5в. Полученное значение объема (№ 3, табл. 1) для данной суперспиральной молекулы совпадает как с экспериментально определенным значением исключенного объема единичной суперспиральной молекулы ДНК (№ 1, табл. 1) из АСМ-изображения, так и рассчитанным теоретически.

Другим важным результатом, свидетельствующим о суперспирализации единичных молекул, а не жгутов, является высота закрученных нитей, образованных двухцепочечной ДНК. На АСМ-изображении (рис. 5а) и на трехмерном изображении данной молекулы стрелками указаны четко различимые нити данной молекулы. Измеренная высота этих частично разошедшихся нитей (рис. 5д)

показывает, что данные нити образованы двухцепочечной ДНК, поскольку высота каждой нити ( $h = 0.38$  нм) равна высоте нити единичной иммобилизованной на немодифицированной слюде молекулы ДНК (№ 1, табл. 1), что, в свою очередь, совпадает с литературными данными по АСМ-измерению высоты ДНК, адсорбированной на субстрате [18]. Аналогичные измерения проведены и для другой суперспиральной молекулы ДНК (рис. 6). Как значение объема (поз. 4, табл. 1), так и измерение высоты нитей данной молекулы ( $h = 0.38–0.40$  нм) подтверждает, что и данная суперспиральная структура образована одной (!) молекулой ДНК. Значения объемов для других визуализированных высококомпактизованных структур, приведенных в табл. 2 (полусфероида (№ 1), сфероида (№ 2), димеров (№ 3–6), тримера (№ 7)), подтверждает надежность данного метода определения

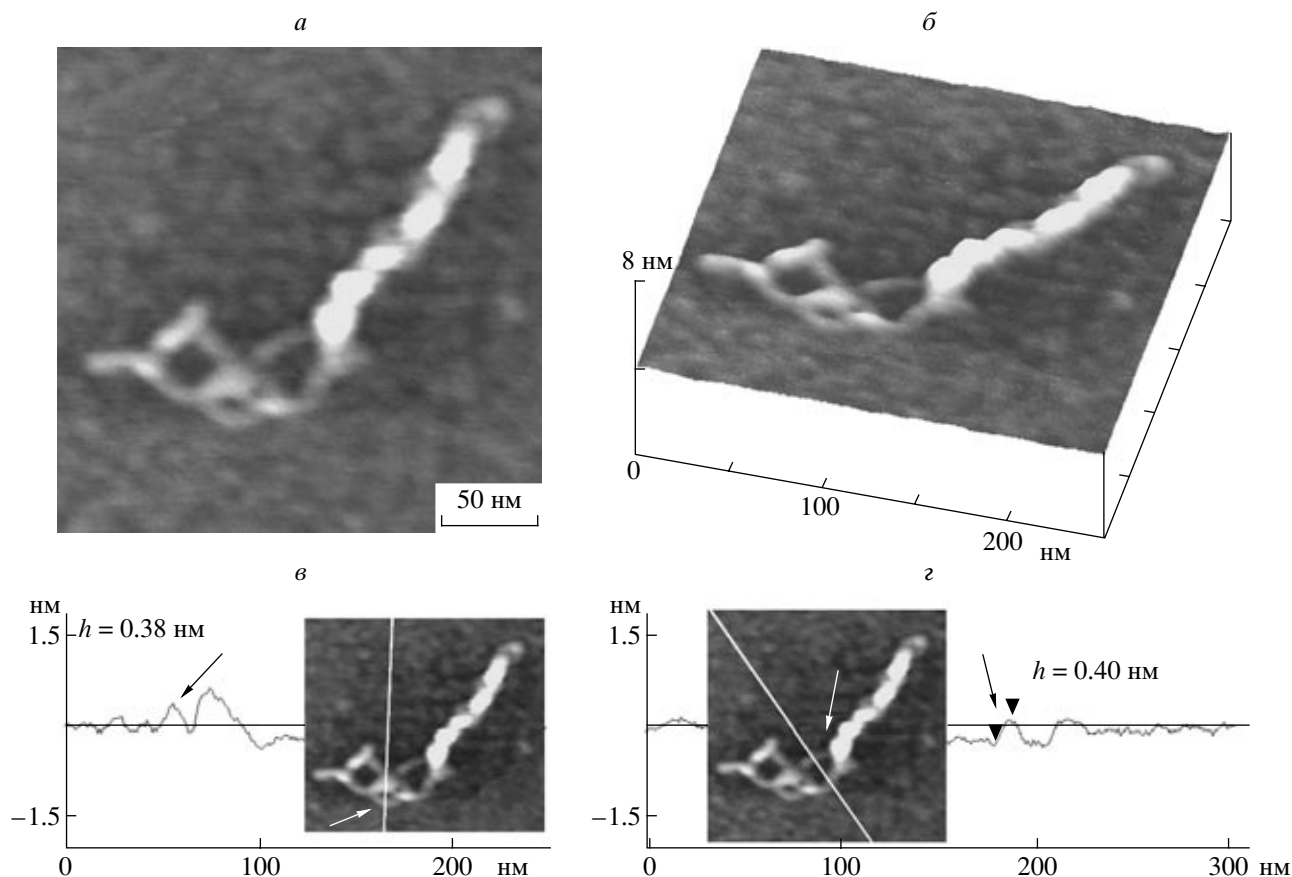


**Рис. 5.** *a* – АСМ-изображение единичной сверхспиральной ДНК рGEMEX в S-форме, полученное после иммобилизации на поверхность модифицированной аминокислоты, которая характеризуется повышенной поверхностной плотностью заряда. Размер кадра  $250 \times 250$  нм. Расстояние между нуклеотидами вдоль оси дуплекса для данной молекулы  $H = 2.19$  Å. Стрелками показаны две нити, каждая из которых образована двойной спиралью ДНК, закрученные в правую сверхспиральную ДНК с четко различимыми 11 сверхвитками (узлами). *б, в* – Продольные сечения суперспиральной молекулы ДНК рGEMEX. Секущая плоскость проведена перпендикулярно плоскости рисунка через линию, показанную на вставках. Объем молекулы рассчитан как произведение ширины молекулы на сумму площадей продольных сечений. Шесть (*б*) и пять пиков (*в*) на профилях сечений соответствуют шести и пяти узлам. *г* – Трехмерное изображение молекулы. Стрелками указаны частично разошедшиеся нити дуплекса, образующие сверхспиральную молекулу. *д* – Поперечное сечение, выполненное через разошедшиеся нити дуплекса. На вставке показана линия, через которую проведена секущая плоскость перпендикулярно плоскости рисунка. Два пика соответствуют профилям сечений двух нитей, из которых была определена их высота. Максимальная высота пика соответствует высоте фрагмента молекулы. Стрелками на сечении и на вставке указаны пик и соответствующая ему двойная спираль ДНК, высота которой составляет  $h = 0.38 \pm 0.05$  нм.

объема конденсированных структур и эффективность их дифференциации.

Такие сжатые, подобно пружине, суперспиральные молекулы ДНК с уменьшенным расстоянием между парами оснований вдоль оси дуплекса  $H \sim 2$  Å по сравнению с хорошо известными формами ДНК названы нами новой формой ДНК – S-ДНК (“S” – от английского слова “spring” или пружина).

Ранее установлено, что межнуклеотидное расстояние для двухцепочечной ДНК связано линейной зависимостью с углом наклона оснований к оси спирали [2]. На рис. 7 представлен график, аппроксимированный до значения межнуклеотидного расстояния  $H = 1.9$  Å. Определенный из графика модуль угла наклона оснований в S-ДНК  $\gamma$  находится в интервале  $27^\circ < \gamma < 30.5^\circ$ , что соответствует диапазону межнуклеотидного расстояния



**Рис. 6.** *а* – АСМ-изображение единичной левой сверхспиральной ДНК рGEMEX в S-форме. Размер кадра  $250 \times 250$  нм. *б* – Трехмерное изображение молекулы. *в* – Профиль поперечного сечения, выполненный секущей плоскостью вдоль линии, которая показана на вставке. Стрелки указывают на пик и соответствующий ему фрагмент нити двойной спирали ДНК, высота которой составляет  $h = 0.38$  нм. *г* – Профиль поперечного сечения, выполненный вдоль линии, показанной на вставке. Стрелка указывает на пик, из которого была определена высота соответствующей части двойной спирали ДНК  $h = 0.40$  нм.

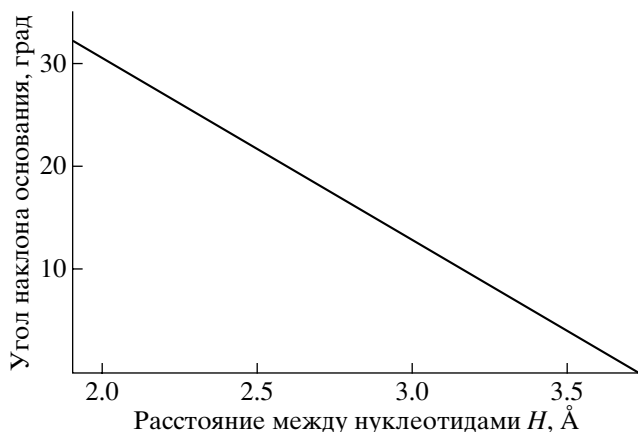
S-ДНК  $1.94 \text{ \AA} \leq H \leq 2.19 \text{ \AA}$ . Хотя при переходе от А- к В-форме, с увеличением межнуклеотидного расстояния,  $\gamma$  меняет знак с положительного на отрицательный, применительно к углу наклона  $\gamma$  для S-ДНК мы не располагаем достаточными данными о знаке  $\gamma$ .

Для более детального понимания механизма эластичности ДНК, а также принимая во внима-

**Таблица 3.** Параметры А-, В- и S-форм ДНК

	А-ДНК	В-ДНК	S-ДНК
Расстояние между парами оснований вдоль оси спирали (подъем), $\text{\AA}$	2.56–3.29	3.03–3.37	1.94–2.19
Угол наклона основания, град	20.2–10	16.4–5.9	30.5–27
Расстояние между основаниями, $\text{\AA}$	2.72–3.34	3.16–3.39	2.25–2.45

ние то, что ранее в АСМ исследованиях зафиксировано уменьшение контурной длины линейной ДНК при иммобилизации на слюде с невысокой поверхностной плотностью заряда [8], нами проведены предварительные исследования возможности сжатия молекул линейной ДНК. Для этого линейная ДНК длиной 1414 п.н. была иммобилизована на свежесколотой слюде (рис. 8*а*) и модифицированной аминокислоте (рис. 8*б*). Из построенных распределений контурной длины визуализированных ампликонов определена контурная длина молекул. Для молекул ДНК, иммобилизованных на свежесколотой слюде, контурная длина составила  $L = 435 \pm 15$  нм (рис. 9), что соответствует расстоянию между основаниями вдоль оси спирали  $H = 3.10 \text{ \AA}$ . Это значение подъема для пары оснований находится в диапазоне межнуклеотидного расстояния для В-ДНК ( $3.03 \text{ \AA} < H < 3.37 \text{ \AA}$ ), а также и для А-ДНК ( $2.56 \text{ \AA} < H < 3.29 \text{ \AA}$ ) [2]. Контурная длина ампликона, иммобилизованного на модифицированной аминокислоте, составила  $L = 296 \pm 14$  нм, что соответствует расстоянию меж-



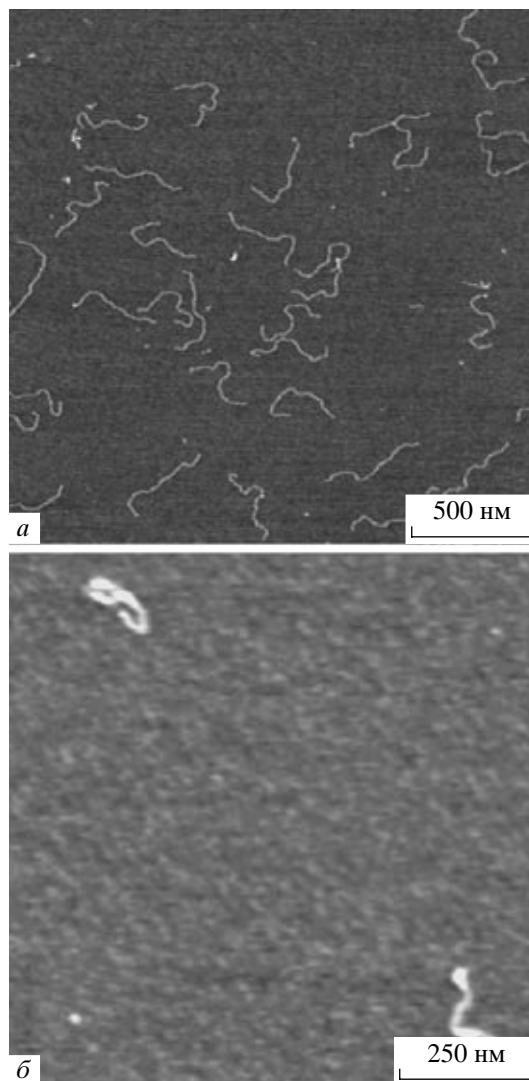
**Рис. 7.** Зависимость угла наклона оснований от расстояния между парами нуклеотидов вдоль оси двойной спирали. Угол наклона основания определяется как угол между нормалью к плоскости основания и осью дуплекса.

ду нуклеотидами вдоль оси дуплекса  $H = 2.09$  Å. Некоторые из множества различных параметров, характеризующих структуру ДНК (наклон оснований, наклон оси, расстояние между парами оснований вдоль оси дуплекса (подъем), пропеллерное закручивание, спиральный повтор и др.), приведены в табл. 3 для сжатой S-ДНК в сравнении с известными формами ДНК – А-ДНК и В-ДНК. Отметим, что А-ДНК можно считать сжатой молекулой по сравнению с В-ДНК.

Существуют ли пространственные ограничения для нуклеотидов в S-ДНК? Построенные нами модели фрагмента ДНК длиной 15 п.н. S-ДНК (рис. 10а) и В-ДНК (рис. 10б) показывают принципиальную возможность существования сжатых молекул ДНК с уменьшенным межнуклеотидным расстоянием вдоль оси дуплекса со значением  $h \sim 2$  Å.

#### Каков возможный механизм сверхспирализации суперспиральных ДНК?

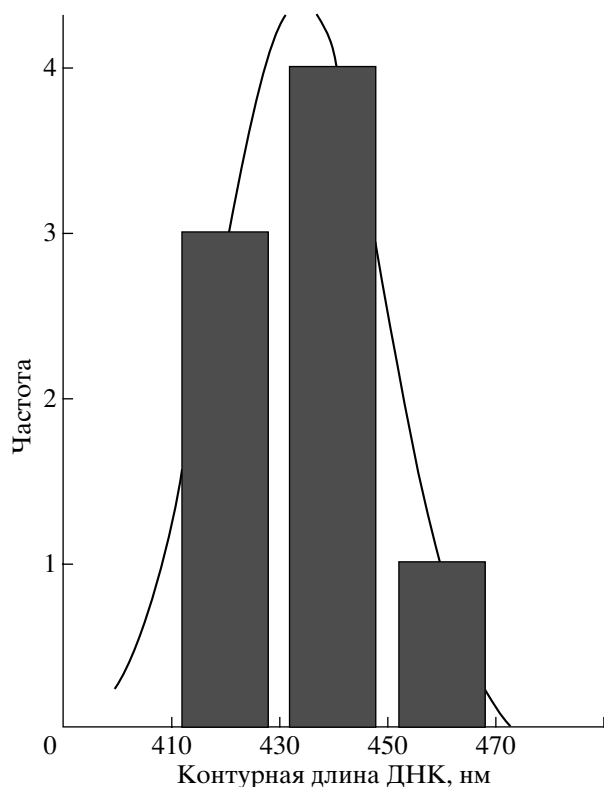
Структура отрицательно заряженной в растворе молекулы ДНК стабилизируется ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями, включая стэкинг-взаимодействия соседних пар нуклеотидов, а также отталкиванием соседних фосфатных групп ДНК. Изменение ионной силы раствора приводит к изменению степени экранирования фосфатных групп ДНК с последующим изменением степени взаимного отталкивания соседних фосфатных групп и, как следствие, к изменению конформации молекулы. В подавляющем большинстве исследований по визуализации суперспиральных ДНК *in vitro* с помощью АСМ, электронной и криоэлектронной микроскопии степень нейтрализации зарядов фосфатных групп ДНК осу-



**Рис. 8.** Изображение амплифицированного фрагмента ДНК rGEMEX, полученное с помощью АСМ. *а* – Свежесколотая слюда. Размер кадра  $2.2 \times 2.2$  мкм. Ожидаемая контурная длина ампликона размером 1414 п.н. составляет  $L = 480$  нм в предположении В-формы ДНК ( $H = 3.4$  Å). Измеренная из АСМ-изображения контурная длина ампликона составляет  $L = 435 \pm 15$  нм, что соответствует расстоянию между парами нуклеотидов вдоль оси двойной спирали  $H = 3.07$  Å. *б* – Модифицированная аминослюда с увеличенной поверхностной плотностью заряда, т.е. плотностью протонированных аминогрупп. Размер кадра  $1 \times 1$  мкм. Контурная длина ампликона составляет  $L = 296 \pm 14$  нм, что соответствует расстоянию между парами нуклеотидов вдоль оси дуплекса  $H = 2.09$  Å.

ществляли посредством изменения ионной силы раствора в довольно узком диапазоне [11, 17, 25].

Хотя известно, что основным фактором, вызывающим суперспирализацию ДНК, является степень нейтрализации заряда отрицательно заряженных фосфатных групп ДНК, изменение ионной силы раствора при изменении concentra-



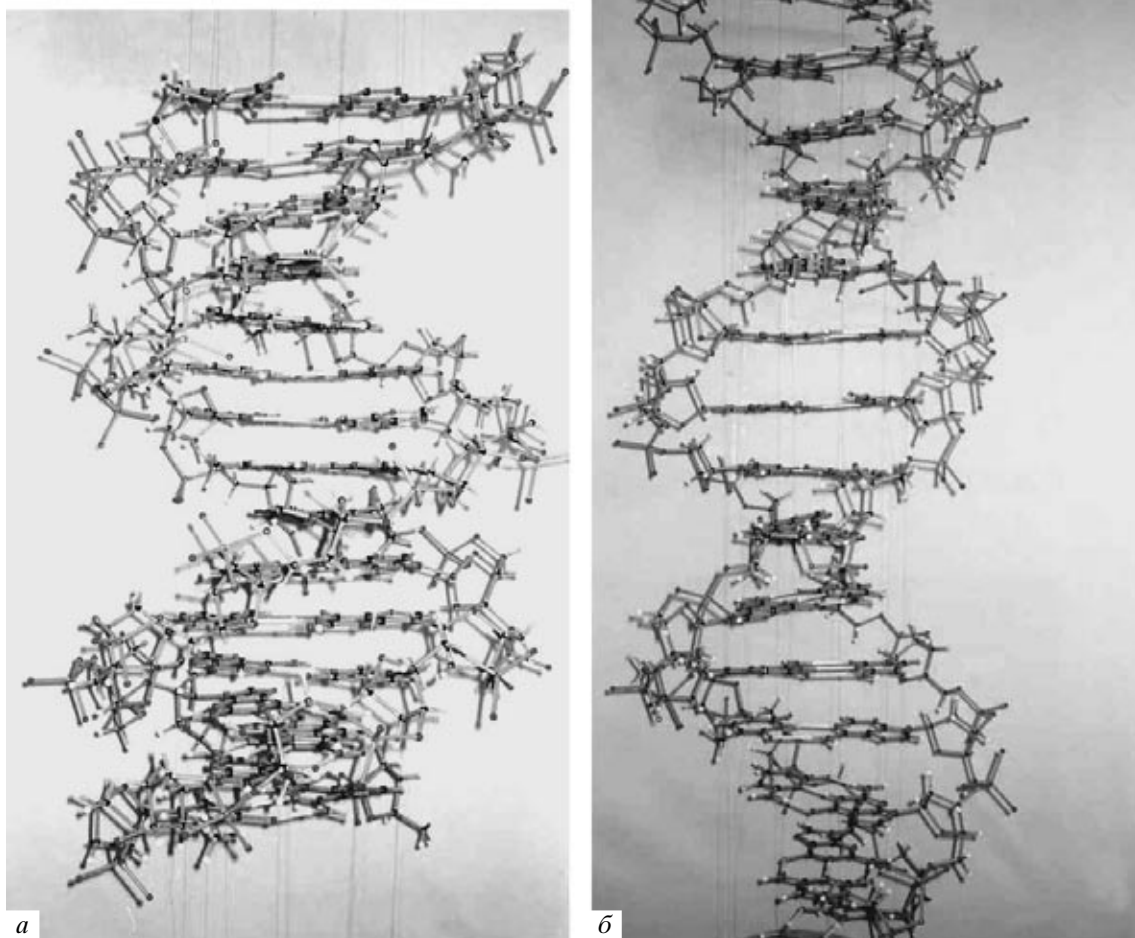
**Рис. 9.** Контурная длина ампликонов после проведения ПЦР и последующей очистки, измеренная из АСМ-изображения ДНК, иммобилизованной на свежесколотой слюде. Линия представляет Гауссово распределение.

ции NaCl или изменение концентрации поликатиона на поверхности слюды, используемой для иммобилизации ДНК, в предыдущих исследованиях приводили к незначительной суперспирализации ДНК (значение суперспиральной плотности изменялось в интервале  $0.03 < |\sigma| < 0.08$ ) [17–19].

При иммобилизации молекул ДНК pGEMEX на поверхность свежесколотой слюды из буфера, содержащего ионы  $Mg^{2+}$ , на АСМ-изображении видны плектономичные молекулы ДНК с низким значением суперспиральной плотности (рис. 3а). В многочисленных работах на модельных системах, включая нуклеосомы, по исследованию механизма компактизации ДНК различными белками (гистоновые белки, конденсины, когезины) также не были визуализированы сверхспиральные ДНК и высококомпактизованные молекулы ДНК [26–29]. Основная причина этого, на наш взгляд, заключается в том, что в большинстве работ в качестве АСМ подложки использована слюда с невысоким значением поверхностной плотности заряда, в основном при иммобилизации из буфера, содержащего ионы  $Mg^{2+}$ . А ионы  $Mg^{2+}$ , подобно ионам  $Ca^{2+}$ , могут препятствовать компактизации ссДНК. Так, в работе [30] показана,

но, что ионы  $Ca^{2+}$  препятствуют компактизации ДНК в комплексе с гистоновым белком HMGB1.

При переходе от визуализации сверхспиральной ДНК на свежесколотой слюде к ее визуализации на стандартной аminosлюде (рис. 2а) можно видеть, что молекулы ДНК pGEMEX более компактизованы, менее вытянуты, единичные молекулы расположены на меньшей площади. Это можно объяснить более сильным экранированием отрицательно заряженных фосфатных групп ДНК аминогруппами слюды, что приводит к уменьшению электростатического отталкивания соседних фрагментов ДНК. Кстати, здесь необходимо остановиться на нескольких моментах. В данной работе мы не исследуем адгезивные свойства используемых субстратов. Отметим только, что поверхностные свойства слюды могут быть охарактеризованы из силового графика (зависимости силы разрыва от расстояния между зондом и субстратом), полученного с помощью АСМ в режиме силовых измерений. Ранее мы показали, что стандартная аminosлюда, полученная модификацией в парах АПТЭС, в водных растворах при нейтральных значениях pH характеризуется суммарным положительным зарядом и величиной силы адгезии  $F \sim 0.8\text{--}4.2$  нН [31]. Однако на стандартной аminosлюде нами визуализированы лишь плектономичные сверхспиральные ДНК. И только на модифицированной аminosлюде, которая характеризуется более высокой поверхностной плотностью заряда (по нашим предварительным результатам, плотность аминогрупп на модифицированной аminosлюде в 2–3 раза выше по сравнению с плотностью на стандартной аminosлюде), стала возможной визуализация единичных сверхспиральных молекул ДНК вплоть до образования минитороидов и сфероидов. В данном случае молекулы биополимера с высоким значением плотности заряда (ДНК) помещены на субстрат, характеризующийся высоким значением поверхностной плотности заряда. При этом, ввиду более высокой плотности положительно заряженных аминогрупп на поверхности модифицированной аminosлюды, происходит экранирование большего количества отрицательных фосфатных групп ДНК. Кроме того, по нашему мнению, существует еще один, внутримолекулярный, механизм компактизации ДНК, который может вносить существенный вклад в условиях нейтрализации заряда фосфатных групп. В работе [32] теоретическими расчетами показано, что нуклеотиды вдоль цепи ДНК, образующие сайты для интеркаляции лигандов, неодинаково заряжены. Например, ТА-сайт является наиболее электроотрицательным ввиду того, что 2'-дезоксирибозо-5'-монофосфат, присоединенный к аденину (имеющему наибольший положительный заряд из азотистых оснований), – наиболее электроотрицательный. Это означает, что компактизация ДНК



**Рис. 10.** Модель фрагмента ДНК длиной 15 п.н. в S-форме (расстояние между парами оснований вдоль оси спирали (подъем)  $h = 2.0 \text{ \AA}$ ) (а) и В-форме ( $h = 3.4 \text{ \AA}$ ) (б). Последовательность “+”-нити: 5'-aag gtc ttc ggt cgt-3'. Спиральный повтор для обеих форм ДНК составляет 10.5 п.н. на виток.

может быть обусловлена внутримолекулярным электростатическим притяжением между неравномерно заряженными нуклеотидами ДНК в условиях повышенного экранирования заряда фосфатных групп ДНК.

Полученные нами результаты показывают, что сверхспирализация, приводящая к сжатию единичных молекул ДНК, может происходить *in vitro* в отсутствие белков, а необходимым условием этого является высокая поверхностная плотность положительного заряда субстрата, на котором иммобилизована суперспиральная ДНК. При этом образуются сжатые как правые сверхспиральные молекулы ДНК (рис. 5), так и левые сверхспиральные ДНК (рис. 6). На основе анализа вышеприведенных результатов мы предполагаем, что с помощью суперспиральной ДНК, иммобилизованной на модифицированной аминослюде, возможно моделирование процессов, происходящих с природными молекулами ДНК *in vivo*, поскольку в ядре ДНК находится в среде с

высокой плотностью заряженных остатков различных молекул, в первую очередь белков.

Авторы выражают благодарность А. Сиволобу (Киевский Национальный Университет), А. Шестопаловой (Институт радиоэлектроники НАН Украины), О. Лиманской (Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины УААН) за полезные дискуссии и критические замечания при подготовке статьи.

Работа выполнена при частичной поддержке Международного центра науки и технологий (Япония), а также гранта Академии медицинских наук Украины.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иванов В. 1983. Двойная спираль ДНК. *Молекуляр. биология.* **17**, 616–621.
2. Зенгер В. 1987. *Принципы структурной организации нуклеиновых кислот.* М.: Мир.

3. Wang J. 1979. Helical repeat of DNA in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **76**, 200–203.
4. Cluzel P., Lebrun A., Heller C., Lavery R., Viovy J., Chatenay D., Caron F. 1996. DNA: an extensible molecule. *Science*. **271**, 792–794.
5. Smith S., Cui Y., Bustamante C. 1996. Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules. *Science*. **271**, 795–799.
6. Leuba S., Karymov M., Tomschik M., Ramjit R., Smith P., Zlatanova J. 2003. Assembly of single chromatin fibers depends on the tension in the DNA molecule: magnetic tweezers study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 495–500.
7. Bennink M., Leuba S., Leno G., Zlatanova J., de Grooth B., Greve J. 2001. Unfolding individual nucleosomes by stretching single chromatin fibers with optical tweezers. *Nature Struct. Biology*. **8**, 606–610.
8. Rivetti C., Codeluppi S., Dieci G., Bustamante C. 2003. Visualizing RNA extrusion and DNA wrapping in transcription elongation complexes of bacteria and eukaryotic RNA polymerases. *J. Mol. Biology*. **326**, 1413–1426.
9. Rivetti C., Codeluppi S. 2001. Accurate length determination of DNA molecules visualized by atomic force microscopy: evidence for a partial B- to A-form transition on mica. *Ultramicroscopy*. **87**, 55–66.
10. Lyubchenko Y., Gall A., Shlyakhtenko L., Harrington R., Jacobs B., Oden P., Lindsay S. 1992. Atomic force microscopy imaging of double stranded DNA and RNA. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **10**, 589–606.
11. Lyubchenko Y., Shlyakhtenko L. 1997. Visualization of supercoiled DNA with atomic force microscopy in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**, 496–501.
12. Shlyakhtenko L., Gall A., Filonov A., Cerovac Z., Lushnikov A., Lyubchenko Y. 2003. Silatranebased surface chemistry for immobilization of DNA, protein – DNA complexes and other biological materials. *Ultramicroscopy*. **97**, 279–287.
13. Лиманский А. 2001. Исследование аминомодифицированной слюды как субстрата для атомно-силовой микроскопии нуклеиновых кислот. *Биополимеры и клетка*. **17**, 292–297.
14. Limansky A., Shlyakhtenko L., Schaus S., Henderson E., Lyubchenko Y. 2002. Aminomodified probes for atomic force microscopy. *Probe microscopy*. **2**, 227–234.
15. Butt H. 1991. Measuring electrostatic, van der Waals and hydration forces in electrolyte solutions with an atomic force microscope. *Biophys. J.* **60**, 1438–1444.
16. Hansma H., Golan R., Hsieh W., Daubendiek S., Kool E. 1999. Polymerase activities and RNA structures in the atomic force microscope. *J. Struct. Biol.* **127**, 240–247.
17. Cherny D., Jovin T. 2001. Electron and scanning force microscopy studies of alterations in supercoiled DNA tertiary structure. *J. Mol. Biol.* **313**, 295–307.
18. Tanigawa M., Okada T. 1998. Atomic force microscopy of supercoiled DNA structure on mica. *Anal. Chim. Acta*. **365**, 19–25.
19. Bussiek M., Mucke N., Langowski J. 2003. Polylysine-coated mica can be used to observe systematic changes in the supercoiled DNA conformation by scanning force microscopy in solution. *Nucleic Acids Res.* **31**, 1–10.
20. Лиманский А. 2002. Исследование аминомодифицированных зондов для атомно-силовой микроскопии биомолекул. *Биополимеры и клетка*. **18**, 62–70.
21. Лиманский А., Лиманская О. 2002. Изучение геномной ДНК микроорганизмов методом атомно-силовой микроскопии. *Цитология и генетика*. **36**, 30–36.
22. Мазур Дж., Джерниган Р., Сарай А. 2003. Конформационные эффекты при растяжении ДНК. *Молекуляр. биология*. **37**, 277–287.
23. Shlyakhtenko L., Gall A., Weimer J., Hawn D., Lyubchenko Y. 1999. Atomic force microscopy imaging of DNA covalently immobilized on a functionalized mica substrate. *Biophys. J.* **77**, 568–576.
24. Вологодский А. 1988. *Топология и физические свойства кольцевых ДНК*. М.: Наука.
25. Boles T., White, Cozzarelli N. 1990. Structure of plectonically supercoiled DNA. *J. Mol. Biol.* **213**, 931–951.
26. Conwell C., Vilfan I., Hud N. 2003. Controlling the size of nanoscale toroidal DNA condensates with static curvature and ionic strength. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 9296–9301.
27. Kемura K., Rybenkov V., Crisona N., Hirano T., Cozzarelli N. 1999. 13S Condensin actively reconfigures DNA by introducing global positive writhe: implications for chromosome condensation. *Cell*. **98**, 239–248.
28. Hizume K., Yoshimura S., Maruyama H., Kim J., Wada H., Takeyasu K. 2002. Chromatin reconstitution: development of a salt-dialysis method monitored by nanotechnology. *Arch. Histol. Cytol.* **65**, 405–413.
29. Yoshimura S., Hizume K., Murakami A., Sutani T., Takeyasu K., Yanagida M. 2002. Condensin architecture and interaction with DNA: regulatory non-SMC subunits bind to the head of SMC heterodimer. *Curr. Biol.* **12**, 508–513.
30. Поляничко А.М., Чихиржина Е.В., Андрущенко В.В., Костылева Е.И., Wieser H., Воробьев В.И. 2004. Влияние ионов Ca<sup>2+</sup> на компактизацию ДНК в комплексе с негистоновым хромосомным белком HMGB1. *Молекуляр. биология*. **38**, 701–712.
31. Лиманский А. 2003. Атомно-силовая микроскопия: от визуализации молекул ДНК и белков до измерения силы межмолекулярных взаимодействий. *Успехи соврем. биологии*. **123**, 531–542.
32. Newlin D., Miller K., Pilch D. 1984. Interactions of molecules with nucleic acids. VII. Intercalation and T–A specificity of daunomycin in DNA. *Biopolymers*. **23**, 139–158.