

О. ЛИМАНСЬКИЙ

Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України,  
вул. Пушкінська, 14, м. Харків-57, 61057, Україна

E-mail: alex.limanskii@mail.ru

Laboratory of Plasma Membrane and Nuclear Signaling,

Graduate School of Biostudies,

Kyoto University, Kyoto, 606-8502, Japan

## НАДСУПЕРСПІРАЛІЗАЦІЯ ТА КОМПАКТИЗАЦІЯ СУПЕРСПІРАЛЬНОЇ ДНК



Суперспіральна ДНК рGEMEX довжиною 3993 пари нуклеотидів, імобілізована на різних субстратах (свіжосколота слюда, стандартна та модифікована амінослюда), була візуалізована за допомогою атомно-силової мікроскопії. На модифікованій амінослюді, яка характеризується підвищеною поверхневою щільністю заряду, були візуалізовані як плектономічні молекули суперспіральної ДНК, так і молекули з надзвичайно високим рівнем компактизації, значення суперспіральної щільності яких значно вище порівняно з раніше досягнутими експериментально та розглянутими теоретично. При підвищенні рівня компактизації ДНК довжина осі надсуперспіралізованих молекул зменшується від ~390 до ~140 нм з наступним утворенням мінітороїдів діаметром ~50 нм та молекул сферичної конформації. На основі аналізу отриманих зображень запропоновано модель можливих конформаційних переходів суперспіральної ДНК *in vitro* за відсутності протеїнів при зростанні щільності суперспіралізації. Наші результати показують, що компактизація суперспіральних молекул ДНК до рівня мінітороїдів та сфероїдів обумовлена зростанням поверхневої щільності заряду та гідрофобності амінослюди.

© О. ЛИМАНСЬКИЙ. 2005

**Вступ.** Інтенсивне вивчення особливостей суперспіралізації ДНК завершилося на початку 90-х років минулого століття. Для дослідження топології суперспіральних ДНК (молекули, вісь яких може бути закрученою у вигляді спіралі, на відміну від лінійних молекул ДНК) були використані різноманітні біофізичні, біохімічні та молекулярно-генетичні методи. Використання методів малокутового рентгенівського розсіювання [1], гідродинамічного аналізу (вимірювання швидкості седиментації в залежності від суперспіральної щільності, іонної сили та ін.) [2], криоелектронної та електронної мікроскопії у поєднанні з використанням реакцій з топоізомеразами [3, 4], двовимірного гель-електрофорезу [5] дозволили встановити структуру негативно суперспіралізованої кільцевої ДНК у розчині. На основі сукупності експериментальних даних були побудовані моделі суперспіральних ДНК у розчині та при утворенні нуклеосоми — плектономічної та соленоїдальної ДНК відповідно [6]. Згідно з цими гіпотетичними моделями плектономічна та соленоїдальна, або тороїдальна, ДНК мають неоднакові рівні компактизації. Наприклад, радіус суперспіральної плектономічної ДНК складає 4,3 нм, а радіус тороїда — 25 нм для ДНК довжиною 4600 пар нуклеотидів (пн), яка має 57 надвитків [6].

Бурхливий розвиток нанобіології, починаючи з 90-х років минулого століття, пов'язаний з виникненням скануючої зондової мікроскопії (в першу чергу атомно-силової мікроскопії, АСМ), дозволив отримати зображення суперспіральних ДНК як після висушування зразка у повітрі, так і в буферних розчинах за умов, як припускали, наближених до фізіологічних [7—10]. Однак отримані зображення суперспіральних ДНК не дозволили зрозуміти або наблизитися до розуміння природи компактизації ДНК у клітині. В експериментах з візуалізації як суперспіральних ДНК, так і комплексів ДНК з білком не вдалось досягти того найвищого рівня компактизації ДНК, який є характерним як для бактеріальних клітин, так і для ядер еукаріотичних клітин. Відомо, що геномна ДНК величезної довжини (від міліметра до метра) упакована в більш високоупорядковані (висококомпактизовані) структури в бактеріях та ядрах еукаріот, обсяг яких складає усього лише від кількох одиниць до сотен кубічних мікрометрів. Згідно з сучасним баченням така компактизація ДНК еукаріот обумовлена взаємодією з ядерними протеїнами, в

першу чергу з гістоновими білками, та наступним утворенням нуклеосом [11].

В даній роботі ми вперше демонструємо зображення молекул суперспіральної ДНК *in vitro*, суперспіральна щільність яких значно перевищує як раніше експериментально досягнуті рівні компактизації, так і розглянуті теоретично. За умови підвищення гідрофобних властивостей субстрата (амінослюди) подальша надсуперспіралізація суперспіральних молекул ДНК веде до їхньої компактизації у мінітороїди та сфероїди. Отримані результати є експериментальним підтвердженням пророчих слів проф. М. Франк-Каменецького, сказаних 15 років тому, які могли б служити епіграфом до даної статті: «...ступінь суперспіралізації ДНК у клітині може бути значно вище, ніж могли б уявити найбільш амбіційні фізики та хіміки» [12].

**Матеріали та методи.** Підготовка зразків ДНК для АСМ. У роботі використовували суперспіральну ДНК рGEMEX1 довжиною 3993 пн («Promega», США). Свіжосколоту слюди, амінослюди та модифіковану амінослюду застосовували як субстрат. Для нанесення ДНК на свіжосколоту слюди використовували 10 мМ HEPES буфер, який містить 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>. Краплю розчину ДНК з концентрацією 0,1–1 мкг/мл у TE буфері (10 мМ трис-НСІ рН 7,9, 1 мМ ЕДТА) об'ємом 10 мкл наносили на смугу амінослюди або модифікованої амінослюди розміром 1 см<sup>2</sup>, промивали після двохвилинної експозиції деіонізованою водою, обдували потоком аргону та витримували зразок під тиском 100 мм рт. ст. протягом 20 хв. Процедура отримання стандартної амінослюди здійснювали згідно з [11, 13] за допомогою модифікації свіжосколотої слюди аміногрупами у парах перегнаного 3-амінопропілтриетоксисилана (АПТЕС). Модифіковану амінослюду одержували за допомогою невеликих змін технології отримання стандартної амінослюди. Дистиляцію АПТЕС («Aldrich», США) проводили за зменшеного тиску в атмосфері аргону.

Для аміномодифікації свіжосколоту слюди клали у скляний ексікатор з розчинами АПТЕС та N,N-діізопропілетиламіна на 1 год. Модифіковану слюду зберігали у ексікаторі в атмосфері аргону протягом одного місяця. Для приготування буферних розчинів та зразків ДНК використовували ультрачисту воду з питомим опором

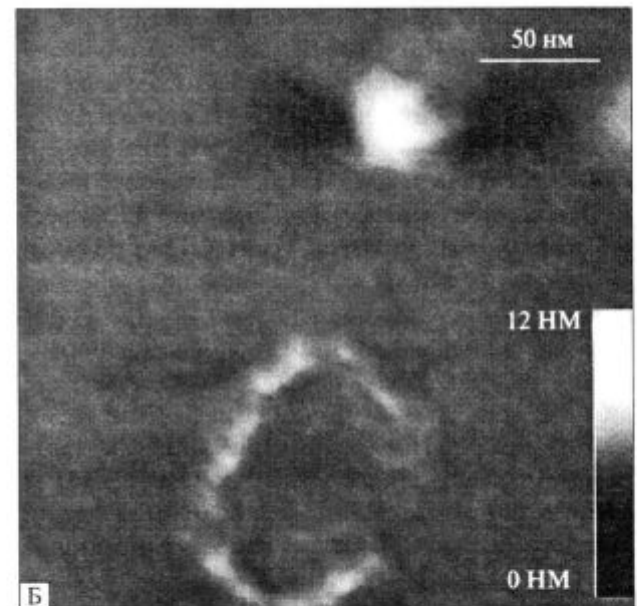
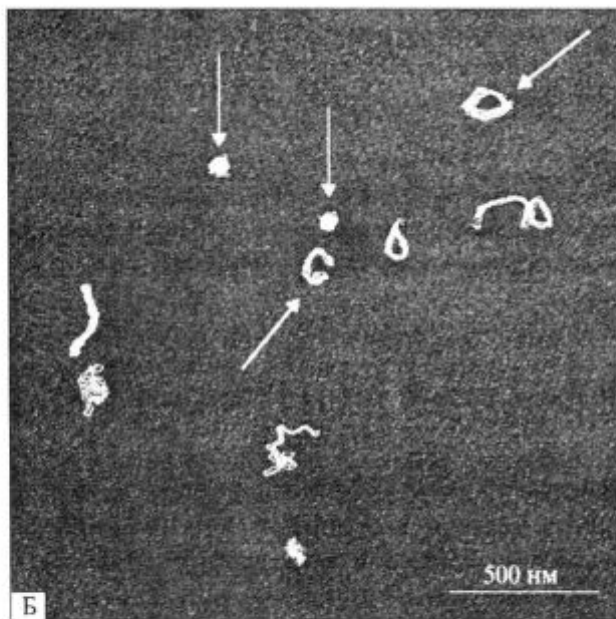
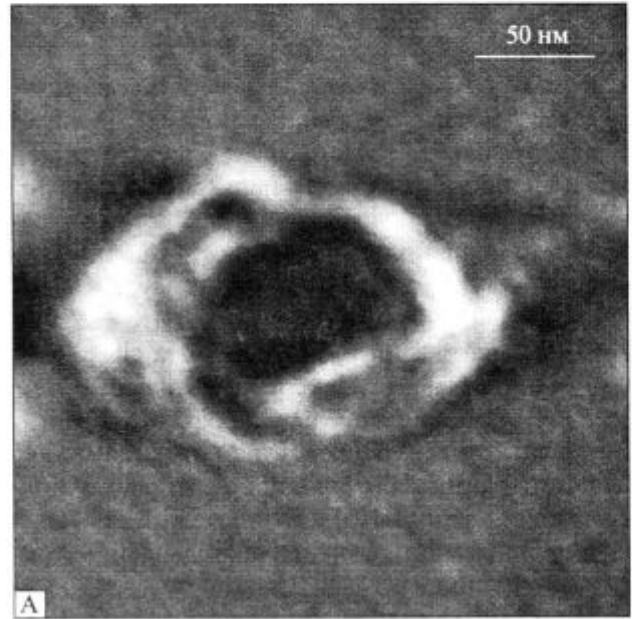
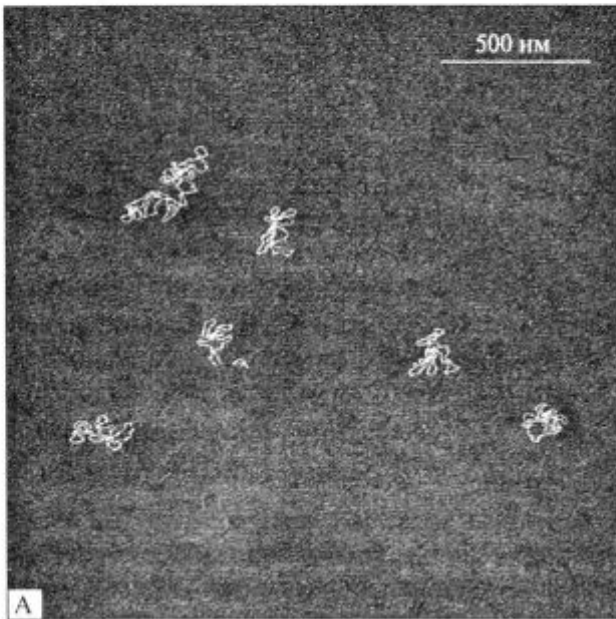
~17 Мом·см, отриману за допомогою установки Milli Q («Millipore», США).

**Атомно-силова мікроскопія.** Використовували атомно-силовий мікроскоп Nanoscope IV Multi Mode System (Veeco Instruments Inc., США) з Е-сканером. АСМ зображення ДНК були отримані за допомогою tapping mode АСМ у повітрі у режимі «висота» з використанням OMCL-TR кантиліверів (Olympus Optical Co., Японія) з резонансною частотою 340–360 кГц та константою твердості 42 Н/м. Зображення були отримані у форматі 512 × 512 пікселей, згладжені та проаналізовані за допомогою програмного забезпечення Nanoscope (версія 5.12r3, Veeco Instruments Inc., США).

**Результати досліджень та їх обговорення.** Будь-яка мікроскопічна техніка має кінцевою метою отримання якісного зображення об'єкта, яке в подальшому може бути проаналізовано, в тому числі з використанням теоретичного моделювання. Для характеристики ступеня суперспіралізації молекул ДНК безпосередньо із експериментально отриманих зображень (за допомогою АСМ, електронної мікроскопії) зручно використовувати кількість надвитків (вузли, створені віссю суперспіралі), яка зв'язана зі значенням суперспіральної щільності, що визначається теоретично, а також довжину осі компактизованої суперспіральної ДНК.

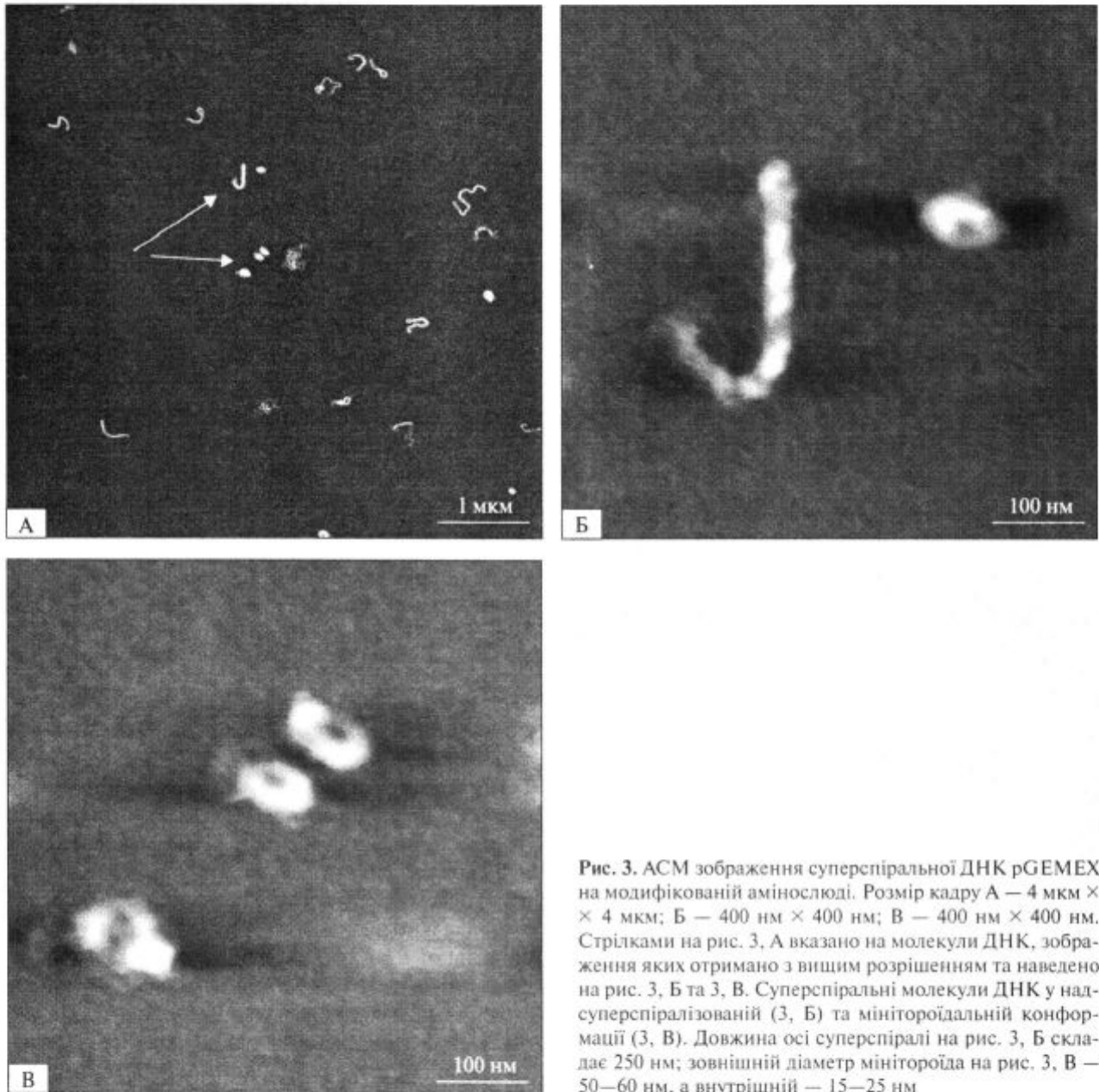
Наведене на рис. 1 АСМ зображення суперспіральної ДНК рGEMEX на стандартній (А) та модифікованій амінослюді (Б) дозволяє бачити величезні відмінності в конформації молекул ДНК, які іміобілізовані на субстраті з різною поверхневою щільністю аміногруп. Молекули ДНК на модифікованій амінослюді характеризуються значно більшою кількістю надвитків, що виражається в набагато більш високому рівні компактизації молекул. Продемонстроване на рис. 1, А зображення досить великого кадру (2 мкм × 2 мкм) є своєрідним індикатором якості зображення — поверхня амінослюди є абсолютно чистою або вільною від можливих домісних наночасток. Це означає, що і поверхня модифікованої амінослюди також є вільною від забруднень, а добре помітні сферичні утворення є молекулами ДНК з більш високим рівнем компактизації — сфероїдами.

Зображення молекул ДНК, на які вказують стрілки на рис. 1, Б, було отримано з більшим розрешенням. Так, на рис. 2, А можна бачити дві



**Рис. 1.** Зображення суперспіральної ДНК рGEMEX (довжина 3993 пн) у повітрі, отримане за допомогою атомно-силового мікроскопа після нанесення розчину ДНК у TE буфері на поверхню стандартної аміноследи (А) та поверхню модифікованої аміноследи (Б). Розмір кадру  $2 \times 2$  мкм. На 1, Б представлено суперспіральні молекули різної топології. Похилі стрілки вказують на молекули, що утворюють тороїд, та молекулу ДНК у конформації, що наближається до тороїду; вертикальні стрілки — на компактні молекули надспіралізованої ДНК, що знаходяться у сферичній конформації

**Рис. 2.** Зображення суперспіральної ДНК рGEMEX у тороїдальній конформації (А) та конформації, що наближена до тороїда (Б): А — розмір кадру  $225 \text{ нм} \times 225 \text{ нм}$ . Зовнішній діаметр тороїда дорівнює  $\sim 140 \text{ нм}$ , а внутрішній  $\sim 85 \text{ нм}$ . Б — розмір кадру  $250 \text{ нм} \times 250 \text{ нм}$ . Наведено шкалу градаций сірого, яка відповідає діапазону Z координати від 0 до 12 нм та дозволяє виміряти висоту молекули, що іммобілізована на поверхні модифікованої аміноследи. Висота сфероїда на рис. Б складає 5 нм, а довжина осі суперспіралі надспіралізованої ДНК — 250 нм

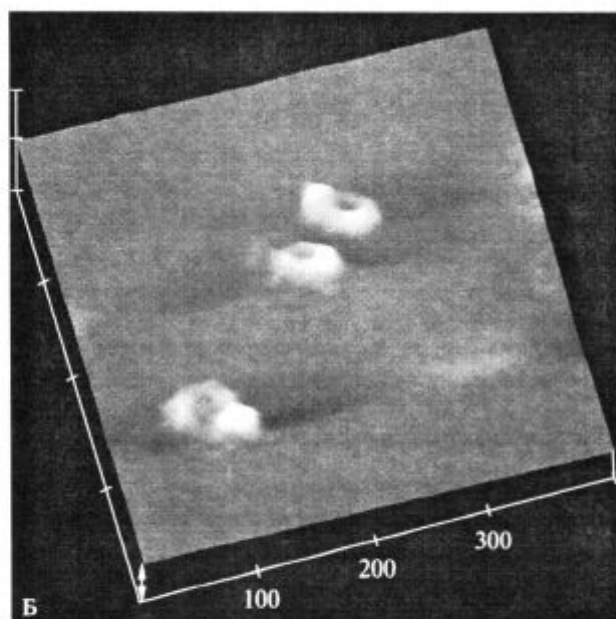
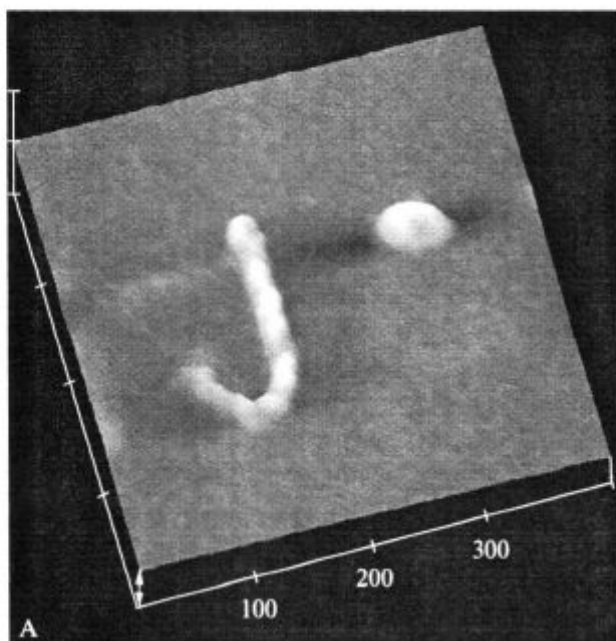


**Рис. 3.** АСМ зображення суперспіральної ДНК рGEMEX на модифікованій амінослюді. Розмір кадру А — 4 мкм × 4 мкм; Б — 400 нм × 400 нм; В — 400 нм × 400 нм. Стрілками на рис. 3, А вказано на молекули ДНК, зображення яких отримано з вищим розрішенням та наведено на рис. 3, Б та 3, В. Суперспіральні молекули ДНК у надспіралізованій (3, Б) та мініторіодальній конформації (3, В). Довжина осі суперспіралі на рис. 3, Б складає 250 нм; зовнішній діаметр мініторіода на рис. 3, В — 50–60 нм, а внутрішній — 15–25 нм

молекули ДНК, що утворили тороїд, а на рис. 2, Б — надспіралізовану молекулу ДНК, що знаходиться у конформації, наближеній до тороїда. Крім того, на рис. 2, Б наведено компактизовану молекулу ДНК у сферичній конформації. Необхідно зазначити, що програмне забезпечення АСМ дозволяє отримати кольорове зображення з відповідною кольоровою шкалою, за допомогою якої можна легко визначити висоту об'єкта, імобілізованого на слюді. В той же час визначи-

ти висоту молекули через аналіз чорно-білого зображення з відповідною шкалою градацій сірого набагато складніше. Висоту сферично компактизованої ДНК було визначено за допомогою кольорової шкали висоти, в той час як на рис. 2, Б наведено шкалу градацій сірого, різні відтінки якого відповідають висоті об'єкта від 0 (чорний колір) до 12 нм (білий колір). В даному випадку висота сферичної молекули ДНК складає 5 нм, діаметр — 35 нм, а об'єм сфероїда

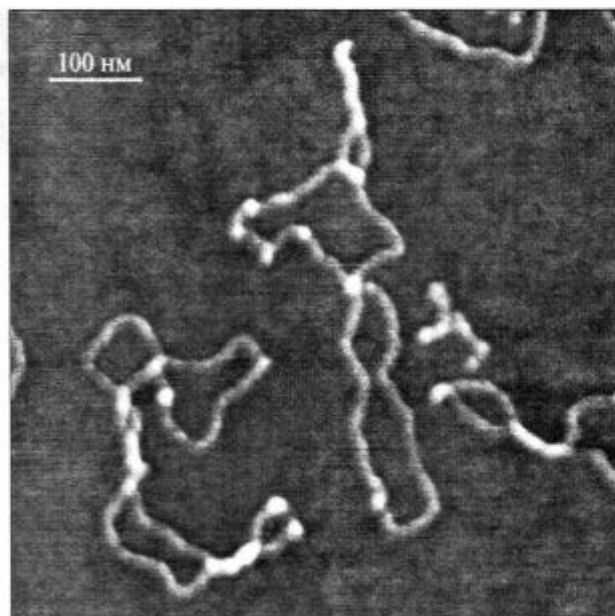




**Рис. 4.** Тривимірне зображення молекул суперспіральної ДНК рGEMEX, АСМ зображення яких для надсперспіралізованої ДНК (А) та мінітороїдальної ДНК (Б) наведено на рис. 3, Б та 3, В відповідно

~4800 нм<sup>3</sup>. Це значення збігається з теоретично визначеним об'ємом молекули ДНК рGEMEX, який дорівнює ~ 4500 нм<sup>3</sup>.

Наведені дані показують, що надспіралізація відбувається як для поодиноких молекул ДНК, так і для пар молекул (рис. 2, А). Так, пара



**Рис. 5.** АСМ зображення суперспіральної ДНК рGEMEX, отримане після нанесення краплі розчину ДНК в 10 мМ HEPES буфері, що містить 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, на поверхню свіжосколотої слюди. Розмір кадру 583 нм × 583 нм

надспіралізованих молекул ДНК на рис. 2, А утворює тороїд, зовнішній діаметр якого дорівнює ~140 нм, а внутрішній ~85 нм.

Інші топологічні варіанти компактизованих молекул ДНК, що було візуалізовано, наведено на рис. 3—6. Так, на рис. 3, Б можна бачити надспіралізовану молекулу ДНК рGEMEX, довжина осі суперспіралі якої складає 250 нм. Експериментально визначена нами довжина осі суперспіралі ДНК рGEMEX, наведеної на рис. 6, що містить 11 чітко помітних вузлів, або супервитків, складає ~390 нм. Раніше у роботі [3] було показано, що довжина осі суперспіралі залишається постійною при зміні суперспіралісної щільності та складає ~35 % довжини молекули. Нами вперше отримано зображення надспіралізованих молекул ДНК за такого рівня компактизації молекул ДНК, при якому при підвищенні суперспіралісної щільності вище певного значення довжина осі компактизованої суперспіралі зменшується від ~390 нм, що складає 32,5 % довжини ДНК рGEMEX, до ~250 нм (рис. 3, Б) та ~140 нм, або 12 % довжини ДНК. Подальше зменшення осі суперспіралі відбувається при компактизації молекул ДНК з утворенням молекул сферичної (рис. 3, Б) та мінітороїдальної

конформації (рис. 3, В). Характерні розміри мінітороїдів складають: зовнішній діаметр — 50–60 нм, внутрішній — 15–25 нм. Таким чином, у даній роботі вперше отримані зображення молекул суперспіральної ДНК, яка компактизована за відсутності білків у мінітороїди.

Цікаво відзначити, що довжина як кільцевої ДНК рGEMEX, експериментально визначена нами із АСМ зображення, так і суперспіральної ДНК складає ~1200 нм, в той час як теоретичне значення дорівнює ~1440 нм у припущенні В-форми ДНК.

На рис. 3, В наведено три мінітороїди, кожний з яких утворено за умови подальшої компактизації надспіралізованої ДНК. Згідно з раніше прийнятою термінологією тороїдальна молекула становить кільцеву нестабільну форму спіральної ДНК з нульовим значенням супервитків. Однак діаметр тороїда на рис. 3, В істотно менше діаметра відкритої кільцевої форми ДНК рGEMEX, що свідчить про значну конденсацію (компактизацію) даної молекули.

Подальша компактизація суперспіралізованої ДНК веде до утворення не тільки мінітороїдів з високим рівнем суперспіралізації (рис. 3, В), а також і сфероїдів (рис. 1, Б; 2, Б та рис. 6). Зображення таких висококомпактизованих сфероїдів та мінітороїдальних молекул були отримані нами багаторазово на різних ділянках модифікованої амінослюди, а також для кількох незалежних процедур модифікації слюди.

У даній роботі для вивчення компактизації суперспіральної ДНК були використані три різних субстрати. Зображення ДНК рGEMEX на двох із них — свіжосколотій слюді (з буфером, який містить іони магнію) (рис. 5) та стандартній амінослюді (рис. 1, А) — характеризуються відносно невисоким рівнем компактизації та відповідно значеннями суперспіральної щільності. Раніше отримані подібні зображення суперспіральних ДНК на аналогічних субстратах [7, 8], а також слюді, обробленій полілізином [9] або сперміном [8], відповідали суперспіральній щільності молекул  $\sigma = -0,05 \pm -0,12$ , в той час як в теоретичних дослідженнях граничне значення  $\sigma$  складало  $-0,07$  [14, 15].

Рис. 4, на якому показано тривимірне зображення надспіралізованих молекул ДНК у мінітороїдальній конформації, наочно демонструє, що використання модифікованої аміно-

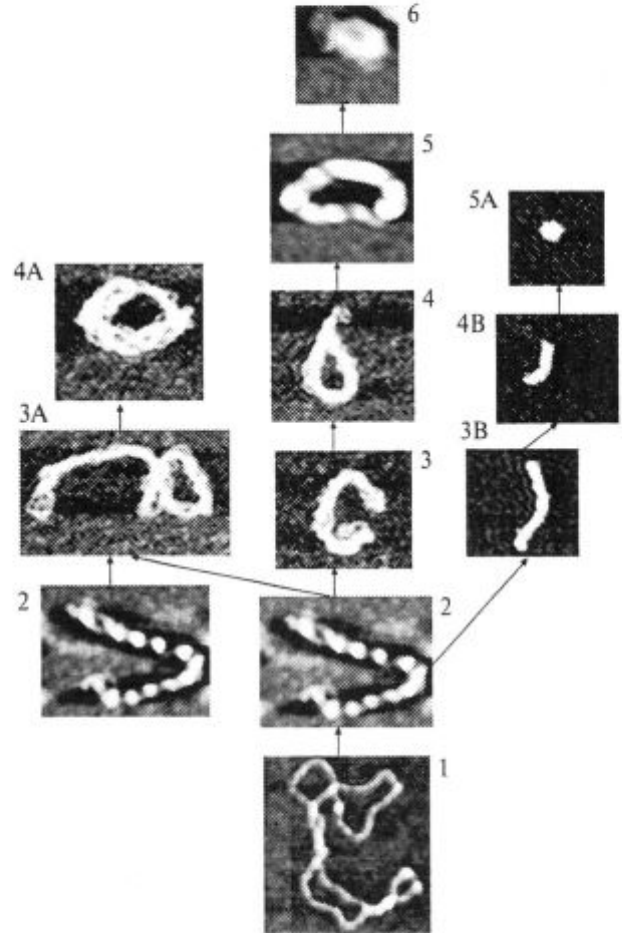


Рис. 6. Модель надспіралізації та компактизації суперспіральної ДНК, побудована на основі отриманих АСМ зображень суперспіральної ДНК рGEMEX на свіжосколотій та модифікованій амінослюді; 1 — плектономічна суперспіральна ДНК на поверхні свіжосколотої слюди з низькою поверхневою щільністю заряду; 2–6 — різні види надспіралізованих молекул ДНК, що компактизуються на поверхні модифікованої амінослюди під впливом високої поверхневої щільності заряду. Показано три можливих варіанти надспіралізації кільцевої ДНК (1) у сфероїд (5А), мінітороїд (6) та тороїд (4А). Тороїд (4А) утворено двома молекулами суперспіральної ДНК

слюди, яка відрізняється від стандартної амінослюди підвищеною щільністю аміногруп, тобто поверхневою щільністю заряду, та рівнем гідрофобності, веде до колосального збільшення ступеня компактизації іммобілізованих на ній молекул суперспіральної ДНК.

Таким чином, у даній роботі вперше показана компактизація суперспіральних молекул ДНК при підвищенні рівня суперспіралізації вище раніше отриманого максимального значення,

яка характеризується зменшенням довжини осі суперспіралізованої ДНК, а також утворенням молекул мінітороїдальної та сферичної конформації. Оскільки дана компактизація молекул ДНК досягнута на амінослюді з підвищеною поверхневою щільністю заряду, отримані результати показують, що компактизація ДНК може бути пояснена суперпозицією електростатичних та Ван-дер-ваальсових сил, що обумовлюють зв'язування ДНК з амінослюдою [13]. Отже основною причиною істотної компактизації ДНК *in vitro* є зміна гідрофобних та сольватаційних властивостей модифікованої амінослюди, на якій були іміобілізовані молекули ДНК. Отримані результати дозволяють зрозуміти природу фундаментальних процесів компактизації та конденсації молекул ДНК.

На основі аналізу отриманих зображень надспіралізованої ДНК на свіжосколотій слюді, стандартній та модифікованій амінослюді нами запропоновано модель можливих структурних конформаційних переходів суперспіралізованої ДНК при зростанні щільності суперспіралізації (рис. 6).

За умови екранізації негативних зарядів фосфатних груп ДНК та зменшення відштовхування сегментів ДНК на першому етапі утворюються суперспіралі молекули ДНК з максимальним рівнем суперспіралізованої щільності без зменшення довжини осі суперспіралі (молекула 2 на рис. 6). Подальша компактизація можлива як для поодиноких молекул ДНК (3 та 3В на рис. 6), так і для пар молекул (3А на рис. 6). І молекули, і пари молекул суперспіралізованої ДНК утворюють тороїди (5 та 4А на рис. 6), діаметр яких дорівнює ~115 та ~140 нм відповідно.

В той же час поодинокі молекули надспіралізованої ДНК утворюють мінітороїди характерного розміру: зовнішній діаметр дорівнює ~50–60 нм, а внутрішній ~15–25 нм (6 на рис. 6). Крім тороїдів та мінітороїдів, надспіралізовані молекули ДНК компактизуються з поетапним зменшенням довжини осі суперспіралі (3В та 4В на рис. 6) та утворенням молекул сферичної конформації, діаметр яких дорівнює ~35 нм (5 на рис. 6).

Цікаво відзначити, що раніше у експериментальних та теоретичних дослідженнях було встановлено утворення тороїдів декількома молекулами ДНК. Так, наприклад, за допомогою

електронної мікроскопії було встановлено, що у буфері з гексаміном кобальту ДНК довжиною 3000 пн утворює тороїди, кожний з яких містить від 6 до 32 молекул ДНК [16]. Нами показано утворення тороїдів, мінітороїдів та сфероїдів поодинокими суперспіралізованими молекулами ДНК. Що стосується мінітороїдальної ДНК, то утворення мінітороїдів надспіралізованими молекулами ДНК навіть не було передбачено у теоретичних дослідженнях [3, 5, 12, 14, 15, 17]. Більше того, загально визнаним фактом [18–20] при утворенні нуклеосом, хромосом та подібних високоорганізованих структур є накручування ДНК на октамер гістонових білків. Крім того, відомо, що молекули ДНК конденсуються у тороїди та короткі стрижні за різних умов. У більшості випадків для утворення тороїдів використовують такі полікатіони, як протамін [21], спермідин, полілізин [22], що утворюють комплекси з молекулами ДНК. Також у роботі [23] було продемонстровано, що поверхня слюди, оброблена моновалентними або мультивалентними катіонними силанами, призводить до конденсації та агрегації молекул ДНК з утворенням стрижнів та тороїдів.

Таким чином, наведені в даній роботі результати наочно демонструють надспіралізацію, компактизацію та утворення закручених молекул ДНК (тобто тороїдів та мінітороїдів) під впливом тільки адгезивних властивостей аміномодифікованої слюди, за відсутності будь-яких білків або інших молекул.

*Ця робота була частково підтримана Japanese Society for the Promotion of Science (Японія). Автор висловлює подяку д-ру Лиманській О. за допомогу та критичні зауваження при підготовці статті.*

**SUMMARY.** Supercoiled DNA pGEMEX with length of 3993 nucleotides was immobilized on the different substrates (freshly cleaved mica, standard aminomica and modified aminomica) and visualized by atomic force microscopy. Plectonomically supercoiled DNA molecules as well as molecules with extremely high level of compactization (i.e. molecules with considerably higher supercoiled density values in comparing with experimentally measured and theoretically investigated ones) were visualized on modified aminomica. At the further increasing of the compactization level an axis length of oversupercoiled molecules was decreased from ~390 nm to ~140 nm and formation of minitoroids of ~50 nm diameter and molecules in sphere conformation were observed. Model of possible conformational transitions of supercoiled DNA was proposed basing on the analysis of captured AFM images at the increasing of supercoiling density.

**РЕЗЮМЕ.** Суперспіральна ДНК pGEMEX довжиною 3993 пари нуклеотидів, іммобілізована на різних субстратах (свежескочотий сльода, стандартна і модифікована аminosльода), була візуалізована за допомогою атомно-силової мікроскопії. На модифікованій аminosльоді були візуалізовані як плектономічні молекули суперспіраліної ДНК, так і молекули з надзвичайно високим рівнем компактизації, значення суперспіраліної щільності яких значно вище за порівнянням з раніше досягнутими експериментально і розглянутими теоретично. При підвищенні рівня компактизації ДНК довжина осі суперсуперспіралізованих молекул зменшується від -390 до -140 нм з наступним утворенням тороїдів діаметром ~50 нм і молекул у сферичній конфігурації. На основі аналізу отриманих зображень запропонована модель можливих конфігураційних переходів суперспіраліної ДНК при збільшенні щільності суперспіралізації.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Brady G., Fein D., Lambertson H., Grassian V., Foos D., Benham C. X-ray scattering from the superhelix in circular DNA // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1983. — **80**, № 3. — P. 741–744.
2. Upholt W., Gray H., Vinograd J. Sedimentation velocity behavior of closed circular SV40 DNA as a function of superhelix density, ionic strength, counterion and temperature // *J. Mol. Biol.* — 1971. — **61**, № 1. — P. 21–38.
3. Boles T., White J., Cozzarelli N. Structure of plectonically supercoiled DNA // *J. Mol. Biol.* — 1990. — **213**. — P. 931–951.
4. Cherny D., Jovin T. Electron and scanning force microscopy studies of alterations in supercoiled DNA tertiary structure // *J. Mol. Biol.* — 2001. — **313**. — P. 295–307.
5. Rybenkov V., Vologodskii A., Cozzarelli N. The effect of ionic conditions on DNA helical repeat, effective diameter and free energy of supercoiling // *Nucl. Acids Res.* — 1997. — **25**. — P. 1412–1418.
6. Cozzarelli N., Boles N., White J. Primer on the topology and geometry of DNA supercoiling DNA topology and biological effects / Ed. J. Wang. — Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990. — P. 139–184.
7. Lyubchenko Y., Shlyakhtenko L. Visualization of supercoiled DNA with atomic force microscopy in situ // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1997. — **94**. — P. 496–501.
8. Tanigawa M., Okada T. Atomic force microscopy of supercoiled DNA structure on mica // *Anal. Chim. Acta.* — 1998. — **365**. — P. 19–25.
9. Bussiek M., Mucke N., Langowski J. Polylysine-coated mica can be used to observe systematic changes in the supercoiled DNA conformation by scanning force microscopy in solution // *Nucl. Acids Res.* — 2003. — **31**, № 22. — P. 1–10.
10. Oussatcheva E., Pavlicek J., Sankey O., Sinden R., Lyubchenko Y., Potaman V. Influence of global DNA topology on cruciform formation in supercoiled DNA // *J. Mol. Biol.* — 2004. — **338**. — P. 735–743.
11. Лиманский А. Атомно-силовая микроскопия: от визуализации молекул ДНК и белков до измерения силы межмолекулярных взаимодействий // *Усп. соврем. биологии.* — 2003. — **123**, № 6. — С. 531–542.
12. Frank-Kamenetskii M. DNA supercoiling and unusual structures DNA topology and biological effects / Ed. J. Wang. — Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990. — P. 186–215.
13. Лиманский А. Исследование аминомодифицированной сльоды как субстрата для атомно-силового микроскопии нуклеиновых кислот // *Биополимеры и клетка.* — 2001. — **17**, № 4. — С. 292–297.
14. Vologodskii A., Levene S., Klenin K., Frank-Kamenetskii M., Cozzarelli N. Conformational and thermodynamic properties of supercoiled DNA // *J. Mol. Biol.* — 1992. — **227**. — P. 1224–1243.
15. Fujimoto B., Schurr J. Monte Carlo simulations of supercoiled DNAs confined to a plane // *Biophys. J.* — 2002. — **82**. — P. 944–962.
16. Conwell C., Vilfan I., Hud N. Controlling the size of nanoscale toroidal DNA condensates with static curvature and ionic strength // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2003. — **100**, № 16. — P. 9296–9301.
17. Vologodskii A., Cozzarelli N. Conformational and thermodynamic properties of supercoiled DNA // *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* — 1994. — **23**. — P. 609–643.
18. Sato M., Ura K., Hohmura K., Tokumasu F., Yoshimura S., Hanaoka F., Takeyasu K. Atomic force microscopy sees nucleosome positioning and histone H1-induced compaction in reconstituted chromatin // *FEBS Lett.* — 1999. — **452**. — P. 267–271.
19. Leuba S., Karymov M., Tomschik M., Ramjit R., Smith P., Zlatanova J. Assembly of single chromatin fibers depends on the tension in the DNA molecule: magnetic tweezers study // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2003. — **100**, № 2. — P. 495–500.
20. Hoshi O., Ushiki T. Three-dimensional structure of G-banded human metaphase chromosomes observed by atomic force microscopy // *Arch. Histol. Cytol.* — 2001. — **64**, № 5. — P. 475–482.

Надійшла 22.11.04