

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

АРМЕЕВ ГРИГОРИЙ АЛЕКСЕЕВИЧ

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ НУКЛЕОСОМ И ИХ КОМПЛЕКСОВ С БЕЛКАМИ
ХРОМАТИНА МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ**

Специальность 03.01.09
«Математическая биология, биоинформатика»

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Научные руководители:

к. ф.-м. н.
Шайтан Алексей Константинович

д. ф.-м. н., профессор
Шайтан Константин Вольдемарович

Москва – 2018

Оглавление

Введение	5
Глава 1. Обзор литературы	12
1.1. Структура и динамика нуклеосом	12
1.2. Изучение динамики нуклеосом методами МД	21
1.3. Методы молекулярного моделирования, основанные на интеграции разнородных экспериментальных данных	22
1.4. Ферстеровский резонансный перенос энергии	23
1.5. Определение контактов ДНК-белок с применением перекисного расщепления ДНК	37
Глава 2. Методы молекулярного моделирования и анализа экспериментальных данных	40
2.1. Метод молекулярной динамики	40
2.2. Метод интегративного моделирования нуклеосом и их комплексов	45
2.3. Измерение spFRET, квантовых выходов и коэффициента детекции микроскопа	50
Глава 3. Исследование динамики нуклеосом методом полноатомной МД	52
3.1. Изучение стабильности и окружения нуклеосом	52
3.2. Изучение динамических мод в нуклеосомах	57
Глава 4. Определение структуры нуклеосом и их комплексов с белками хроматина разработанными методами моделирования	64
4.1. Разработанный подход и его ограничения	64
4.2. Определение предпочтительной последовательности ДНК в нуклеосоме, содержащей линкерный гистон	65
4.3. Модель нуклеосомы с линкерным гистоном H1	67
4.4. Определение позиционирования ДНК на нуклеосомах	69
4.5. Модель разворачивания ДНК и потери гистонов при взаимодействии с гистоновым шапероном FACT	71
4.6. Модель компактных динуклеосом	74
Глава 5. Разработанные программы	79
5.1. Программа для обработки интегрированного по времени сигнала флуоресценции	79
5.2. Программа для обработки профилей перекисного расщепления ДНК	80

Заключение	83
Список литературы	86

Список сокращений

FRET - Ферстеровский резонансный перенос энергии

FACT - FAcilitates Chromatin Transcription, гистоновый шаперон

spFRET - Ферстеровский резонансный перенос энергии, измеренный от одиночных частиц

ЛГ - линкерный гистон

ПТМ - посттрансляционные модификации

PCA - рентгеноструктурный анализ

ЯМР - ядерный магнитный резонанс

ЭМ - электронная микроскопия

Введение

Диссертационная работа посвящена моделированию структуры нуклеосом и их комплексов с белками хроматина методами молекулярного моделирования. В работе произведено описание структуры и конформационной динамики нуклеосом, приведено описание разработанных в ходе диссертации методов молекулярного моделирования нуклеосом и обработки экспериментальных данных об эффективности Ферстеровского резонансного переноса энергии и профилей интенсивности перекисного расщепления ДНК. В работе описаны особенности структуры и конформационной динамики нуклеосом, исследованные методом молекулярной динамики. Предложены оригинальные методы молекулярного моделирования для изучения структуры и динамики нуклеосом на основании экспериментальных данных. Предложен метод поиска нуклеотидных последовательностей, удовлетворяющих конформации ДНК в комплексах нуклеосом с белками хроматина. Разработанные методы применены для построения моделей комплекса нуклеосомы с линкерным гистоном, компактных динуклеосом, нуклеосом с гистоновым вариантом СenH3, а также предложены модели разворачивания нуклеосом гистоновым шапероном FACT.

Актуальность работы

Нуклеосомы являются основным структурным элементом хроматина и отвечают не только за компактизацию, но и за регуляцию процессов транскрипции, reparации и репликации ДНК. Нуклеосомы - весьма вариабельные объекты, их состав может значительно различаться, гистоны могут подвергаться посттрансляционным модификациям. Гистоны одного типа могут иметь значительные различия в последовательности и длине, такие подтипы называют гистоновыми вариантами. Разнообразие гистонов при их

высокой консервативности свидетельствует о высокой функциональной значимости различных гистоновых вариантов. Изменение гистонового состава нуклеосом, связывание с белками хроматина изменяет не только структуру нуклеосом, но и их динамические свойства, которые во многом определяют компактизацию и доступность хроматина для взаимодействий с белками ядра клетки.

Понимание молекулярных основ функционирования хроматина затруднено в связи с ограниченностью экспериментальных методик в определении параметров взаимодействий ДНК с гистонами, транскрипционными факторами и структурными белками на молекулярном уровне. Экспериментальные методы вроде рентгеноструктурного анализа (РСА), ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и электронной микроскопии (ЭМ) в состоянии определить строение молекулярных комплексов, которые обладают компактной и упорядоченной структурой. В то же время все больший интерес привлекают к себе структуры, не отличающиеся строгой упорядоченностью. Описание хроматина в них должно происходить не в рамках одиночных структур, а в рамках различных конформационных ансамблей.

Так как прямое изучение структуры и динамики крупных нуклеосомных комплексов на данный момент затруднено, для получения информации об их структуре, подвижности можно использовать набор косвенных подходов. С одной стороны, нуклеосомы можно изучать методом молекулярной динамики (МД) и сопоставлять результаты моделирования с экспериментальными данными. Третья глава диссертации посвящена исследованию конформационных перестроений внутри нуклеосом методом МД. С другой стороны можно создавать молекулярные модели на основании набора различных результатов экспериментов. Такой подход в последние годы получил название интегративного моделирования (*integrative modeling*) и

реализован в ряде специализированных программ, однако на данный момент существующее программное обеспечение непригодно для создания молекулярных моделей комплексов ДНК-белок в полуавтоматическом режиме. По этой причине, разработка методов построения моделей нуклеосом в комплексе с белками на основании разнообразных косвенных методов определения структуры является весьма актуальной. Четвертая глава работы посвящена описанию разработанных методов молекулярного моделирования, основанных на интеграции экспериментальных данных в процесс моделирования (ИММ - интегративных методов моделирования), и их применения для изучения структуры и динамики нуклеосом.

Другой актуальной проблемой современной науки является воспроизводимость экспериментов и воспроизводимость протоколов обработки экспериментальных данных. Одним из способов решения данной проблемы является обеспечение доступа к программному обеспечению и протоколам обработки данных. По этой причине, исходные коды ПО, разработанного в ходе выполнения диссертации, опубликованы и доступны для научного сообщества.

Цель диссертационной работы

Целью данной работы явилось изучение структуры и конформационной подвижности нуклеосом и их комплексов различными методами молекулярного моделирования на основе интеграции различных типов экспериментальных данных.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать ключевые моды структурной динамики нуклеосом методами полноатомной молекулярной динамики.
2. Разработать метод молекулярного моделирования нуклеосом на основании данных об эффективности Ферстеровского резонансного переноса энергии (spFRET), анализа профилей гидроксильного расщепления ДНК, а также данных о локальной жесткости ДНК.

3. Используя разработанный метод, изучить конфигурации различных комплексов нуклеосом, а именно: изучить комплексы нуклеосом с линкерными гистонами, изучить перестроения в нуклеосомах при их связывании с гистоновым шапероном FACT; изучить структуру компактных динуклеосом.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Полноатомная молекулярная динамика позволяет выявлять и исследовать функционально-важную подвижность структуры нуклеосом.
2. Разработанный метод молекулярного моделирования позволяет реконструировать нуклеосомы и их комплексы по данным spFRET и гидроксильного футпринтинга.
3. Модели нуклеосом, взаимодействующих с гистоновым шапероном FACT, а также модели компактных динуклеосом, построенные методами интегративного моделирования, отличаются большей степенью откручивания ДНК, чем одиночные нуклеосомы.

Научная новизна

Работа посвящена актуальной теме исследования структуры и динамики хроматина. Работа хроматина в целом определяет функциональное состояние клетки, а нарушения его упаковки и функционирования влекут за собой серьезные последствия. Изучение принципов устройства хроматина, а также белков, влияющих на его функции, необходимо для поиска новых мишней для создания лекарственных препаратов.

В работе показана стабильность молекулярных моделей нуклеосом на рекордных временах моделирования до 1 мкс, показано влияние ионного окружения и распределения поверхностных зарядов гистонов на процесс откручивания ДНК.

В работе предлагается оригинальная методика создания моделей комплексов ДНК-белок. Данная методика может быть использована для построения начальных моделей при изучении структуры и динамики крупных молекулярных комплексов с помощью лазеров на свободных электронах. Методика также может быть применена для проверки и дополнения данных, связанных со структурой и динамикой макромолекул.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая и практическая значимость работы обусловлена ее новизной и заключается в комбинации результатов исследования конформационной подвижности нуклеосом методом МД и предложенных новых методов молекулярного моделирования нуклеосом. Результаты исследования углубляют современные представления о механизмах формирования нуклеосом и аспектах их конформационной динамики. Полученные результаты позволяют предлагать новые структурные модели комплексов нуклеосом с белками хроматина для детальной интерпретации экспериментальных данных.

Степень достоверности и апробация результатов

Работа выполнена с применением современных методов исследования. Применяемые методы соответствуют целям и задачам, которые установлены в исследовании. Для анализа результатов применяются современные методы обработки данных. Результаты работы согласуются с литературными источниками, что свидетельствует о ее достоверности. Научные выводы наглядно проиллюстрированы, обоснованы и соответствуют полученным результатам. Основные результаты работы и материалы диссертации были представлены и обсуждались на конференциях:

- «Microscopy and Microanalysis», США, 2018;
- «The 43th FEBS Congress», Прага, Чехия, 2018;

- «5th International Congress on Microscopy & Spectroscopy (INTERM 2018)», Oludeniz, Турция, 2018;
- «Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2018»», Москва, Россия, 2018;
- «Cold Spring Harbor Laboratory international meeting on “THE PARP FAMILY & ADP-RIBOSYLATION”», Cold Spring Harbor Laboratory, США, 2018;
- «Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB'17)», Москва, Россия, 2017;
- «Российская международная конференция по криоэлектронной микроскопии RICCEM-2017», Москва, Россия, 2017;
- «Chromatin and Epigenetics», Гейдельберг, Германия, 2017;
- «Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology "Genomic instability and DNA repair"», Санта Фе, США, 2017;
- «Первый Российский кристаллографический конгресс», Москва, Россия, 2016;
- «Biophysical Society 60th Annual Meeting», Los Angeles, США, 2016;

Публикации

Основные результаты по теме диссертации опубликованы в 10 статьях в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI [1–10].

Личный вклад автора

Автором созданы и подготовлены к моделированию модели нуклеосом и их комплексов. Автором созданы программные коды для анализа и визуализации результатов исследования динамики нуклеосом методом молекулярной динамики. Автору принадлежит идея и реализация программ для обработки данных spFRET, измеренных на микроскопе Zeiss LSM 710, программ для создания молекулярных моделей нуклеосом и их комплексов.

Автором произведены измерения всех необходимых корректировочных коэффициентов для расчета расстояний spFRET, создан графический интерфейс и часть алгоритма программы для анализа и предсказания профилей гидроксильного футпринтинга HYDROID [6].

Эксперименты по измерению spFRET от исследуемых объектов проведены сотрудниками группы исследования регуляции транскрипции кафедры биоинженерии (в частности измерения spFRET в работах [1,3]). Измерения профилей гидроксильного футпринтинга нуклеосом с гистоновым вариантом СенН3 произведены сотрудниками лаборатории биохимии и молекулярной биологии Национального института рака, Национальных институтов здоровья США (в частности измерения в работе [5]).

Глава 1.

Обзор литературы

1.1. Структура и динамика нуклеосом

Генетическая информация, закодированная в виде последовательности нуклеотидов в линейной молекуле ДНК, суммарная длина которой в развернутом состоянии может достигать нескольких метров, размещается в эукариотических клетках в весьма ограниченной области пространства - ядре клетки, размеры которого не превышают 10 мкм. Компактизация молекул ДНК при одновременном обеспечении доступа белковых факторов к необходимым участкам генома и комплексная регуляция доступа – основные функции хроматина. На первом этапе компактизации ДНК наибольшее значение играет взаимодействие ДНК с белками – гистонами и формирование нуклеосом. Понимание структуры и организации взаимодействий в нуклеосомах является важным этапом на пути изучения структуры и динамики хроматина.

При описании структуры хроматина принято использовать следующие термины: ядро нуклеосомной частицы (nucleosome core particle) - комплекс из восьми гистонов и 145-147 пар нуклеотидов. Термин нуклеосома принято понимать как ядро нуклеосомной частицы вместе с линкерными участками ДНК, соединяющими соседние нуклеосомы (Рис. 1). Нуклеосому, связанную с линкерным гистоном H1, называют хроматосомой. Далее по тексту термины нуклеосома и ядро нуклеосомной частицы следует считать синонимичными.

1.1.1. Структура нуклеосом

Структура нуклеосом долгое время после их открытия в 1974 году Р. Корнбергом [11] оставалась неясной, было построено множество моделей, от близких к современным представлениям до довольно экстравагантных. В 1984

году методами рентгеновской кристаллографии была определена первая структура нуклеосомы низкого разрешения [12], а в 1997 году получена структура с атомарным разрешением [13].

Нуклеосома представляет собой октамер белков гистонов, который несет на себе 145-147 нуклеотидных пар. ДНК закручена вокруг октамера, образуя 1,65 витка левозакрученной суперспирали, то есть ДНК отрицательно сверхспириализована. Белковое ядро нуклеосомы образует цилиндр диаметром 65 Å и высотой 60 Å. Для нуклеосомы характерна ось псевдосимметрии второго порядка – диадная ось. В ядро нуклеосомы входит четыре семейства гистонов H3, H4, H2A и H2B, каждый из гистонов представлен дважды (Рис. 1). Восемь гистонов нуклеосомы собраны в четыре гетеродимера: два H3-H4 и два H2A-H2B. Каждое семейство гистонов включает в себя множество гистоновых вариантов, несмотря на то, что гистоны являются одними из самых консервативных белков наравне с рибосомальными белками. Например, в ядрах клеток *Arabidopsis arenosa* обнаружено 13 вариантов H2A, 11 – H2B, 9 – H3 и 1 – H4, зачастую одну форму гистона кодирует несколько генов [14], находящихся в так называемых гистоновых кластерах.

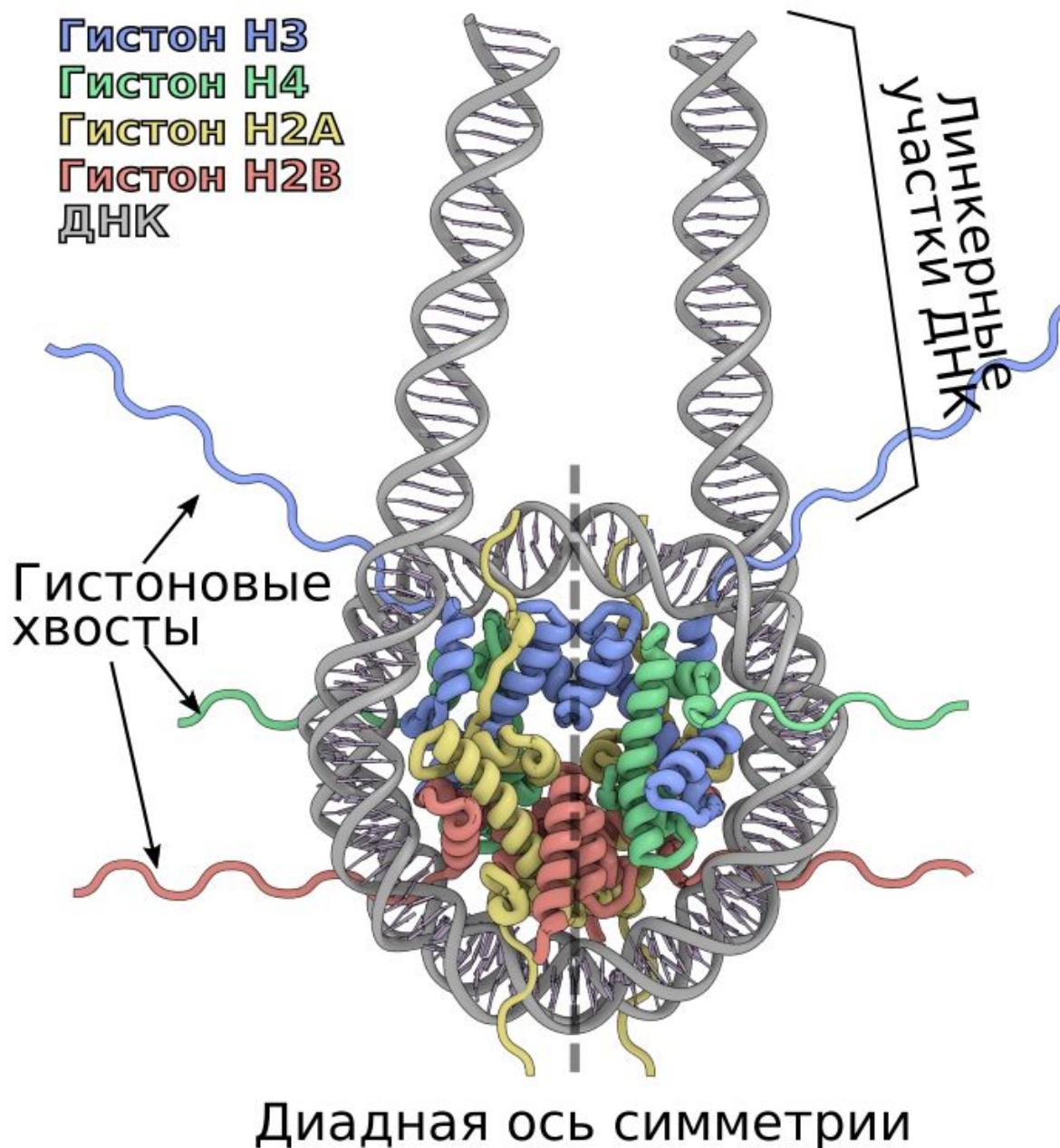


Рисунок 1. Визуализация нуклеосомы, ДНК и белок отображены в виде вторичной структуры. Визуализация построена по структуре с кодом 1KX5 банка данных PDB [15].

На 145-147 нуклеотидных пар, размещенных на гистонном октамере, приходится 14 сайтов связывания. Контакты ДНК с гистонами обеспечиваются в основном за счет фосфодиэфирных группировок сахарофосфатного остова, таким образом, образование контактов прямо не зависит от последовательности. Сборка нуклеосом в живой клетке происходит при

помощи сложной системы белков шаперонов [16], которые также могут быть специфичны для различных вариантов гистонов.

1.1.2. Динамические характеристики нуклеосом

Нуклеосома – подвижная структура, которой свойственны как высокочастотные тепловые движения, так и крупномасштабные конформационные перестройки. Исходя из распределения В-факторов в кристаллических структурах, подвижность ДНК значительно выше, нежели подвижность белковой составляющей нуклеосомы.

Некоторые динамические моды свойственны лишь компактным нуклеосомам (таким нуклеосомам, которые похожи на кристаллографические), другие динамические моды отличаются большой амплитудой и приводят к потере гистонов, формируя разнообразные нуклеосомные интермедиаты. Состав нуклеосом сам по себе определяет разнообразие их динамических мод: в некоторые моды вовлечена лишь ДНК, в иные моды лишь гистоны, ряд мод отличается кооперативной подвижностью ДНК и гистонов. Обзор динамических мод приведен на Рис. 2

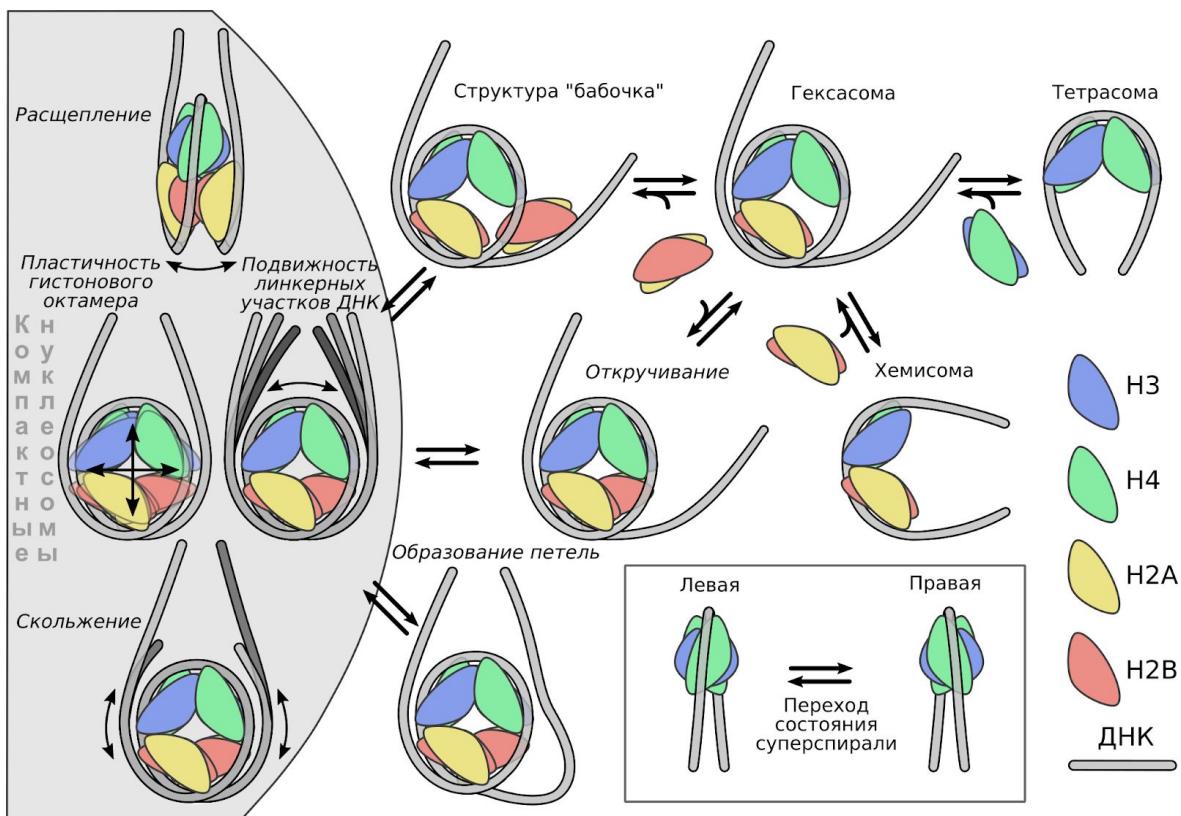


Рисунок 2. Интермедиаты и моды динамики нуклеосом.

1.1.2.1. Подвижность внутри компактных нуклеосом

Наиболее подвижным участком нуклеосомы является линкерная ДНК, с этой областью связывается гистон H1 и ряд транскрипционных факторов. Подвижность этого участка делает затруднительным его исследование при помощи рентгеноструктурного анализа и криоэлектронной микроскопии. Однако, его подвижность можно исследовать при помощи экспериментов spFRET [17].

Нуклеосомы способны к самосборке на множество разнообразных последовательностей ДНК, на данный момент неизвестно каким образом происходит отбор последовательностей для посадки нуклеосом. Даже после сборки нуклеосомы на ДНК, гистоновый октамер способен передвигаться относительно позиционирующей последовательности. Такую подвижность называют скольжением нуклеосом (nucleosome sliding, Рис. 2). Впервые

скольжение было показано на 5S ДНК морского ежа [18], влияние последовательности ДНК на скольжение неоднозначно и детально рассмотрено в обзоре [19]. Механизм скольжения нуклеосом на данный момент мало изучен. Так как простое “прокручивание” ДНК было бы энергетически невозможно, предлагается два гипотетических механизма: распространение дефекта скручивания и формирование внутренних петель ДНК. Спонтанное формирование петель ДНК в нуклеосомах было недавно показано в работе [20] с применением атомно-силовой микроскопии с высоким временным разрешением.

Другой модой подвижности компактных нуклеосом является их “расщепление” (gaping, Рис. 2). В ходе этого движения изменяется расстояние между соседними витками ДНК вдоль оси суперспирали. Эта мода подвижности интересна тем, что была предсказана в 2003 году [21] и показана экспериментально (на интактных нуклеосомах) лишь в 2015 [22]. Однако на данный момент неизвестно однозначно происходит ли перестройка гистонового октамера в ходе таких движений или зарегистрированные изменения являются следствием изменения конформации ДНК.

1.1.2.2. Крупномасштабная подвижность нуклеосом

Одной из важнейших мод подвижности в нуклеосоме является откручивание ДНК (unwrapping). Этую моду также называют breathing и uncoiling. Эта подвижность ведет к открытию сайтов связывания ДНК на гистонах и принимает активное участие во взаимодействиях со множеством факторов. В малых масштабах откручивание ДНК обратимо [23], в то время как большие степени откручивания ведут к потере димеров гистонов H2A-H2B. При потере гистонов формируются гексасомы и тетрасомы (Рис. 2). Процесс откручивания был детально показан в работе [24]. В этой работе наблюдали потерю димера гистонов H2A-H2B на больших величинах откручивания ДНК

(формирование гексасомы), а также показали возможность формирования структуры “бабочки” (butterfly, Рис. 2) [25], в которой гистоны H2A-H2B остаются связанными с открученной ДНК. В случае симметричного откручивания ДНК происходит потеря двух димеров H2A-H2B с формированием тетрасомы. В отличие от нуклеосом, тетрасомы могут связывать ДНК с образованием как лево-, так и правозакрученной суперспирали (Рис. 2 вставка). Недавно было показано, что модификация аминокислот на интерфейсе взаимодействия гистонов H3-H3 влияет на кинетику переходов между правыми и левыми тетрасомами [26]. Помимо тетрасом, было показано, что на центромерных участках почкающихся дрожжей могут формироваться правосpirальные хемисомы - половинки нуклеосом, содержащие по одному гистону каждого типа [27].

Как было сказано выше, нуклеосомы могут принимать различные состояния из широкого спектра конформаций ДНК и комбинаций гистонов, но похоже, что существует еще один уровень нуклеосомной динамики: гистоновые димеры не являются жесткими «кирпичами», из которых построены нуклеосомы, они способны демонстрировать внутреннюю пластичность. Недавно было показано, что димер гистонов H3-H4 претерпевает конформационные перегруппировки после связывания с ремоделером хроматина SNF2, более того, искусственная сшивка этого димера дисульфидными мостиками приводит к ингибированию связывания нуклеосом с SNF2 [28]. В то же время показано, что сшитый H2A-H2B может включаться только в гексасомы [24]. Это говорит о необходимости внутренней подвижности гистоновых димеров для сборки нуклеосом. Важность гистоновой пластичности следует также из того, что полное сшивание октамера гистонов (без сшивки гистонов с ДНК) препятствует моде скольжения нуклеосом [29]. Кроме того, в той же работе было показано, что в физиологических условиях нуклеосомы могут сокращаться на 8% вдоль диадной оси и расширяться на 5%

в перпендикулярном направлении. Примечательно, что в такой «сплющенной» конформации гистон H3 демонстрирует наибольшие изменения в геометрии. В дополнение к изменениям в октамере выявленная конфигурация характеризуется иной конформацией ДНК. Связь между конфигурациями ДНК и гистонового октамера была также показана для ряда промежуточных состояний развертывания ДНК в работе [24]. Взаимное влияние конформации гистонов и ДНК может играть важную роль в кооперативном связывании белков хроматина, как, например, недавно было показано для CENP-C [30], что обуславливает актуальность изучения конформационной подвижности нуклеосом.

1.1.3. Факторы, влияющие на динамику нуклеосом

Состав нуклеосом влияет на динамику нуклеосом: включение гистоновых вариантов, введение посттрансляционных модификаций (ПТМ), изменение последовательности ДНК способны как поменять структуру, так и сдвинуть равновесие в распределении конформаций.

1.1.3.1. Посттрансляционные модификации (ПТМ) гистонов

ПТМ гистонов обеспечивает точную настройку динамики нуклеосом путем изменения ключевых остатков гистонов. Многие ПТМ изменяют стабильность нуклеосом путем сдвига равновесия в процессе разворачивания. Такой эффект ожидаем для ПТМ, изменяющих заряд. Например, сукцинилирование 34 лизина в гистоне H2B приводит к разворачиванию нуклеосом [31]. Но не все зарядовые модификации дестабилизируют нуклеосомы, к примеру ацетилирование 77 лизина на гистоне H4 ликвидирует электростатическое отталкивание внутри гистона и тем самым стабилизирует нуклеосому [32]. Ацетилирование гистона H1 изменяет подвижность линкерной ДНК и приводит к общей стабилизации хроматина.

1.1.3.2. Последовательность ДНК

Влияние последовательности ДНК на разнообразные аспекты структуры и динамики нуклеосом широко освещено в обзоре [19]. В данном разделе приведены лишь яркие примеры влияния последовательности ДНК на динамику нуклеосом. Существует ряд последовательностей, полученных методом искусственной химической эволюции, которые отличаются высокой аффинностью к ДНК и строгим позиционированием (нуклеосомы на таких последовательностях образуются в одной и той же позиции). Одними из наиболее аффинных и широко применяемых позиционирующих последовательностей являются 601 и 603 (эти номера являются порядковыми из оригинальной работы). В работе [33] было показано, что последовательность энхансера ALB1 (ALB1 является сайтом связывания пионерного фактора транскрипции FoxA) отличается от строго-позиционирующей последовательности 601 подвижностью ДНК в районе диадной оси, что позволяет FoxA эффективно связываться. В другом эксперименте методом малоуглового рассеяния рентгеновского излучения были получены данные о взаимодействии ДНК с гистонами в нуклеосомах, собранных на 601 и 5S последовательностях [34]. В этой работе было показано, что последовательность 601 разворачивается асимметрично, а 5S - симметрично, что соответствует данным из работ по силовому разворачиванию нуклеосом [35].

1.1.3.3. Хроматиновые белки

Множество белков хроматина влияет на нуклеосомную динамику при выполнения своих функций. Например PARP-1 - белок, который участвует в репарации ДНК, транскрипции и компактизации хроматина. В исследовании методом spFRET было показано, что PARP-1 значительно увеличивает

расстояние между метками на ДНК обратимым образом [36]. Амплитуда наблюдаемого эффекта указывает на то, что PARP-1 стабилизирует нуклеосомы в развернутом состоянии. Гистоновый шаперон FACT - еще один из хорошо изученных белков хроматина, который играет важную роль в процессе сборки нуклеосом. Нами было показано, что он разворачивает нуклеосомную ДНК с обоих концов [1]. Таким образом, как FACT, так и PARP-1 влияют на динамику разворачивания нуклеосом. В отличие от них, белок кинетохора CENP-C влияет на динамику движения “расщепления” в нуклеосомах, содержащих центромерный вариант гистона H3, приводя к их компактизации [37].

1.2. Изучение динамики нуклеосом методами МД

На данный момент в литературе описано достаточно большое число молекулярно-динамических исследований нуклеосом, включая исследования полноатомных систем [38] и систем в упрощенной (огрубленной, “coarse-grain”) форме [39,40]. Использование упрощенных моделей макромолекул, полевых (неявных) моделей растворителя при моделировании нуклеосом позволяет исследовать такие крупные молекулярные комплексы на достаточно продолжительных временных интервалах [41]. В силу большого размера систем, временные масштабы описанных исследований, проведенных методом полноатомной МД, обычно не превышают нескольких сотен нс [42,43]. В то же время, из примеров, приведенных в предыдущем разделе, становится ясно, что множество функций, выполняемых нуклеосомами, определяется на атомарном уровне. Таким образом, для изучения динамических свойств нуклеосом на атомарном уровне, необходимо проведение длительных расчетов методом МД.

1.3. Методы молекулярного моделирования, основанные на интеграции разнородных экспериментальных данных

Структуру крупных молекулярных комплексов зачастую весьма трудно изучать. Большой размер и количество субъединиц приводит к большей подвижности и структурной гетерогенности комплексов, делая их кристаллизацию для последующего изучения методом РСА практически невозможной. В то же время крио-ЭМ, хотя и подходит для изучения крупных комплексов, отличается ограниченным разрешением, зачастую не позволяя получать информацию об атомной структуре объекта. Картирование взаимодействий между отдельными субъединицами при помощи протеомики в общем случае дает лишь бинарную информацию о взаимодействиях, не позволяя судить о взаимной ориентации субъединиц и интерфейсах взаимодействия. Комбинируя информацию об атомной структуре субъединиц (полученную методом РСА, ЯМР или крио-ЭМ), информацию об общей форме комплекса (полученную методом крио-ЭМ или малоуглового рассеяния рентгеновских лучей) с информацией о взаимодействиях между этими субъединицами можно создавать полноатомные согласованные модели крупных макромолекулярных комплексов [44]. Такой подход к моделированию называют гибридным или интегративным. Данный метод позволяет строить молекулярные модели, используя результаты, полученные в независимых экспериментах, которые по одиночке несут недостаточно информации для определения структуры. При этом сам подход потенциально позволяет получать не одну структуру, а ансамбли возможных конфигураций.

На данный момент наиболее популярным программным пакетом для осуществления интегративного моделирования является IMP (Integrative Modelling Platform) [45]. Данный пакет эффективен для построения моделей крупных белковых комплексов, однако не содержит в себе методов для

моделирования геометрии и гибкости двухцепочечной ДНК, что делает его трудно применимым для моделирования нуклеосом и их комплексов с белками хроматина.

1.4. Ферстеровский резонансный перенос энергии

FRET является одним из видов безызлучательного переноса энергии с одного флуоресцентного красителя на другой. Для осуществления переноса необходима пара (или более) флуорофоров, которые подбирают таким образом, чтобы спектр флуоресценции донора перекрывался со спектром поглощения акцептора. Флуорофоры закрепляют на аминокислотах или азотистых основаниях ДНК при помощи разнообразных линкерных молекул (Рис. 10). Вероятность переноса энергии значительно зависит от расстояния между флуоресцентными метками и описывается следующей формулой

$$E_{FRET} = \frac{1}{1+(R/R_0)^6} \quad (1),$$

где R - расстояние между флуоресцентными метками, R_0 - радиус Ферстера, расстояние между метками, отвечающее 50% эффективности переноса энергии между флуорофорами (Рис. 3). Таким образом, измеряя эффективность FRET можно вычислить дистанцию между участками меченой макромолекулы. Радиус Ферстера индивидуален для каждой пары меток и зависит от множества факторов, в частности от квантового выхода флуоресценции донора, коэффициента преломления среды и ориентации красителя на поверхности молекулы.

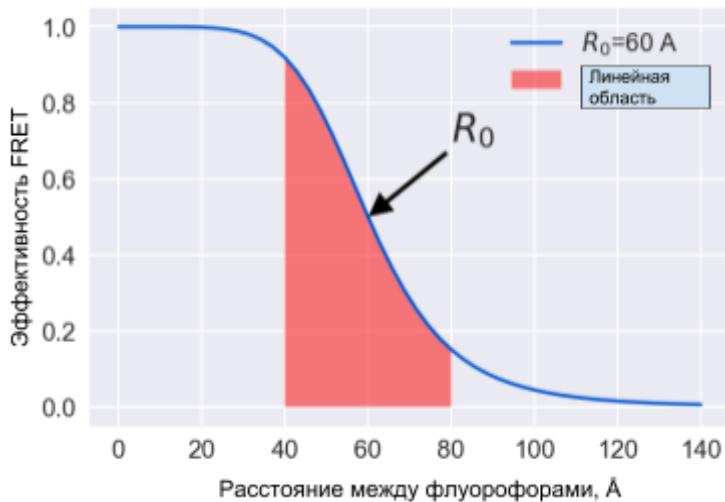


Рисунок 3. Зависимость эффективности переноса энергии от расстояния между флуорофорами. Красным показана область изменений, близкая к линейной. Стрелкой показана величина Ферстеровского радиуса.

Эффективность переноса энергии пропорциональна изменению времени жизни флуоресценции донора в присутствии акцептора.

$$E_{FRET} = 1 - \tau'_D / \tau_D \quad (2),$$

где τ'_D время жизни флуоресценции донора в присутствии акцептора, τ_D время жизни донора без акцептора. Также эффективности переноса можно рассчитать из соотношения интенсивностей флуоресценции донора и акцептора

$$E_{FRET} = \frac{F_A}{F_A + \gamma F_D} \quad (3),$$

где $F_D = I_D - B_D - \alpha_{AD}(I_A - B_A)$ и $F_A = I_A - B_A - \alpha_{DA}(I_D - B_D) - D_{ex}$. I_D и I_A - это интенсивности сигнала донора и акцептора; B_D и B_A - уровень фонового сигнала в канале донора и акцептора; α_{AD} и α_{DA} - перекрестные коэффициенты (crosstalk coefficients), которые характеризуют долю излучения акцептора, регистрируемую в канале донора (α_{AD}), и долю флуоресценции донора, регистрируемую в канале акцептора (α_{DA}). Эти поправочные коэффициенты необходимы для учета особенностей оптической схемы спектрофлуориметра или конфокального микроскопа и отличаются для разных

пар флуоресцентных меток. D_{ex} - величина сигнала прямого возбуждения акцептора (в результате возможного поглощения фотонов акцептором на длине волны поглощения донора). Коэффициент γ называется фактором детекции, и учитывает различия в эффективностях детекции флуоресценции (η) донора и акцептора, а также различия в их квантовых выходах флуоресценции (Φ) [46].

$$\gamma = \gamma_{instrument} \gamma_{dye} = \frac{\eta_A \Phi_A}{\eta_D \Phi_D} \quad (4).$$

Эффективность детекции флуоресценции определяется спектральной чувствительностью детекторов фотонов (фотоэлектронных умножителей или лавинных фотодиодов) и спектральными характеристиками всех оптических элементов, используемых для сбора и фильтрации флуоресценции от образца.

Определение фактора детекции в ряде случаев может быть затруднено (см. 1.4.4 Измерение фактора детекции), поэтому часто его принимают за единицу. В этом случае говорят не об эффективности переноса энергии (E_{FRET} из формулы 3), а о «коэффициенте близости» (PR - proximity ratio). Несмотря на то что такие измерения нельзя использовать для определения расстояний между флуоресцентными метками, они позволяют исследовать гетерогенность образца, а также судить о качественных изменениях в расстоянии между метками в выявленных субпопуляциях частиц.

1.4.1. Детекция сигнала от одиночных молекул.

Эффективность переноса энергии можно измерять в кюветах при помощи спектрофлуориметра, в этом случае измерение производится путем усреднения по ансамблю молекул [47]. В случае если в образце содержится несколько субпопуляций молекул с разными расстояниями между парами FRET меток, такое усреднение может отвечать состоянию, которого в действительности нет в образце. Для того, чтобы учесть неоднородность исследуемого объекта применяют подходы измерения эффективности FRET от

одиночных частиц (spFRET), такие подходы позволяют исследовать не только расстояние между метками [48], но и динамику изменения расстояний между метками [49]. Один из подходов основан на явлении полного внутреннего отражения, измерение флуоресценции происходит в тонком слое частиц, иммобилизованных на стеклянной поверхности, в качестве детектора обычно используют CCD камеру. Такой подход позволяет разделять статическую гетерогенность образца (выявлять наличие субпопуляций частиц с отличающимися значениями эффективности FRET) и динамическую гетерогенность (исследовать распределение эффективности FRET внутри субпопуляции частиц) [50]. Преимуществом метода является возможность одновременного непрерывного наблюдения временной зависимости сигнала для набора частиц в поле зрения микроскопа. Существенным недостатком метода является возможность неспецифического взаимодействия исследуемых частиц с подложкой, что может привести к изменениям в их структуре и динамике [51]. Другой подход к измерению эффективности spFRET основан на детекции флуоресценции от одиночных молекул, свободно диффундирующих сквозь фокальный объем конфокального флуоресцентного микроскопа (Рис. 4). В этом случае необходимо использовать сильно разбавленные препараты исследуемых частиц, чтобы снизить вероятность обнаружения более одной частицы в фокальном объеме (так как это приведет к нежелательному усреднению сигнала). Для реализации такого подхода необходим конфокальный микроскоп, оборудованный чувствительными лавинными фотодиодами (APD) или лавинными фотодиодами для одиночных фотонов (SPAD). Метод позволяет собирать сигнал от очень большого числа частиц, но не позволяет исследовать кинетику быстрых процессов, происходящих внутри частиц (типичное время пребывания частицы в фокальном объеме порядка миллисекунд).

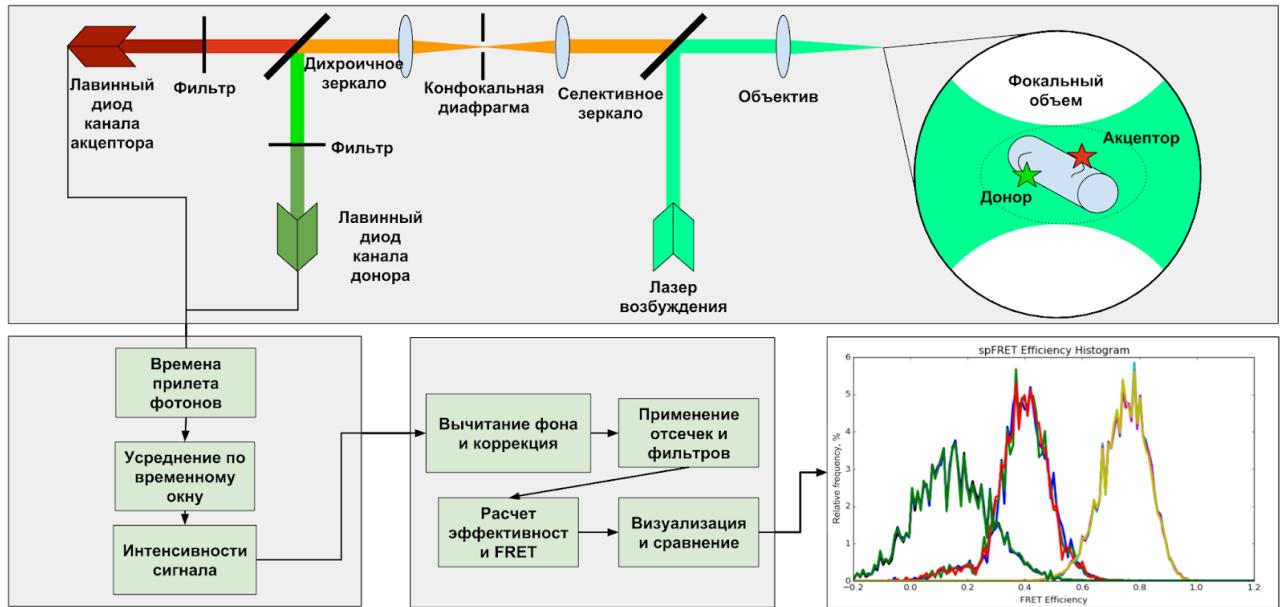


Рисунок 4. Схема эксперимента spFRET. Флуоресценция возбуждается аргоновым лазером на длине волны 514 нм и собирается из конфокального объема на лавинных фотодиодах. Полученные времена прилета фотонов интегрируются по времени программным обеспечением микроскопа. Затем данные обрабатываются и выводятся для последующего анализа.

1.4.2. Подходы к измерению эффективности FRET.

Величина эффективности Ферстера может быть напрямую вычислена из уменьшения времени жизни флуоресценции донора [52]. Такого рода измерения требуют сложного и дорогостоящего оборудования, в частности импульсных лазеров и детекторов фотонов, синхронизированных со вспышками лазера (TCSPC - Time Correlated Single Photon Counting). Такие детекторы позволяют измерять временную задержку между лазерным импульсом и попаданием флуоресцентных фотонов на фотоэлемент. Очевидным преимуществом данного метода является то, что измеряемая величина (время жизни флуоресценции) не зависит от мощности осветителя и для вычисления эффективности переноса не требуется измерять корректировочные факторы. Помимо этого, метод позволяет эффективно

отбирать целевой сигнал, так как времена жизни используемых флуорофоров известны, случайный шум, детектированный вне ожидаемого промежутка времени легко отфильтровать.

Техническая сложность измерения времен жизни флуоресценции и дороговизна оборудования являются причинами того, что большей популярностью пользуются подходы, основанные на измерении интенсивности флуоресценции. Такие методы называют ратиометрическими (ratiometric), так как величина эффективности переноса энергии пропорциональна отношению флуоресценции акцептора к полной флуоресценции. Сигнал флуоресценции донора и акцептора при этом может быть записан как в виде времен регистрации отдельных фотонов (в нескореллированном режиме SPC - single photon counting), так и в виде интенсивностей флуоресценции усредненных по некоторому промежутку времени. Такой подход к измерению эффективности переноса энергии нетребователен к оборудованию, так как для проведения измерений достаточно лишь конфокального микроскопа, оборудованного двумя детекторами, а для возбуждения флуоресценции можно использовать как импульсный лазер, так и лазер с непрерывным излучением. Однако, подход чувствителен к изменению интенсивности лазера и случайному шуму, основными причинами которого является рассеяние света образцом и тепловой шум детектора. Ратиометрический подход требует точного измерения фактора детекции γ , который позволяет учесть различия в квантовых выходах донора и акцептора, а также различия в эффективности детекции квантов света, испущенных донором и акцептором. Последнее ограничение значительно усложняет интерпретацию результатов измерений для процессов, в ходе которых изменяется окружение флуорофоров, так как при этом изменяется квантовый выход флуоресценции красителя, что приводит к изменению фактора детекции и изменению частотной гистограммы эффективности FRET (Рис. 5 В).

1.4.3. Подходы к измерению интенсивности флуоресценции spFRET от одиночных молекул

Как уже было отмечено выше, при ратиометрическом подходе к измерению эффективности spFRET сигнал может быть в виде времен регистраций отдельных фотонов либо в виде интенсивностей флуоресценции усредненных по некоторым промежуткам времени. Выбор временного промежутка для усреднения принципиально важен в случае свободно диффундирующих молекул и зависит от среднего времени между вхождением молекул в фокальный объем, а также времени, которое частица проводит в фокальном объеме. Время усреднения значительно большее времени нахождения в фокальном объеме может привести к объединению сигналов от разных частиц, меньшее время приводит к снижению отношения сигнал/шум, однако потенциально может помочь различить конформационные переходы, происходящие за время прохождения молекулы сквозь фокальный объем. Оценку времени нахождения молекулы в фокальном объеме можно производить при помощи отношения

$$\tau \approx x^2 / 2D \quad (5),$$

где x и D - диаметр конфокального объема и коэффициент диффузии.

В случае, если экспериментальная установка позволяет регистрировать времена прилета отдельных фотонов, обработку сигнала необходимо производить, группируя фотоны согласно временным задержкам между ними [53]. Такой способ измерений позволяет точно определять уровень фонового сигнала. Так как вероятность детекции фотона за определенный промежуток времени подчиняется пуассоновскому распределению:

$$P[N(t) = k] = \frac{e^{-\lambda t} (\lambda t)^k}{k!} \quad (6)$$

ненсложно показать, что задержки между детекцией фотонов подчиняются экспоненциальному распределению.

Пусть за промежуток времени t не будет зарегистрировано ни одного фотона. Это утверждение равнозначно тому, что временной зазор между соседними фотонами больше t .

$$P[X > t] = P[N(t) = 0] = \frac{e^{-\lambda t} (\lambda t)^0}{0!} = e^{-\lambda t} \quad (7)$$

Тогда вероятность того, что временной промежуток между фотонами меньше t , определена следующим образом:

$$P[X \leq t] = 1 - e^{-\lambda t} \quad (7)$$

а вероятность того, что временной зазор равен t , определена как:

$$P[X = t] = \frac{\delta}{\delta t} (1 - e^{-\lambda t}) = \lambda e^{-\lambda t} \quad (8)$$

где λ - средняя частота детекции фотонов.

По этой причине на гистограмме распределений межфотонных задержек можно наблюдать два типа сигналов (Рис. 5 А): исследуемый сигнал (малые задержки) и фоновый сигнал (большие задержки). Таким образом, уровень фонового сигнала можно определить путем вписания экспоненты в правую часть такой гистограммы. Более того, уровень сигнала можно вычислять в разные временные промежутки эксперимента (Рис. 5 Б), что может быть важно в силу изменений, происходящих в системе (агрегация образца, адгезия образца на стенки кюветы или испарение буферного раствора).

После определения фонового сигнала, его удобно использовать для обнаружения вспышек флуоресценции, вызванных проплыванием молекул. Критерием отбора вспышек в данном случае является средняя частота детекции фотонов для последовательного набора фотонов (подробное описание метода приводится в [53]). После поиска вспышек для каждой из них можно рассчитать интенсивность флуоресценции донора и акцептора и после

коррекции на фактор детекции получить гистограмму распределения эффективности FRET (Рис. 5 В).

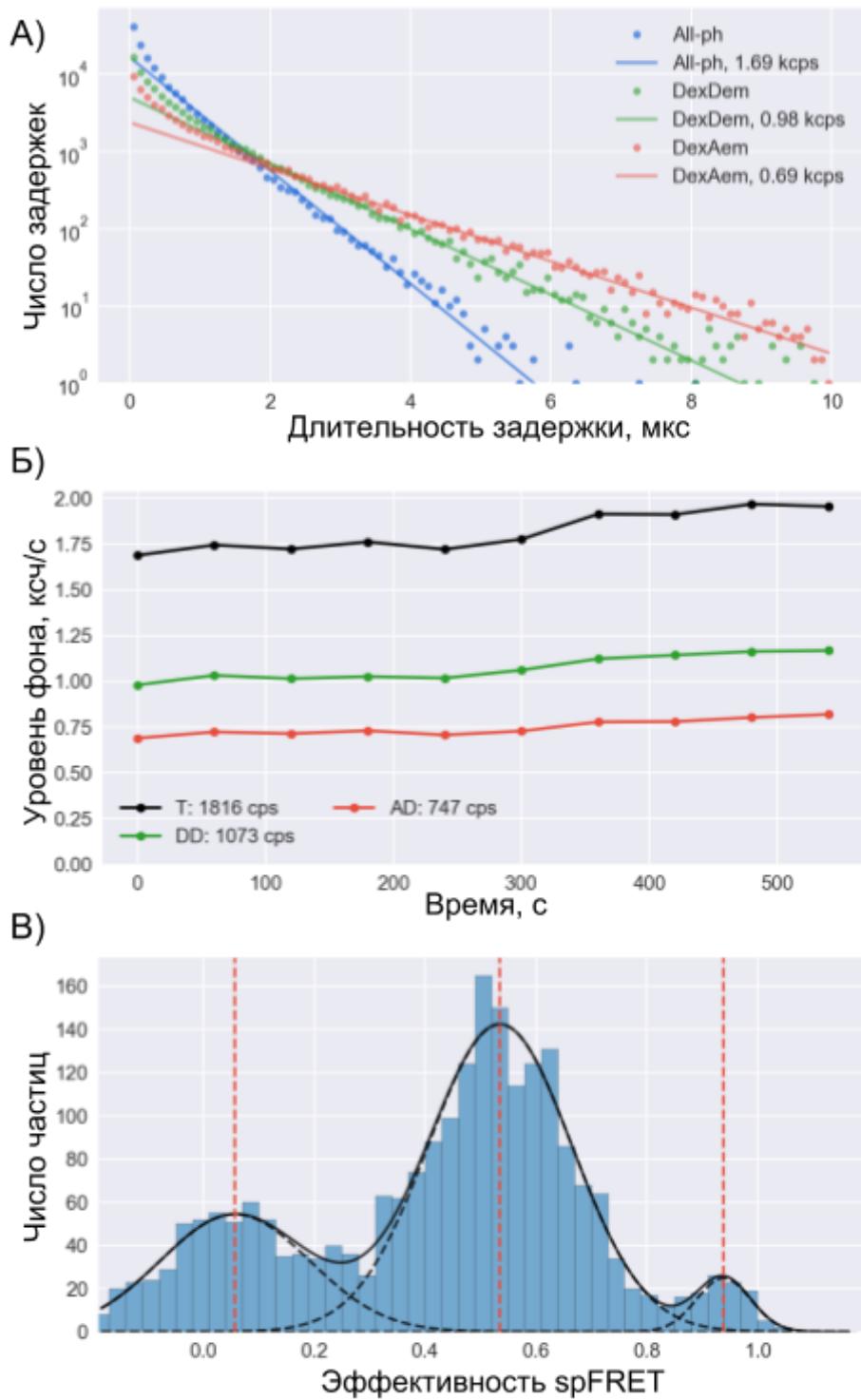


Рисунок 5. А) гистограмма длительностей задержек между соседними фотонами в канале донора (зеленый), акцептора (красный), в обоих каналах (синий). Б) изменение уровня фона в ходе эксперимента. В) Типовая

гистограмма эффективности spFRET со вписанными в нее тремя функциями Гаусса.

1.4.4. Измерение фактора детекции

Фактор детекции влияет не только на положение пиков в частотном распределении эффективностей FRET по сравнению с гистограммой PR, но и на ширины пиков, отвечающих субпопуляциям молекул с разными расстояниями между метками. Фактор детекции можно изменять путем подбора оптических элементов системы детекции конфокального микроскопа, в некоторых ситуациях его можно специально отдалить от единицы для того, чтобы увеличить динамический диапазон измерений в необходимой области величин эффективности FRET. Значения $\gamma < 1$ позволяют увеличить разрешение для структур, в которых метки находятся близко друг к другу, $\gamma > 1$ больше подходят для исследования структур с расстоянием между метками большим, чем радиус Ферстера [54].

В случае применения флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения (TIRF), фактор детекции относительно легко установить из кинетики восстановления флуоресценции после фотоотбеливания акцептора [55]. Так как такие кинетики можно измерять для каждой отдельной иммобилизованной частицы, то возможно проводить определение индивидуальных коррекционных факторов для молекул (различие в коррекционных факторах объясняется разными квантовыми выходами флуоресценции в разных микроокружениях прикрепленных к поверхности стекла частиц). Индивидуальная коррекция эффективности spFRET позволяет разрешать близкие пики на частотных гистограммах [56].

В случае применения двух чередующихся лазеров для отдельного возбуждения флуоресценции донора и акцептора (ALEX), фактор детекции можно определить используя образцы с заведомо низкой и высокой

эффективностью переноса энергии [57]. Для осуществления такой коррекции необходимо построить двумерную гистограмму эффективности переноса от стехиометрии детектирования флуоресценции. Тангенс угла наклона прямой линии проведенной через максимумы распределений на такой гистограмме будет численно равен фактору детекции.

В случае наиболее доступного метода измерения эффективности FRET (измерение интенсивностей флуоресценции донора и акцептора при возбуждении флуоресценции только донора) чаще всего используют экспериментальный подход к определению γ [58]. Как следует из формулы 4, фактор детекции можно разбить на две компоненты: $\gamma_{instrument}$ - отношение эффективностей детекции акцептора и донора, и γ_{dye} - отношение квантовых выходов флуоресценции акцептора и донора. Последнее отношение достаточно просто вычислить путем прямого измерения квантовых выходов по известным красителям [59]. Для выяснения $\gamma_{instrument}$ используют формулу

$$\gamma_{instrument} = \frac{m_A^{smF} m_D^{Abs} \Phi_D}{m_D^{smF} m_A^{Abs} \Phi_A} \quad (9),$$

где m_A^{smF} и m_D^{smF} - измеренные на микроскопе зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации для акцептора и донора (используя один и тот же лазер для возбуждения донора и акцептора), m_A^{Abs} и m_D^{Abs} измеренные на спектрофотометре концентрационные зависимости поглощения акцептора и донора на той же длине, что используется в конфокальном микроскопе для возбуждения флуоресценции донора, Φ_A и Φ_D - квантовые выходы акцептора и донора. Такой метод определения фактора детекции требует аккуратных измерений и определения фоновых шумов, в силу низких интенсивностей флуоресценции акцептора при прямом возбуждении донора. В работе [58] приведена методика измерения $\gamma_{instrument}$.

Фактор детекции зависит от квантовых выходов флуоресценции красителей и должен быть определен для каждого нового объекта, так как микроокружение красок может отличаться.

1.4.5. Детекция структурной гетерогенности в образце

Чаще всего, результаты измерения эффективности spFRET анализируют путем построения частотных гистограмм (Рис. 5 В). Полученные распределения затем аппроксимируют Гауссовыми функциями, положение которых принимают за среднюю эффективность переноса энергии для субпопуляции частиц. Средняя эффективность переноса энергии затем может быть использована для оценки среднего расстояния между флуоресцентными метками. Помимо средней эффективности, информацию об исследуемой системе можно получить из формы и ширины распределения эффективностей spFRET [60,61]. Уширение распределений может свидетельствовать как о статической структурной гетерогенности образца, так и о динамической структурной гетерогенности образца: под статической гетерогенностью понимают наличие в образце смеси частиц с разными расстояниями между метками, изменение расстояний при этом либо не происходит, либо происходит на временах, значительно превышающих времена диффузии частиц сквозь фокальный объем. О динамической гетерогенности говорят в случае наличия конформационной подвижности молекул, приводящей к тому, что эффективность spFRET изменяется в ходе диффузии частицы сквозь фокальный объем. Возможность наблюдения динамической гетерогенности позволяет судить о характерных временах конформационных перестроек в макромолекулах.

В работе [62] был предложен оригинальный подход для определения наличия динамической гетерогенности в образце, основанный на определении вариабельности сигнала в процессе проплывания частицы через фокальный

объем. Наличие быстрых структурных перестроек внутри образца должно приводить к увеличению стандартного отклонения измеренной эффективности spFRET для каждой детектируемой вспышки флуоресценции. В случае отсутствия подвижности в образце, отклонения в сигнале будут вызваны лишь случайным шумом, который достаточно просто оценить. Любая последовательность из n фотонов в канале флуоресценции донора подчиняется биномиальному распределению с вероятностью успеха равной эффективности FRET ($E^* = \frac{N_a}{N_a + N_d} = \frac{N_a}{n}$, где N_x - число фотонов в канале донора или акцептора, n - общее число фотонов). Исходя из этого, стандартное отклонение сигнала в канале акцептора будет описываться формулой $\sigma_{Na} = \sqrt{nE^*(1 - E^*)}$, а стандартное отклонение эффективности spFRET будет подчиняться формуле

$$\sigma_{E^*} = \sqrt{\frac{E^*(1 - E^*)}{n}} \quad (10)$$

Эта кривая (пунктирная линия на Рис. 6) является ориентиром для оценки стандартного отклонения исследуемого сигнала. Для каждой вспышки флуоресценции рассчитывается стандартное отклонение эффективности spFRET:

$$\sigma_i = \sqrt{\frac{1}{Ni} \sum_{j=1}^{Ni} (\varepsilon_{ij} - \mu_i)^2}, \text{ где } \mu_i = \frac{1}{Ni} \sum_{j=1}^{Ni} \varepsilon_{ij} \quad (11)$$

и строится двумерная гистограмма распределения стандартного отклонения от величины эффективности переноса энергии (Рис. 6). При этом, если среднее стандартное отклонение превышает ожидаемое из биномиального распределения, можно говорить о наличии динамической гетерогенности в образце, которая приводит к уширению профилей эффективности spFRET.

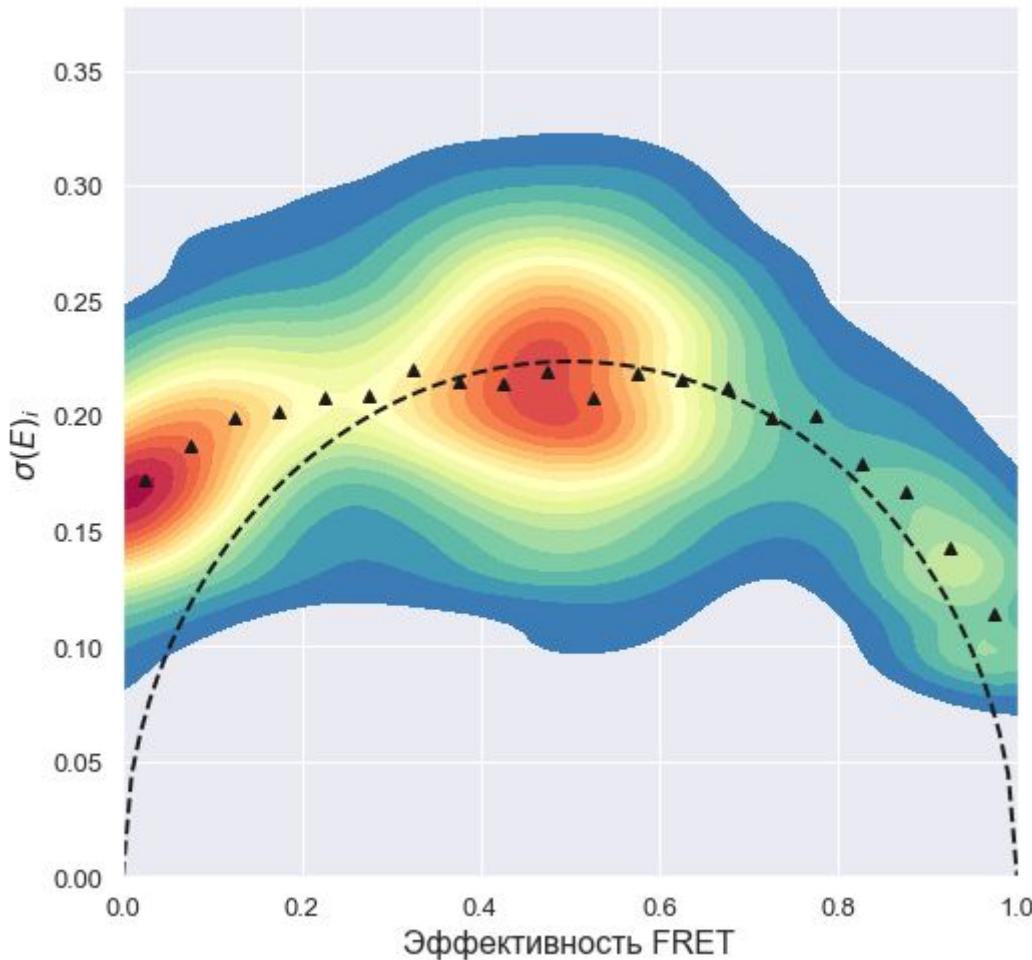


Рисунок 6. Двумерная гистограмма распределения стандартного отклонения величины эффективности spFRET. Пунктиром показана линия ожидаемого стандартного отклонения для сигнала, распределенного биномиально (Формула 10).

На приведенной двумерной гистограмме (Рис. 6) видно, что для низких и высоких величин эффективности FRET стандартные отклонения превышают теоретическую оценку. Этот эффект может свидетельствовать о наличии быстрых перестроек в этих субпопуляциях частиц, но также может быть связан с тем, что метод оценки вариабельности вспышек не учитывает уровень фона и другие корректировочные коэффициенты (см. Формулу 3).

1.5. Определение контактов ДНК-белок с применением перекисного расщепления ДНК

Помимо информации о парных расстояниях в макромолекуле, важную информацию об ее устройстве можно получить, исследуя контакты между ее субъединицами. Для того, чтобы получить информацию о взаимодействиях ДНК с белком можно применять не только методы структурной биологии (РСА, ЯМР, крио-ЭМ и другие), но и использовать относительно простую группу биохимических подходов, называемую “футпринтинг” (DNA footprinting). Футпринтинг является полезным механизмом изучения структуры ДНК, в различных комплексах, будь то нуклеосома или же комплекс ДНК с транскрипционными факторами. Метод основан на определении доступности нуклеиновых кислот для повреждения атакующим агентом, например нуклеазами или активными формами кислорода. После повреждения на электрофоретическом геле виден “отпечаток” (footprint) - места, в которых ДНК защищена белком от расщепления. Применение гидроксильных радикалов особенно информативно, их малый размер и отсутствие заряда, позволяет достигать весьма высокого разрешения и картировать ДНК белковые контакты с точностью в 1 н.п. Гидроксильные радикалы обладают высокой реакционной способностью и расщепляют сахарофосфатный остов ДНК [63,64] атакуя атомы водорода при 3', 4' и 5' атомах углерода дезоксирибозы с образованием промежуточного продукта, являющегося радикалом, и последующим разрывом сахарофосфатной цепи ДНК [64].

Данные футпринтинга можно применять для определения мест ДНК, ассоциированных с белками, что дает дополнительную информацию о пространственных ограничениях внутри макромолекул для построения молекулярных моделей.

Гидроксил-радикальный футпринтинг выполняется в несколько этапов (Рис. 7): 1. одну из цепей ДНК снабжают радиоактивной (или флуоресцентной) меткой с 3' или 5' конца; 2. собранный на такой ДНК комплекс обрабатывают гидроксильными радикалами в такой концентрации, чтобы расщепление ДНК происходило только один раз на одну цепь ДНК; 3. ДНК очищают от белков, и анализируют при помощи денатурирующего электрофореза в поликариламидном геле; 4. интерпретируют результаты - по интенсивности каждой полосы на геле можно судить о вероятности расщепления ДНК по определенному (и соответствующему пробегу пика) нуклеотиду [64]. Для того, чтобы определить принадлежность пиков определенным положениям вдоль последовательности ДНК, можно использовать как стандартизованные массовые маркеры ДНК (смеси олигонуклеотидов известных размеров), так и продукты реакции Максама-Гилберта от исследуемой ДНК.

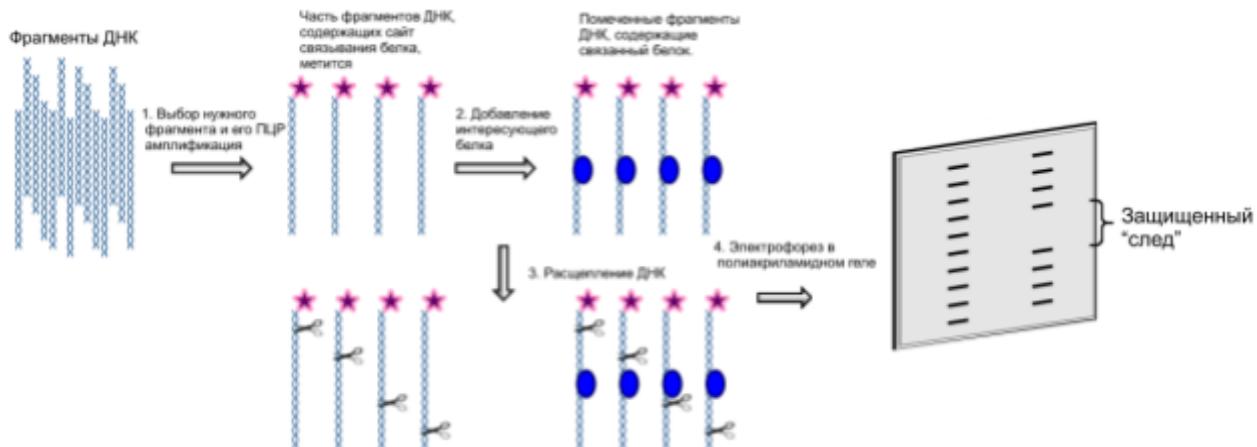


Рисунок 7. Общая схема проведения эксперимента по анализу расщепления ДНК (футпринтингу ДНК). Изображение из открытых источников.

Метод гидроксил-радикального футпринтинга был применен к нуклеосомам задолго до того, как стали доступны первые структуры нуклеосом [63,65–67]. Впоследствии этим методом исследовали формирование нуклеосом на различных последовательностях [68–70], последствия введения сшивок в

ДНК при помощи химиотерапевтических средств [69], взаимодействия нуклеосом с факторами - ремоделлерами хроматина [71] или другими белками [72].

Помимо решения задачи картирования взаимодействий ДНК с гистонами, гидроксил-радикальный футпринтинг ДНК потенциально позволяет количественно охарактеризовать такие взаимодействия. Данная информация может быть включена в интегративные методы молекулярного моделирования. Молекулярное моделирование нуклеосом представляет собой сложную задачу, так как требует не только моделирования гистонового октамера, но также включает в себя поиск правильной ориентации и позиционирования ДНК по отношению к октамеру. Для того чтобы интегрировать данные футпринтинга ДНК в алгоритмы интегративного молекулярного моделирования, необходимо уметь рассчитывать профили футпринтинга от молекулярных моделей. Основной подход к такому расчету заключается в том, что вероятность расщепления гидроксильными радикалами должна быть пропорциональна поверхности доступной растворителю (SASA) для атомов водорода дезоксирибозы [73].

Глава 2.

Методы молекулярного моделирования и анализа экспериментальных данных

2.1. Метод молекулярной динамики

Для исследования нуклеосом и их интермедиатов использовался метод молекулярной динамики. При исследовании молекулярных систем данным методом молекулы описываются набором молекулярных точек, взаимодействующих по законам классической механики. Набор констант взаимодействий и способ описания молекул называется силовым полем. Существует множество силовых полей, которые отличаются классами соединений, для которых они были созданы, хотя созданы и генерализованные силовые поля (такие как MMFF [74]), подходящие для грубого описания очень большого спектра соединений. В классических силовых полях, атомы представляются в виде материальных точек, взаимодействующих по классическим законам, где потенциал взаимодействия является функцией от координат всех атомов [75,76]. Межмолекулярные взаимодействия представляются в виде парных взаимодействий между атомами с потенциалами Леннард-Джонса и Кулона:

$$U_{\text{несвяз}} = \sum 4 \epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] + \sum \frac{q_i q_j}{r} \quad (12),$$

где ϵ и σ - коэффициенты, характеризующие силу взаимодействий и положение минимума энергии. Взаимодействия внутри молекул описываются следующим набором потенциалов:

$$U_{\text{связей}} = U_{\text{связь}} + U_{\text{угол}} + U_{\text{торсион}} + U_{\text{ложноторсион}} \quad (13)$$

где $U_{\text{связей}}$ - потенциал связи (обычно гармонический по длине связи), $U_{\text{угол}}$ - потенциал для угла между двумя смежными связями (также обычно гармонический), $U_{\text{торсион}}$ - потенциал на торсионные (двугранные) углы в молекуле (обычно берется в

виде суммы косинусов), $U_{\text{ложноторсион}}$ - потенциал на ложноторсионные углы, используется, чтобы некоторые атомы оставались в одной плоскости.

Метод основан на идее численного решения большого числа уравнений движения для классической механической системы, позволяя из знаний микроскопических характеристик системы определить ее макроскопические свойства.

Для исследования системой большого количества микросостояний необходимо продолжительное время, хотя, по всей видимости, при нормальных условиях для биологических систем заселен относительно небольшой диапазон микросостояний. По этой причине зачастую достаточно изучить лишь состояния близкие к кристаллическим. Перебор всех различимых состояний для белковой молекулы занял бы времена на много порядков превышающие время жизни Вселенной.

В молекулярной динамике применяют моделирование в определенных условиях, обычно используют ансамбли NVT (канонический ансамбль, N - постоянное число частиц, V - постоянный объем, T - постоянная температура) и NPT (изобаро-изотермический ансамбль, N - постоянное число частиц, P - постоянное давление, T - постоянная температура). Для того чтобы задать необходимый ансамбль, применяют алгоритмы терmostатирования и баростатирования. Поддерживать нужную температуру можно путем модификации уравнений движения таким образом, чтобы замедлять скорость частиц в системе в случае ее перегрева и ускорять при чрезмерном охлаждении. Помимо этого поддержание температуры можно осуществлять путем добавления в систему случайных взаимодействий с некоторым резервуаром виртуальных частиц, распределение скоростей которых задано в соответствии с необходимой температурой. Терmostатирование также реализовано в методе динамики Ланжевена, добавляющего к уравнениям движения члены, ответственные за вязкость среды и случайное силовое воздействие. Хотя такие

методы хорошо воспроизводят распределения по состояниям системы, они склонны искажать динамические характеристики системы в силу наличия вязкого трения.

Для того чтобы избежать появления краевых эффектов, при моделировании используют периодические граничные условия. Для ускорения расчетов прибегают к введению радиусов отсечки для электростатических и Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий, однако эта процедура может приводить к появлению артефактов при моделировании.

2.1.1. Применение метода МД к моделированию нуклеосом

Для проведения исследований использовали силовые поля AMBER99SB-BSC0 [77,78] и CHARMM36 [79]. Модель была создана на основании кристаллической структуры с индексом 1KX5 [15], взятой из банка RCSB PDB. От нуклеосом удалялись подвижные гистоновые «хвосты» согласно позициям, взятым в работе [80], ионы марганца заменялись ионами магния, также атомы селена заменялись атомами серы (в метионине). Использовались прямоугольные расчетные ячейки, размер которых подбирался так, чтобы наименьшее расстояние от нуклеосомы до одной из граней ячейки было не менее одного нанометра. Все свободное пространство заполнялось молекулами воды, для симуляции которой применялась модель TIP3P. Использовались ионы натрия и хлора в концентрации 150 mM, концентрация ионов рассчитывалась как количество ионов к объему растворителя, а не к объему расчетной ячейки. Такой способ предпочтительнее, так как в силу малых размеров моделируемой системы, сама молекула занимает значительный объем ячейки.

$$N_{ions} = \frac{0.15}{55} N_{H2O} \quad (14)$$

Например, если ячейка, используемая для моделирования нуклеосомы, имеет форму куба с ребром 21 нм, расчет числа ионов по объему ячейки даст 910 пар ионов, а по объему растворителя - 884 пары ионов. Грубое приближение при расчете ионной концентрации приводит к ее повышению. Внешний вид типовой МД системы изображен на Рис. 8.

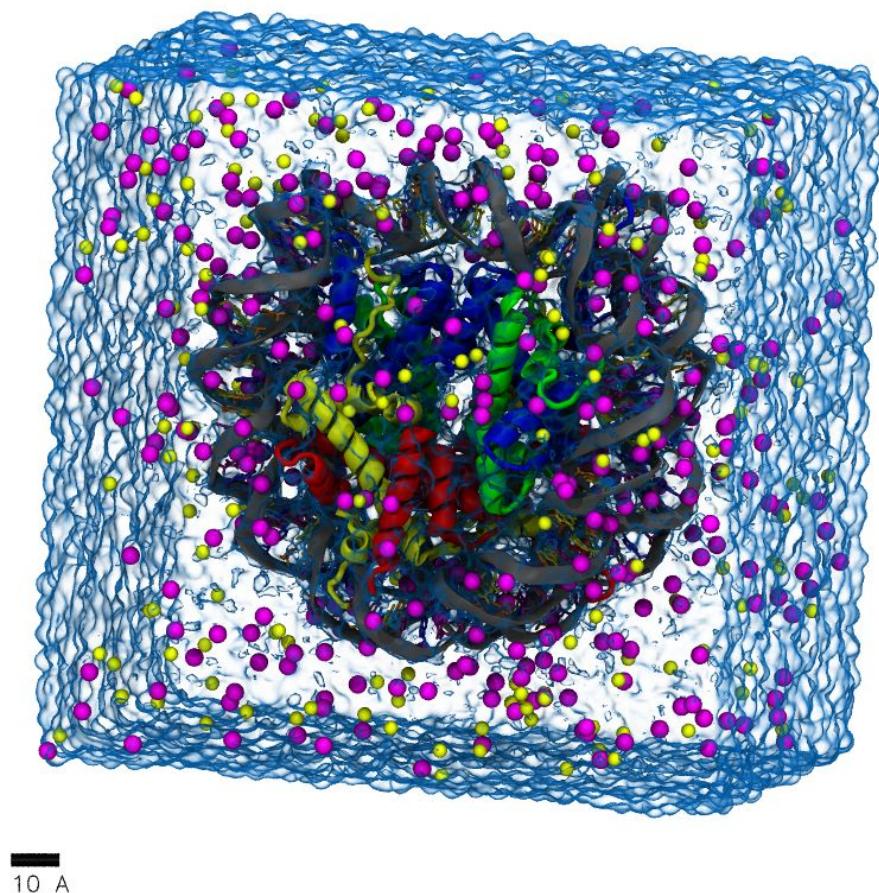


Рисунок 8. Визуализация расчетной ячейки для нуклеосомы в явном растворителе при 150 мМ NaCl. Гистоны и ДНК отображены в виде вторичной структуры, ионы в виде сфер, желтым цветом показаны ионы хлора, розовым – натрия. Полупрозрачная поверхность ограничивает объем воды в расчетной ячейке.

Молекулярно-динамическое исследование производилось в несколько этапов, призванных привести систему к состоянию термодинамического равновесия:

- Минимизация энергии системы
- Моделирование в NVT ансамбле
- Моделирование в NPT ансамбле
- Молекулярная динамика

Расчет траекторий динамики производился с шагом интегрирования 2 фс. Такой шаг допустим при использовании Gromacs, скомпилиированного с двойной точностью (для записи переменных используют тип данных double - 64 бит, а не float - 32 бит). Для того чтобы избежать краевых эффектов, использовались периодические граничные условия. Электростатические взаимодействия учитывались при помощи метода PME [81], с шагом решетки 1 Å, радиусом отсечки взаимодействий в прямом пространстве 1 нм и кубической интерполяцией. Для учета Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий использовался радиус обрезания в 1 нм с плавным выравниванием потенциала на границе обрезания. Для термостатирования расчетной ячейки применялся модифицированный термостат Берендсена со стохастической прибавкой [82], вода и макромолекула термостатировались раздельно. В качестве баростата применялся изотропный баростат Паринелло-Рамана [83]. Итоговые длины траекторий МД достигали 1 мкс. Для исследования крупномасштабных скоррелированных движений нуклеосомы использовался метод ковариационного анализа, а также метод расчета наименьшего среднеквадратичного отклонения структуры по траектории (RMSD). Расчеты производились в программе Gromacs версии 4.5.4 [84] или выше. Обработка траекторий производилась при помощи встроенных в пакет Gromacs утилит и собственных исполняемых файлов написанных на языках Python и TCL. Для

визуализации траекторий и моделей применялась программа VMD [85] и Blender.

2.2. Метод интегративного моделирования нуклеосом и их комплексов

Моделирование нуклеосом отличается от моделирования других макромолекул тем, что для описания нуклеосом необходимо учитывать не только положение белковых субъединиц, но и геометрию ДНК. При этом помимо конфигурации ДНК, очень важными являются позиционирование ДНК относительно гистонов, места контактов нуклеиновой кислоты с участками гистонового октамера. Основным отличием созданного в ходе работы подхода от доступного программного обеспечения (IMP [45]) является возможность описания и оптимизации геометрии ДНК. При оптимизации ДНК учитывается набор ряда ограничений: соответствие профилей футпринтинга известным структурам, набор парных расстояний, измеренный при помощи spFRET.

2.2.1. Описание геометрии ДНК

Конфигурация ДНК описывалась при помощи набора коллективных переменных, характеризующих шаги между соседними динуклеотидами [86]. Этот набор переменных описывает изменения во взаимном расположении динуклеотидов относительно локальной системы координат, рассчитанной для каждого динуклеотидного шага (Рис. 9). Такой набор координат удобен тем, что он инвариантен относительно выбора направления анализа геометрии двухцепочечной ДНК (рассчитанные параметры не будут отличаться при расчете в 5'-3' и 3'-5' направлениях). Расчет обобщенных переменных из атомистической структуры и восстановление координат из набора переменных производились либо при помощи программы 3DNA [87], либо при помощи разработанных программных библиотек, реализующих алгоритм, описанный в [86].

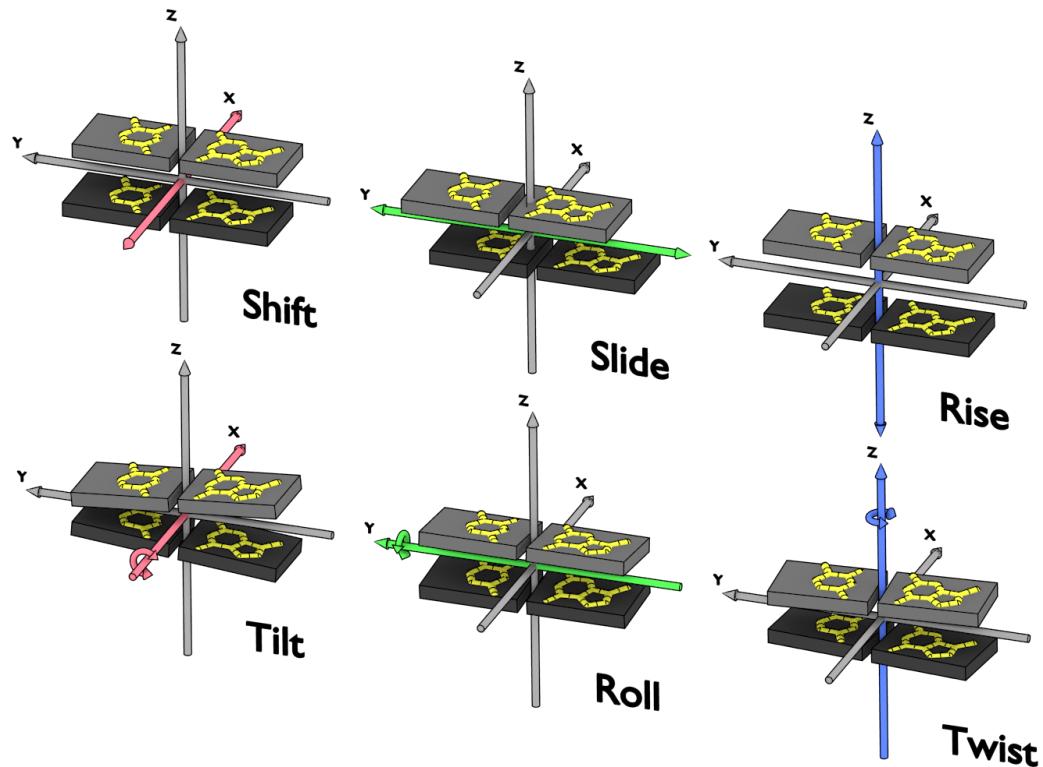


Рисунок 9. Визуальное представление геометрических характеристик шагов между соседними нуклеотидными парами (показаны в виде параллелепипедов) ДНК.

Энергия деформации рассчитывалась из обобщенных переменных, описывающих конфигурацию ДНК в соответствии с формулой.

$$E_{deform} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^6 \sum_{j=1}^6 f_{ij} \Delta\theta_i \Delta\theta_j; \\ \Delta\theta_i = (\Delta\theta_i - \Delta\theta_i^\circ) \quad (15)$$

Где θ_i – значения обобщенных переменных, а f_{ij} - коэффициенты жесткости ДНК для отклонения обобщенных переменных для каждой нуклеотидной пары. В работе применялся набор коэффициентов, приведенных в [88]. Данные коэффициенты жесткости зависят от типа нуклеотидных пар, то есть от последовательности ДНК. Минимизация энергии производилась по методу сопряженных градиентов, реализованному в библиотеке Scipy [89].

2.2.2. Учет величин эффективности FRET для построения молекулярных моделей

Расчет расстояний по данным FRET производился в соответствии с формулой 1. Важно учитывать, что расстояние между флуоресцентными красками не соответствует расстоянию между нуклеотидными парами, так как метки закреплены на ДНК при помощи линкерного участка из 10-15 атомов углерода (в зависимости от метода введения метки). Оценка эффективности переноса энергии из молекулярных моделей осуществлялась согласно схеме, показанной на рРис. 10. Чтобы учесть гибкость линкеров между метками и ДНК, было произведено моделирование методом молекулярной динамики меток Су3 и Су5, связанных с короткой двухцепочечной ДНК. Подбор параметров силового поля был осуществлен при помощи сервиса SwissParam [90]. Моделирование проводилось в программе Gromacs [84]. Все атомы ДНК (включая атомы меченого азотистого основания) были зафиксированы с использованием жестких гармонических потенциалов. Общая процедура расчета была аналогична процедуре, описанной в работе [47]. Моделирование проводилось в течение 10 нс в вакууме при 2000 К с отключенными электростатическими взаимодействиями. Целью данного расчета являлся поиск наибольшего числа доступных конфигураций флуорофора. Затем из каждого кадра рассчитывались положения центров масс хромофорных групп относительно меченого тимидинового нуклеотида. Таким образом, был создан ансамбль потенциальных положений Су3 и Су5 относительно меченых нуклеотидов.

Полученные ансамбли мест расположения красителей совмещались с меченными нуклеотидами при помощи RMSD по атомам дезоксирибозы. Результирующий ансамбль позиций Су5 и Су3 использовался для расчета

теоретической величины средней эффективности FRET для полученной модели по формуле 1.

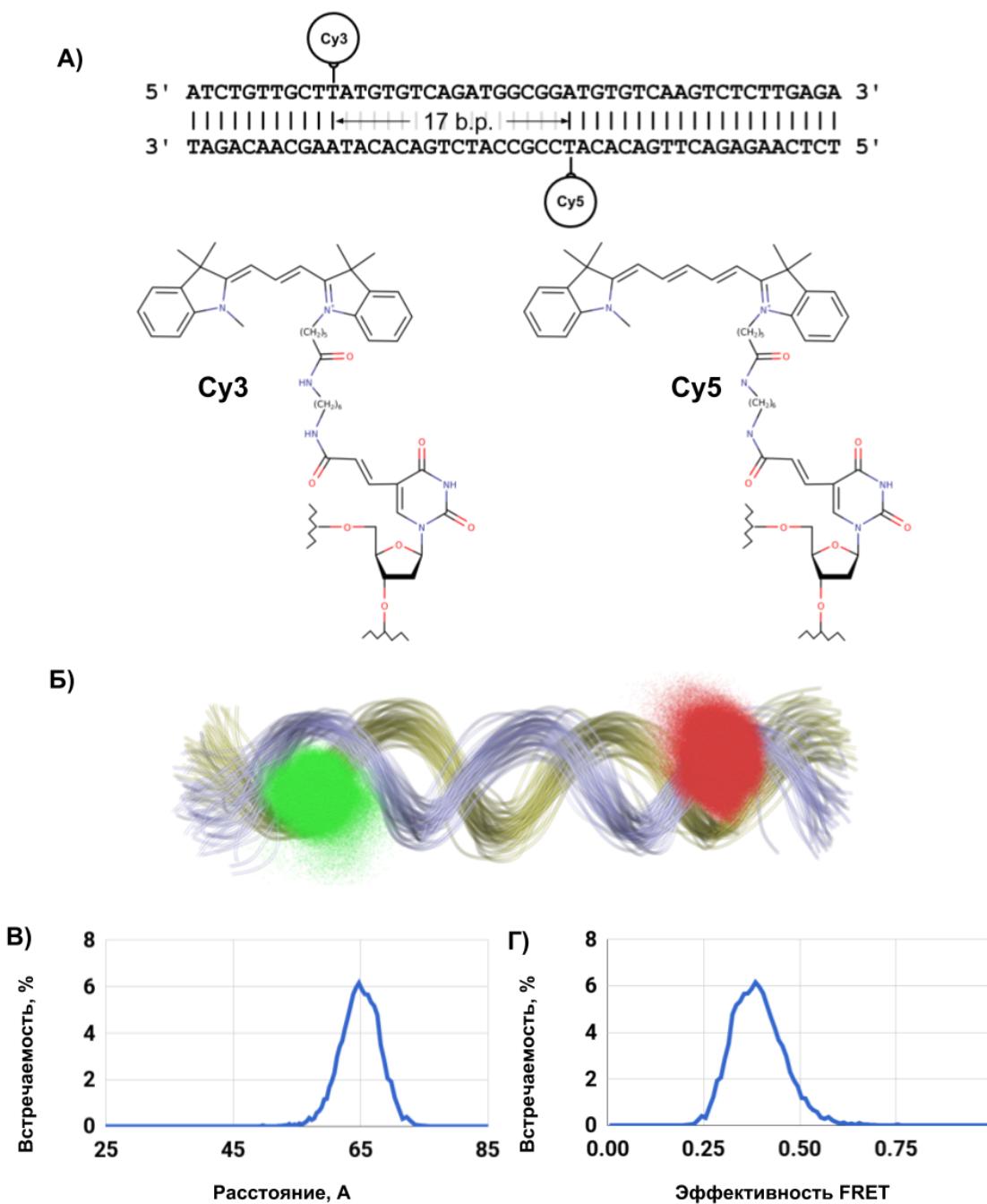


Рисунок 10. Расчет эффективности FRET по молекулярным моделям. А) Схема олигонуклеотида, меченного Cy3 и Cy5. Б) Наложенные друг на друга кадры моделирования методом молекулярной динамики с теоретическим распределением координат флуорофоров (облака точек, зеленые - Cy3, красные

- Cy5). В) Теоретическое распределение расстояний между флуорофорами, рассчитанное из облаков распределения вероятности обнаружения меток. Г) Теоретическая гистограмма эффективности FRET.

2.2.3. Анализ и учет профилей перекисного расщепления ДНК для построения молекулярных моделей нуклеосом

При помощи программы ImageJ [91] из каждой полосы денситометрического изображения геля экстрагировали профили футпринтинга. Для этого определяли сегментированную линию через центры всех пиков в полосе, затем профили анализировали при помощи разработанной нами программы HYDROID [92]. В результате обработки можно определить участки ДНК, не принимающие участие в образовании контактов с белком. Данные участки затем помечались как подвижные и использовались в дальнейшем при оптимизации геометрии.

2.2.4. Построение моделей

При минимизации в энергию системы дополнительно вводилось возмущение, соответствующее отклонению системы от набора парных расстояний, измеренного при помощи spFRET. Общий алгоритм работы программы показан на Рис. 11. Программная библиотека получает на вход начальные структуры в формате PDB, из данных футпринтинга выбираются нуклеотидные пары, не связанные с гистонами и другими белками. По результатам измерений методом spFRET определяются расстояния между парами меток. Алгоритм итеративно оптимизирует координаты выбранных нуклеотидных пар таким образом, чтобы привести их геометрию в соответствие с результатами spFRET, соблюдая при этом ограничения, связанные с жесткостью ДНК.

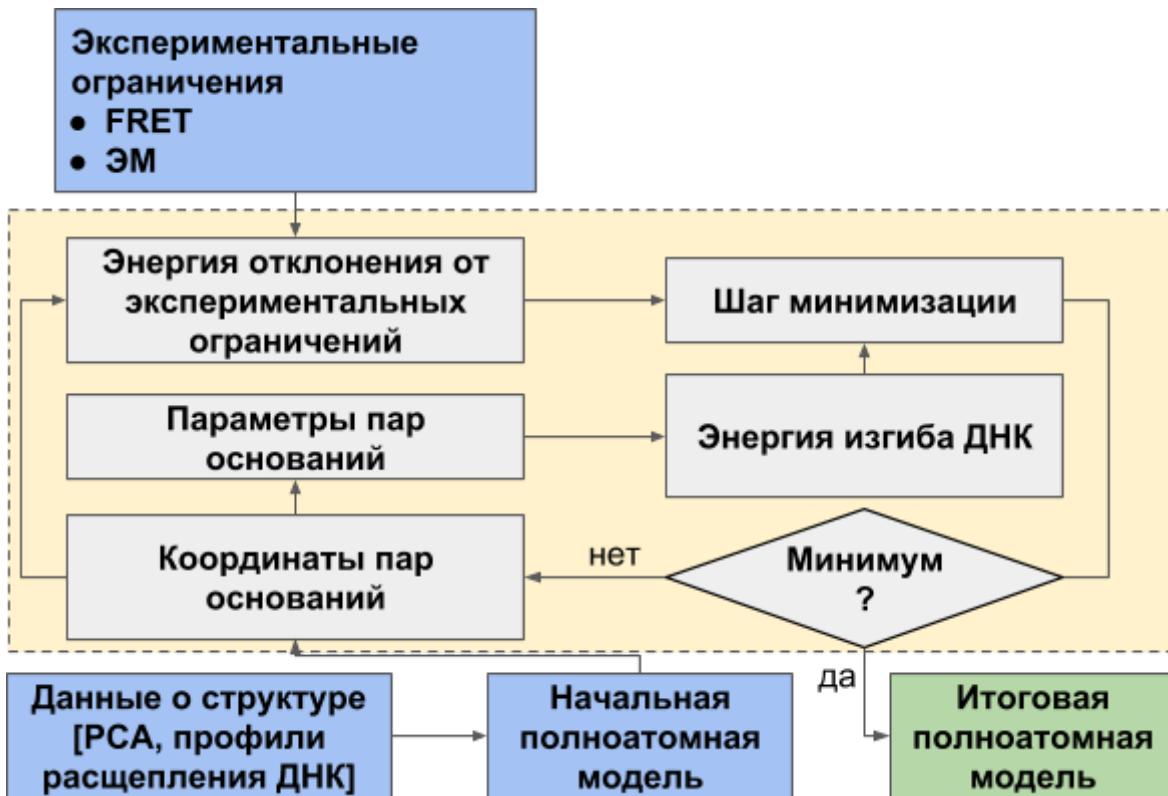


Рисунок 11. Схема работы алгоритма моделирования ДНК по данным FRET.

2.3. Измерение spFRET, квантовых выходов и коэффициента детекции микроскопа

2.3.1. Измерение эффективности переноса энергии

Все измерения производились на конфокальном микроскопе LSM 710 (Zeiss) с корреляционной приставкой Confocor3. Для сбора флуоресценции использовали объектив C-apochromat 40x/1,2 с водной иммерсией. Схема эксперимента показана на Рис.3. Флуоресценцию возбуждали аргоновым лазером на длине волны 514 нм. В экспериментах использовался оптический путь, аналогичный указанному в работе [93]. Для усреднения сигнала применялось временное окно в 3 мс. Фоновый уровень сигнала был измерен от буфера (ТЕ) без образца (0,2 и 0,18 кСч для донора и акцептора соответственно). Сигнал обрабатывали частотным фильтром с отсечками в 22 и

10 кСч для донора и акцептора соответственно (отбирались лишь вспышки со счетами выше отсечки). Затекание флуоресценции донора в канал акцептора было измерено напрямую на одиночно меченых олигонуклеотидах и равнялось 0,01 и 0,2 для донора и акцептора. Схема эксперимента показана на Рис. 4.

2.3.2. Измерение фактора детекции

Квантовые выходы флуоресценции донора и акцептора были измерены с применением сравнительного подхода [59]. Квантовый выход флуоресценции красителя Cy3 измерялся по родамину 6G в этаноле, квантовый выход красителя Cy5 измеряли по ATTO 655 в одномолярном фосфатном буфере. Спектры флуоресценции снимали в 150 мкл кварцевых кюветах с использованием спектрофлуориметра Cary Eclipse (Varian, США). Измеренные квантовые выходы красок, прикрепленных к одноцепочечным олигонуклеотидам, были равны 0,33 и 0,51 соответственно. Отношение между данными величинами хорошо совпадает с предыдущими работами [56].

Коэффициент детекции был определен равным 0,83. Ферстеровский радиус флуоресцентной пары красок был определен по методу, описанному в [58], и составил 60 Å.

Глава 3.

Исследование динамики нуклеосом методом полноатомной МД

3.1. Изучение стабильности и окружения нуклеосом

В результате расчетов методом МД было показано, что система в целом мало изменяет свою форму, при этом подвижность ДНК сильно выше, чем подвижность гистонов, что соответствует относительным величинам В-факторов в кристаллических структурах. Набор конформаций, которые нуклеосома принимает в течении МД, показан на Рис. 12. Распределение теоретических В-факторов вдоль последовательности ДНК оказалось схожим с распределением в кристаллической структуре, но подвижность ДНК в расчетной системе оказалась значительно выше. Такое отличие объясняется тем, что конформационная подвижность значительно ограничена в условиях компактной кристаллической упаковки. Помимо этого, моделирование проводилось при температуре 300 К, а при получении картин дифракции кристалл находится в криогенном диапазоне температур (Рис. 13). Дополнительно показана неравномерность распределения В-факторов вдоль ДНК, что связано с большей мобильностью и частичными расплетением ДНК вблизи мест входа в нуклеосому.

Из-за высокой подвижности ДНК количество контактов, образуемых ДНК с гистонами постоянно изменяется и в среднем отличается от числа контактов в кристаллической структуре. Наиболее заметные отличия наблюдаются в позиции +15 – +35 от входа в нуклеосому. Конформация ДНК в кристаллической структуре, по всей видимости, удовлетворяет кристаллической упаковке и напряжена. В ходе молекулярной динамики ДНК в нуклеосоме приходит в равновесное состояние.

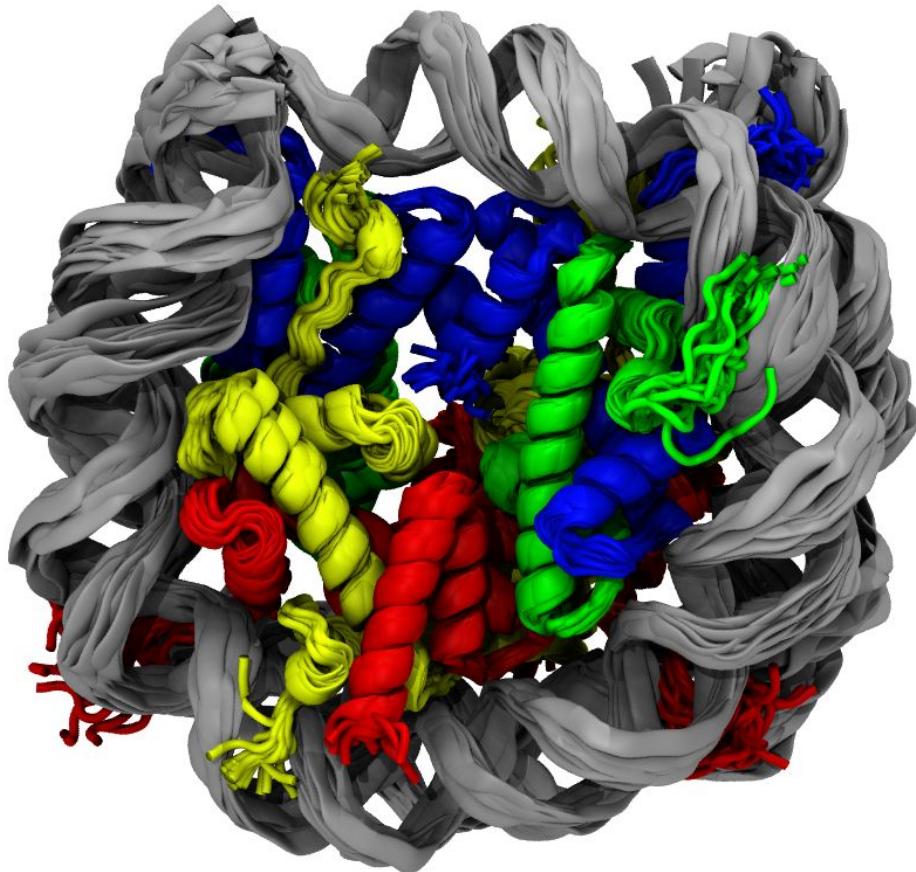


Рисунок 12. Визуализация 10, структур из траектории МД нуклеосомы, наложенных друг на друга. Гистоны и ДНК отображены в виде вторичной структуры.

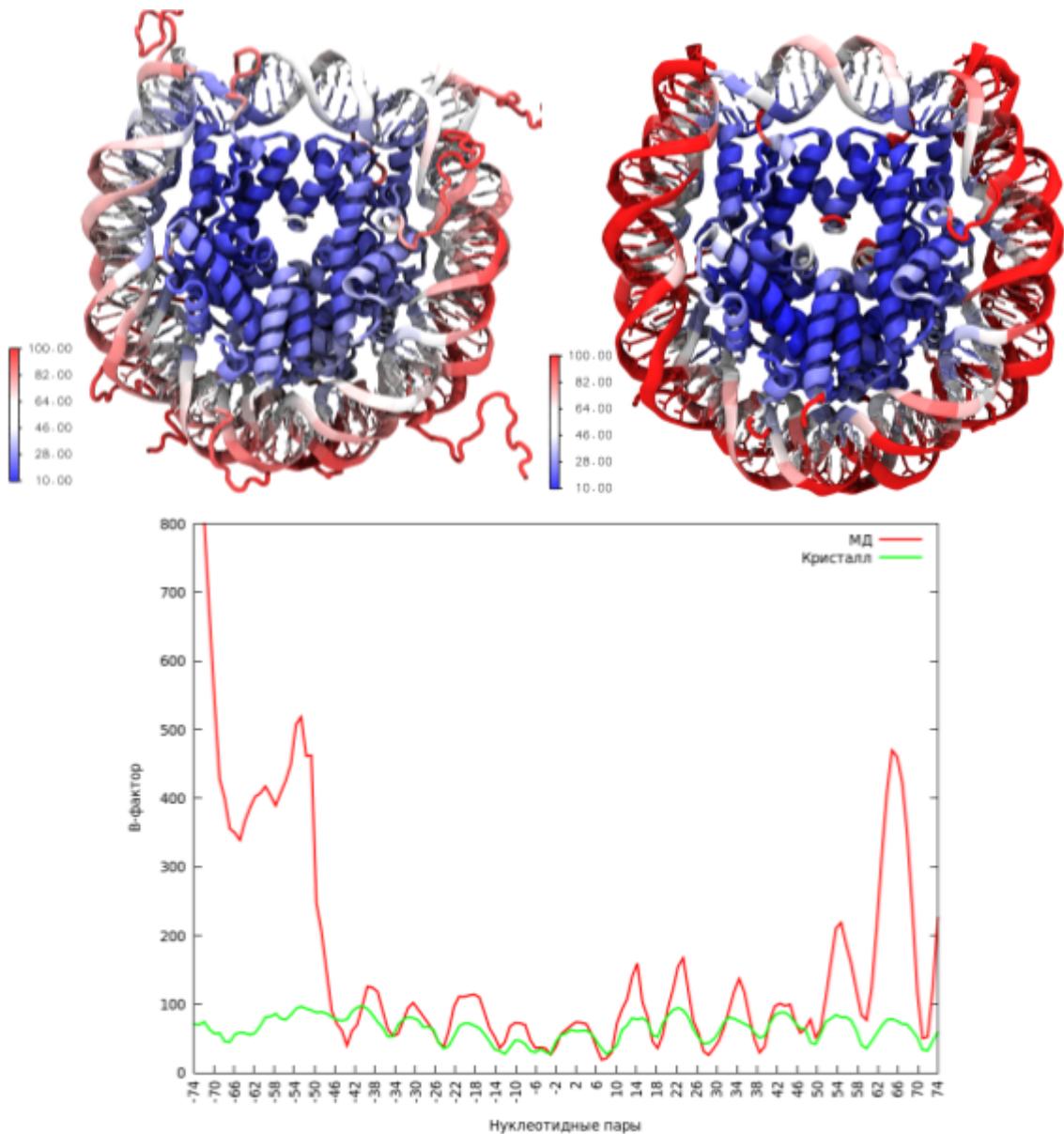


Рисунок 13. Сверху - визуализация распределения В-факторов (слева) для кристаллической структуры и (справа) для расчетной структуры. Снизу - график зависимости В-факторов атомов фосфора от положения в ДНК для одной из цепей.

Несмотря на стабильность нуклеосом и плотную упаковку гистонов в димеры, октамер гистонов упакован рыхло и содержит в себе большое количество молекул воды, которые формируют своеобразные водяные «мостики» в нуклеосоме (Рис. 14 слева). Количество молекул воды в составе нуклеосомы довольно значительно изменяется на протяжении времени

моделирования и превосходит количество молекул воды в кристаллической структуре. Наибольшие изменения характерны для находящейся в нуклеосомной поре молекул воды, в то время как количество молекул, находящихся вблизи контактов димеров гистонов, сохраняется неизменным. Наименьшее количество молекул воды (в среднем 63 молекулы) характерно для контакта димеров гистонов H3-H4, формирующих тетramer – нуклеосомное ядро, в то время как остальные контакты димеров содержат приблизительно одинаковое количество молекул воды (Рис. 14 справа). Большее число молекул воды на участке взаимодействия димеров гистонов свидетельствует о менее плотном контакте, что не противоречит экспериментальным данным, так как гистоны H2A-H2B удаляются из нуклеосомы легче всего.

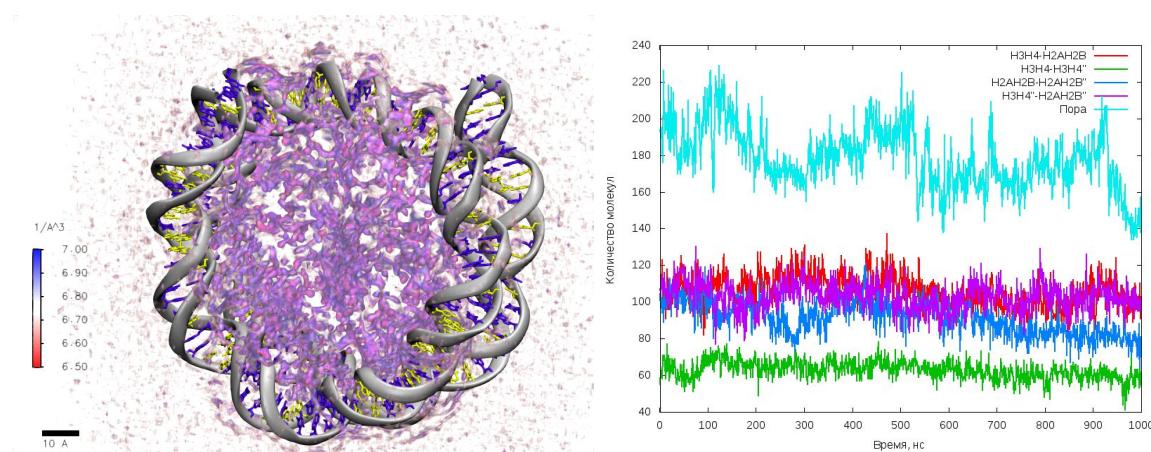


Рисунок 14. Слева: визуализация распределения плотности воды в нуклеосоме по объему расчетной ячейки. Для наглядности гистоны не показаны. Справа: график зависимости числа молекул воды в нуклеосоме от времени моделирования. Гистоновые контакты показаны цветами, красным – контакт первой пары димеров H3-H4 и H2A-H2B, фиолетовым – контакт второй пары димеров H3-H4 и H2A-H2B, синим – контакт двух димеров H2A-H2B, зеленым – контакт димеров гистонов H3H4. Голубым цветом показано число молекул воды в нуклеосомной поре.

Наличие в нуклеосоме большого числа молекул воды между гистонами делает ее проницаемой для одновалентных ионов, позволяя им эффективно экранировать заряженные группировки гистонов и ДНК. Было показано, что ионы распределены по нуклеосоме неравномерно: для натрия характерно преимущественное расположение вокруг ДНК, небольшое число ионов натрия обнаружено на поверхности гистонов и в межгистонных контактах. Ионы хлора не проникают между гистонами, но чаще ионов натрия заходят в нуклеосомную пору. Высокая концентрация ионов хлора в нуклеосомной поре объясняется наличием на поверхности гистонов большого количества положительно заряженных аминокислот.

Катионы натрия обнаружены преимущественно в малой бороздке ДНК, что объясняется их взаимодействием с фосфатными группировками. Аналогичные результаты были показаны в работе [94]. Такой характер распределения связан с комбинацией различных видов взаимодействий, в частности, малый размер иона позволяет ему глубже проникать в бороздку ДНК и взаимодействовать с фосфатными группировками.

Повышенная концентрация ионов обнаружена вблизи димера H2A-H2B над участком, называемым «кислотный лоскут» («acidic patch»). В литературе предполагается, что этот участок является сайтом связывания для хвостов гистона H4 соседней нуклеосомы при формировании хроматиновых фибрилл.

Расположение ионов натрия вблизи нуклеосомной ДНК позволяет эффективно экранировать заряженные фосфатные группировки. В среднем вокруг ДНК находится 18-22 иона натрия на каждые 10 н.п. Такого рода экранирование позволяет снизить взаимодействия между соседними нуклеосомами, а также между витками суперспирали ДНК внутри нуклеосомы. Уменьшение силы взаимодействий между витками ДНК может способствовать компактизации хроматина, так как нуклеосомы будут способны ближе подходить друг к другу.

3.2. Изучение динамических мод в нуклеосомах

3.2.1. Движение расщепления нуклеосом

Ковариационный анализ движений атомов в МД, проведенный по белковому оству гистонов и оству ДНК, выявил набор крупномасштабных движений в нуклеосоме. Наиболее амплитудный собственный вектор, полученный в результате ковариационного анализа, можно классифицировать как движение расщепления нуклеосомы (Рис. 15). В работе [21] состояние открытой нуклеосомы получили искусственно, путем фиксации контакта гистонов H3-H3 в качестве «петли» и введения дополнительного потенциала для раскрытия «петли». Оцененное количество энергии, необходимой для того, чтобы раскрыть нуклеосому (30 ккал/моль), слишком велико для спонтанного раскрывания нуклеосомы. Тем не менее, предполагается, что такое движение возможно при условии коллективного перехода целой цепи нуклеосом [21]. Обнаружение данной моды движений в траектории свободной динамики свидетельствует о том, что движения, ведущие к раскрытию нуклеосомы, возможны. Относительно недавно было показано, что такое движение происходит в нуклеосомах спонтанно [22], однако из данной работы остается неясным, происходит ли во время движения перестройка на уровне гистонового октамера, так как в работе применялись флуоресцентные метки на ДНК. Обнаружение такой подвижности в траектории МД свидетельствует в пользу того, что расщепление нуклеосом происходит с изменением конформации гистонового ядра.

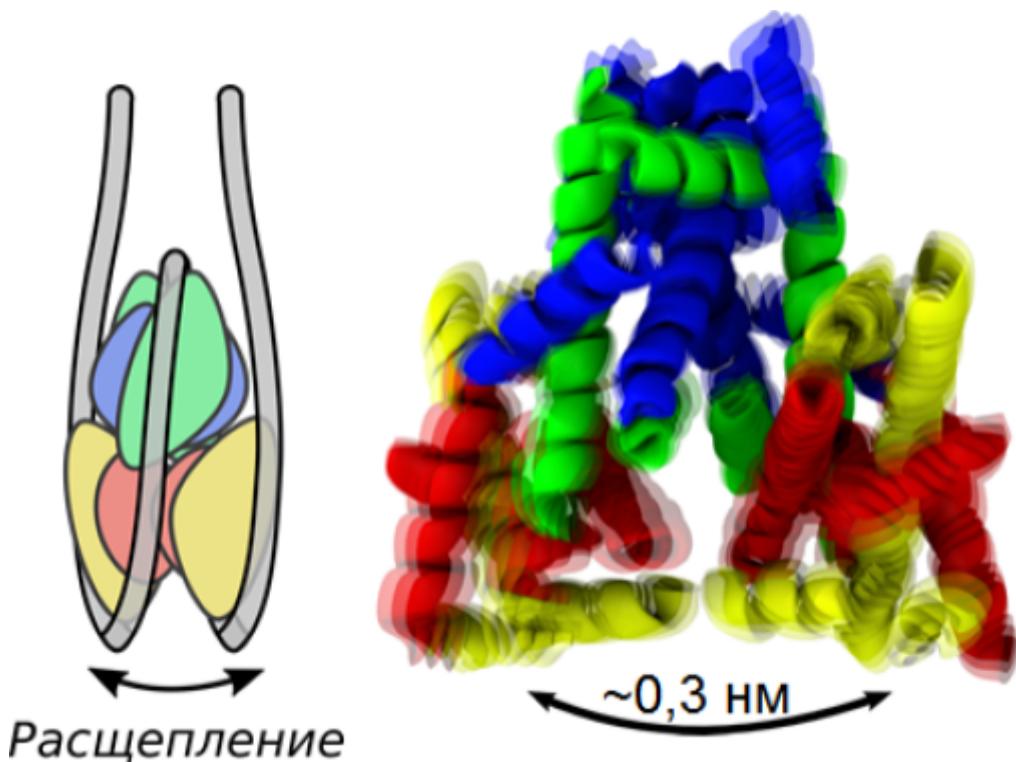


Рисунок 15. Слева - схема изменений в структуре, происходящих в ходе движения расщепления нуклеосомы. Справа - визуализация движений вдоль наиболее амплитудного собственного вектора, полученного методом ковариационного анализа. Показаны 3 наложенные структуры построенные при минимальном, среднем и максимальном значениях собственного вектора.

Возможное функциональное значение движения раскрывания нуклеосом не известно однозначно, предположительно, оно может играть роль в процессе компактизации 30-нм фибриллы [21]. Весьма вероятной видится возможность открывания нуклеосом при взаимодействии РНК-полимеразы II со второй петлей ДНК. Энергия, которую необходимо затратить для того, чтобы раскрыть нуклеосому, состоит из энергии гидратации неполярных прилегающих участков гистонов H2A-H2B и энергии деформации суперспирали ДНК. Таким образом, нуклеосомы с гистонными вариантами, содержащими другие аминокислотные остатки в положении контактов, могут отличаться вероятностью расщепления. Так наличие центромерного гистонового варианта СенH3 приводит к увеличению величины расщепления нуклеосом, причем данный эффект

исчезает при связывания белка кинетохора CENP-A [37] с центромерной нуклеосомой.

3.2.2. Откручивание ДНК от нуклеосомы

Процесс спонтанного откручивания ДНК от нуклеосомы происходит на временах порядка 100 мс [49], что делает его недоступным для изучения методом молекулярной динамики. По этой причине, при моделировании полноатомной МД нуклеосомы в течение 1 мкс откручивания ДНК от гистонов обнаружено не было. Однако, на данном временном промежутке было показано образование асимметричной укладки ДНК в областях входа и выхода из нуклеосомы (Рис. 16 А, Рис. 18). Интересно, что в работе [24] похожая конфигурация ДНК была показана методом крио-ЭМ (Рис. 16 Б). В этой работе также было показано, что около 10 % нуклеосом отличаются тем, что имеют открученную ДНК. Изменения в геометрии в данной области может приводить к значительному изменению геометрии линкерного участка ДНК, изменяя степень компактизации ДНК в хроматиновых фибрillах. Тот факт, что геометрия ДНК изменяется асимметрично, может быть связан с асимметрией последовательности ДНК [19] и влиять на прохождение РНК полимеразы II сквозь нуклеосомы [95].

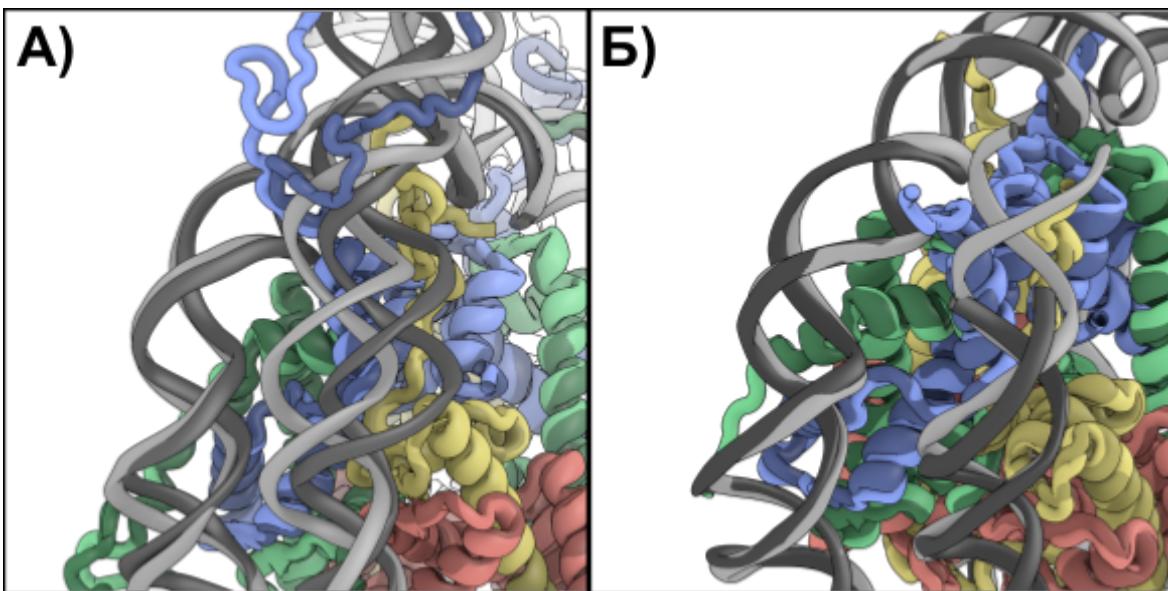


Рисунок 16. А) отличие начальной структуры ДНК (показана светло-серым) от структуры с “выпячиванием”, наблюдаемым в ходе свободной молекулярной динамики (показана темно-серым). Б) отличие канонической структуры ДНК (показана светло-серым) от структуры с “выпячиванием”, показанным методом крио-ЭМ в работе [24]. Цветовая нотация гистонов аналогична Рис. 1

Так как за время моделирования не было обнаружено состояний нуклеосом значительно открученной ДНК, были исследованы нуклеосомы с искусственно открученной на 20 н.п. ДНК. Было показано, что время возвращения ДНК из открученного состояния значительно зависит от времени релаксации ионного окружения на этапе подготовки системы.

В ходе моделирования МД после короткой релаксации системы (1 нс), нуклеосома мгновенно возвращалась в конфигурацию, близкую к кристаллической. Наиболее амплитудный этап возвращения ДНК занял менее 15 нс, после чего система была стабильна на протяжении всего времени моделирования (200 нс). Одной из возможных причин столь быстрого движения является недостаточное время релаксации ионов вокруг ДНК, что приводит к слабому экранированию зарядов на поверхности соседних витков

ДНК. Однако из графиков А) и Б) на Рис. 17 видно, что концентрация ионов вокруг ДНК возрастает быстро и за 1 нс успевает достигнуть равновесного значения, которое затем сохраняется на протяжении длительной (10 нс) релаксации системы.

Длительная релаксация (10 нс) ионного окружения при фиксированной ДНК приводит к тому, что на протяжении 50 нс свободной динамики нуклеосома не возвращается в исходную конфигурацию, а отвернутая ДНК флюктуирует вдали от конформации, характерной для кристаллической структуры. Таким образом, изначально идентичные системы ведут себя различно в зависимости от времени релаксации, несмотря на то, что характер распределения катионов вокруг ДНК схож в обоих случаях.

Одной из возможных причин такого поведения является перераспределение зарядов на поверхности гистонов. Так как их движения в пространстве ограничены, следует ожидать меньшей скорости их адаптации к конфигурации со спрямленным участком ДНК. На графике В) Рис. 17 показано изменение квадрупольного момента, образуемого гистоновыми зарядами вдоль оси, перпендикулярной плоскости супервитка ДНК. Видно, что характер изменения квадрупольного момента отличается от характера изменения распределения катионов, квадрупольный момент изменяется медленнее и за 1 нс не успевает достичь значений, которых он достигает за 10 нс. Таким образом, для сборки нуклеосомы требуется не только эффективное экранирование зарядов на поверхности ДНК, но и определенная конфигурация зарядов на поверхности гистонов. Полученные данные также свидетельствуют о необходимости изменения конформации гистоновых димеров при откручивании ДНК. Данный факт был недавно показан методом крио-ЭМ в работе [24].

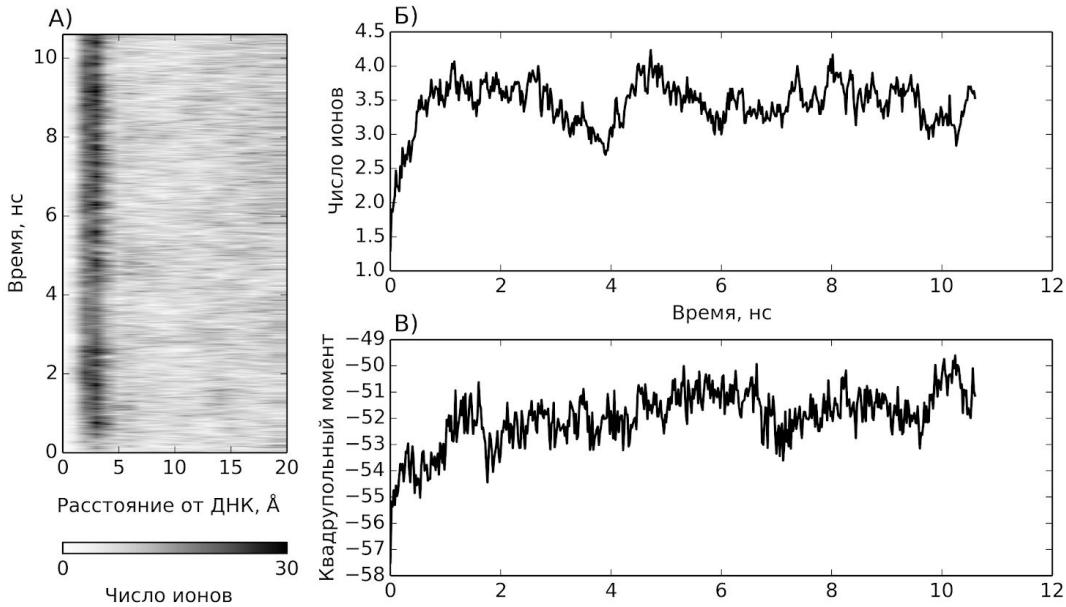


Рисунок 17 А) Карта изменения распределения ионов во время релаксации растворителя вокруг спрямленного участка ДНК. Б) График зависимости количества ионов находящихся на расстоянии менее 1 нм от ДНК от времени релаксации системы. В) График изменения квадрупольного электрического момента гистонов, рассчитанного вдоль оси, перпендикулярной плоскости супервитка нуклеосомы, во время релаксации системы.

3.2.3. Подвижность линкерных участков ДНК

Для изучения подвижности областей линкерной ДНК в нуклеосоме была создана полноатомная молекулярная модель, с длинной линкерных участков 20 н.п. Модель была создана путем удлинения ДНК в кристаллической структуре. В ходе моделирования МД в течение 1 мкс линкерные участки оказались значительную подвижнее, чем участки ДНК, связанные с гистонами. Такое поведение согласуется с результатами, показанными методом анализа нормальных мод [96]. Вариабельность структуры линкерной области ДНК была показана в работе [97] для нуклеосом с короткими (5 н.п.) линкерными участками ДНК. Усредненная по траектории МД конфигурация ДНК

значительно отличается от начальной структуры: наблюдаемые в траектории МД флуктуации конформации линкерных участков ДНК заметают область пространства в форме конуса с углом раствора порядка $\pm 45^\circ$ (Рис. 18). При этом не было обнаружено значительной корреляции между конформацией линкеров. Моделирование этой же системы при высокой ионной силе (1 M NaCl) привело к тому, что линкеры в среднем сблизились, что свидетельствует о влиянии электростатического экранирования зарядов ДНК на конформацию линкерной области и согласуется с измерениями эффективности FRET, в которых было показано, что с ростом ионной силы, расстояние между линкерными участками ДНК в нуклеосоме уменьшается [98].

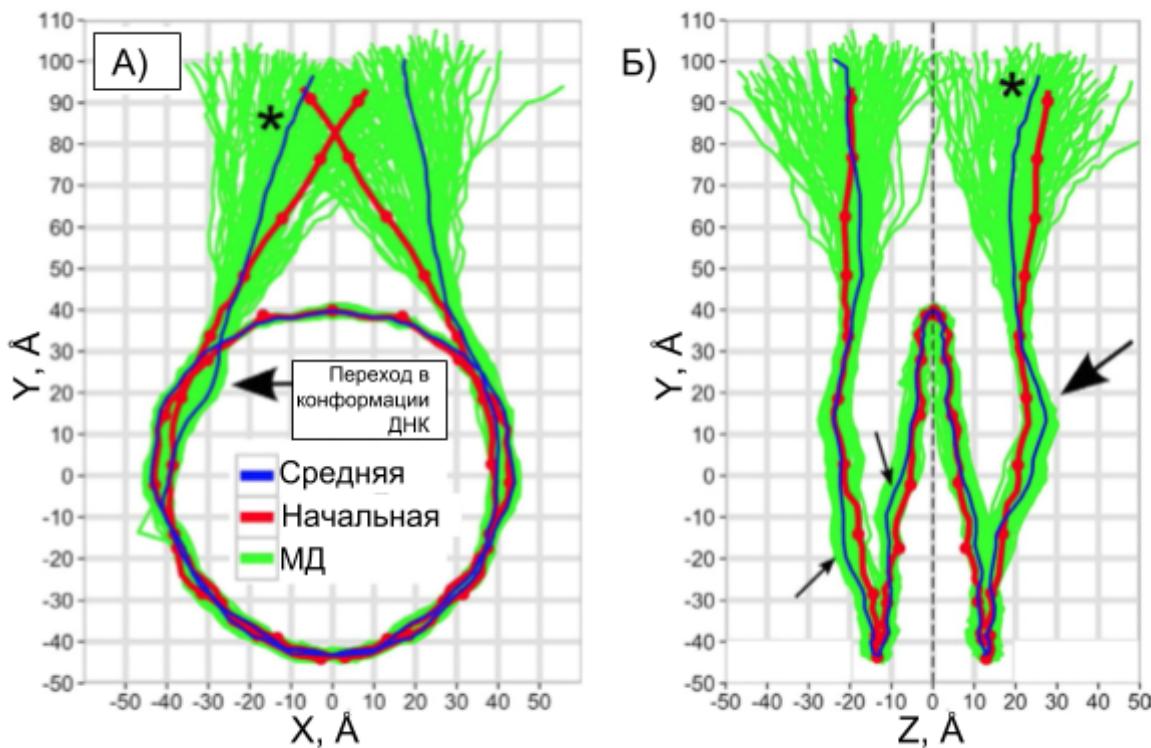


Рисунок 18. Изменение геометрии ДНК в ходе МД в течение 1 мкс. А) вид спереди. Б) вид сбоку. Линии построены через центры н.п. Красная линия соответствует начальной конфигурации ДНК, зеленые - мгновенным конфигурациям из траектории МД, синяя - усредненной по траектории конфигурации.

Глава 4.

Определение структуры нуклеосом и их комплексов с белками хроматина разработанными методами моделирования

4.1. Разработанный подход и его ограничения

Моделирование нуклеосом в разработанном подходе начинается с того, что молекулярная система разделяется на “жесткую” белковую часть и гибкую ДНК. Описание энергии изгиба ДНК можно рассчитывать при помощи силовых полей, которые применяют для моделирования методом молекулярной динамики, однако ресурсоемкость таких расчетов и проблемы с явным учетом электростатических взаимодействий ограничивают применение такого подхода для построения крупных молекулярных моделей. В разработанном методе применен другой подход: энергия ДНК рассчитывается в пространстве переменных динуклеотидных шагов, применяя набор эмпирических силовых коэффициентов, которые были получены из множества различных кристаллических структур [88] (см. 2.2.1 Описание геометрии ДНК). Расчет конформации в таких координатах можно производить быстрее, так как число переменных в модели значительно меньше.

Разработанный метод позволяет создавать модели геометрии ДНК в комплексах с белками на основании интегрирования экспериментальных данных spFRET и данных о локальной жесткости ДНК (см. 2.2 Метод интегративного моделирования нуклеосом и их комплексов.). Так как минимизация происходит в пространстве обобщенных координат конформации ДНК, а расчет расстояний в трехмерном пространстве, на каждом шаге минимизации требуется производить расчет атомарной модели ДНК. Общий алгоритм поиска конфигурации ДНК, отвечающий критериям жесткости нукleinовой кислоты, расстояниям, полученным из экспериментов по

измерению эффективности spFRET, а также ограничениям, полученным из анализа профилей футпринтинга, показан на Рис. 11.

К недостаткам такого подхода можно отнести отсутствие учета взаимодействий между участками ДНК, что может привести к возникновению стерических перекрываний внутри молекулы. Однако при корректном выборе участков ДНК для минимизации появление таких структур маловероятно.

Моделирование комплексов хроматина в таком приближении позволяет быстро создавать начальные модели для вписывания в карты электронной плотности, полученные из электронной микроскопии, а также проверять “адекватность” экспериментальных данных и их согласованность со структурами из банков данных.

4.2. Определение предпочтительной последовательности ДНК в нуклеосоме, содержащей линкерный гистон

Разработанный метод был применен для оценки зависимости энергии деформации ДНК от последовательности для известных комплексов нуклеосомы с линкерными гистоном (ЛГ). Связывание этого гистона способствует более высокому уровню компактизации ДНК в фибриллах. Оказывая влияние на размещение/упорядочение ДНК в клетке, гистон H1 играет большую роль в регуляции экспрессии генов. Структурные особенности взаимодействия линкерного гистона и нуклеосомы до сих пор неизвестны и их изучение вызывает большой интерес.

В литературе на данный момент описан ряд структур [99–102] возможного расположения ЛГ в комплексе нуклеосомы с линкерным гистоном (хроматосоме), условно называемых «на диаде» (НД, “on-dyad”) и «вне диады» (ВД, “off-dyad”). На данный момент получена кристаллическая структура хроматосомы с глобуллярным доменом ЛГ H5 G. gallus (H5 является историческим названием ЛГ H1 у G. gallus) в конфигурации НД, а также модель

структуры хроматосомы с глобулярным доменом ЛГ H1 *D. melanogaster* в конфигурации ВД [101]. Важно отметить, что структура хроматосомы в конфигурации ВД была построена с помощью методов молекулярного докинга на основании структуры тетрануклеосомы (pdb-код 1ZBB), полученной методом ЯМР. Возможно данные структуры не исчерпывают конфигурационное пространство комплекса нуклеосомы с ЛГ. Так в обзоре [103] предлагается рассматривать комплекс нуклеосомы с ЛГ как ансамбль множества возможных конфигураций.

Для определения зависимости типа связывания ЛГ от нуклеотидной последовательности линкерной ДНК была рассчитана разница деформационных энергий линкерных участков ДНК между двумя разными моделями связывания - на диаде (НД) и вне диады (ВД) для всех возможных последовательностей линкерных участков ДНК (Рис. 19 А). Также была произведена Z-оценка положения нативной последовательности (характерной для той структуры, что была экспериментально определена) в распределении рассчитанных разниц деформационных энергий ($Z=0,75$), исходя из которой оригинальная последовательность, использованная для экспериментального получения структур, склонна к формированию структуры НД.

Как видно из Рис. 19 Б, большинство позиций в последовательностях нуклеотидов линкерных участков ДНК не значимы для определения геометрии ДНК в рамках моделей НД и ВД, кроме нуклеотидов в позициях -7, -4 и -3. В последовательностях, предпочтительных для модели НД, в этих позициях располагаются A/T, A/T, G/C, в то время как для модели ВД более предпочтительны C/G, C/T, G/T. Важная роль тимидинов в линкерной ДНК также была показана в работе [104].

Также по разнице в деформационных энергиях были найдены предпочтительные (оптимальные) последовательности линкерной ДНК (для которых энергия изгиба максимально соответствует конформации) для моделей

НД (CCGTCCCCGTC-ППН-ACGCCGGCGG) и ВД (GACGCCCGAC-ППН-GTGATGCTGC), где ППН - последовательность, позиционирующая нуклеосомы.

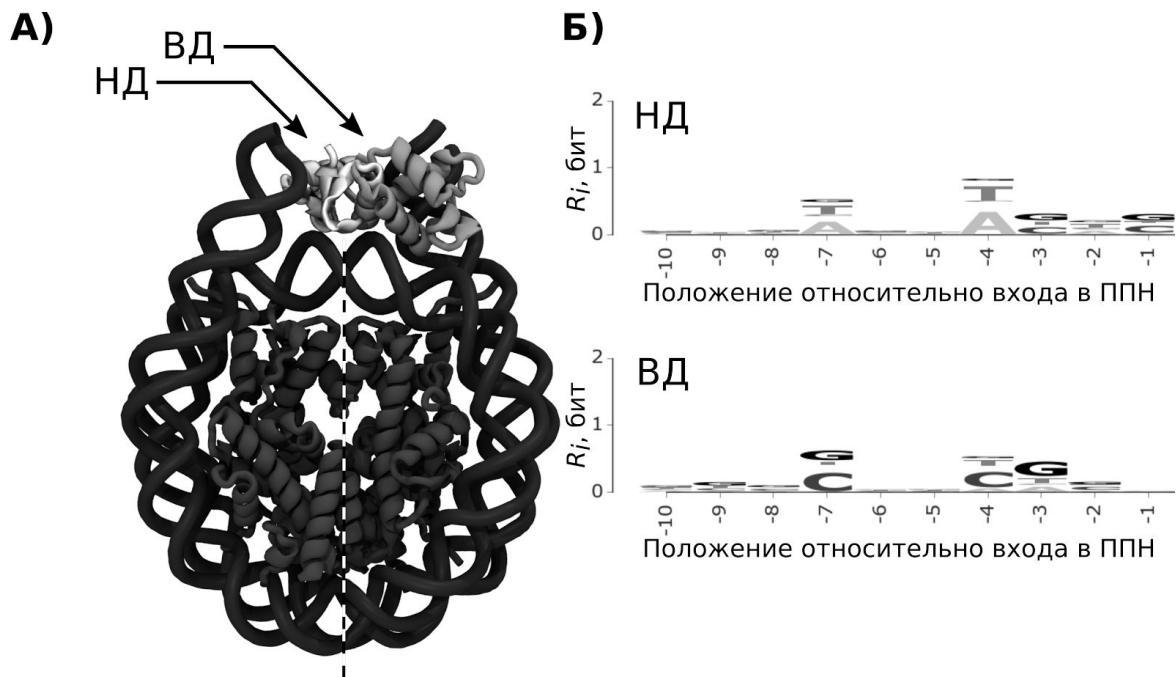


Рисунок 19. А) Внешний вид структуры хроматосомы. Белок и ДНК показаны в виде отображения вторичной структуры. Линкерные гистоны выделены оттенками серого. Диадная ось показана пунктирной линией. Б) Визуализация частоты встречаемости нуклеотидов для последовательностей склонных к формированию структуры НД (сверху) и ВД (снизу). Визуализация выполнена в виде логотипов последовательностей.

4.3. Модель нуклеосомы с линкерным гистоном H1

Как уже было отмечено выше, на данный момент не существует однозначного представления о структуре нуклеосомы в комплексе с линкерным гистоном. По этой причине была построена модель на основании экспериментов по spFRET. За основу для построения модели была выбрана структура 1KX5 [15] из банка данных PDB, к которой были добавлены прямые линкеры в соответствии с последовательностью, что применялась в

эксперименте FRET. После проведения минимизации геометрии ДНК с ограничениями расстояний из данных FRET была получена асимметричная структура с параллельным расположением линкерных участков ДНК (Рис. 20).

Позиционирование гистона H1 зависит от множества факторов: солевого окружения, посттрансляционных модификаций гистона, вариантов гистона H1. На данный момент определено несколько трехмерных структур комплексов линкерного гистона с нуклеосомой [99,101,102,105,106]. Полученная нами модель схожа по конфигурации линкеров с моделью, построенной в работе [72], где структуру хроматосом исследовали методом гидроксильного футпринтинга и электронной микроскопии.

Интересно, что условия проведения экспериментов в работах по определению перечисленных структур различались во всех работах. По всей видимости, для комплекса линкерного гистона с нуклеосомами свойственна не одна определенная конфигурация, а целый ансамбль структур [103]. Данные spFRET, в свою очередь, позволяют определять не только распространенные состояния, но и оценивать вариабельность расстояний. Такую информацию в будущем можно применять для построения наборов вероятных моделей разработанными методами моделирования.



Рисунок 20. Модель изменения конформации нуклеосомы при связывании гистона H1. Слева показана начальная модель, основанная на структуре 1KX5 [15], справа показана модель соответствующая набору парных расстояний из измерений методом spFRET.

4.4. Определение позиционирования ДНК на нуклеосомах

Для построения моделей нуклеосом могут быть использованы не только результаты измерений парных расстояний методом spFRET, зачастую достаточно данных гидроксильного футпринтинга. Так как для нуклеосом

характерна ось псевдосимметрии - диадная ось, при повороте нуклеосомы вдоль этой оси на 180° одна цепь ДНК меняется местами с другой (Рис. 21 А). Эта особенность устройства нуклеосом приводит к тому, что профили футпринтинга для обеих цепей ДНК должны в точности совпадать вблизи диадной оси. Таким образом, рассчитывая коэффициент корреляции между профилями расщепления обеих цепей ДНК, можно с точностью до 1 н.п. определить положение диады на ДНК, и позицию ДНК относительно гистонов. Для проведения анализа результатов гидроксильного расщепления ДНК была разработана программа HYDROID (см. 5.2 Программа для обработки профилей перекисного расщепления ДНК) [92]. Ранее [63,68,70,107,108] позиционирование ДНК на нуклеосоме определяли путем анализа профилей футпринтинга по отдельным цепям, определяя лишь приблизительное положение ДНК относительно диады. В других работах положение ДНК определяли путем сайт-специфического расщепления ДНК при помощи гидроксил-радикалов. Этот метод тоже позволяет достигать точности в 1 н.п., однако требует внесения специальных меток в гистоновый октамер в районе диадной оси [109,110].

Используя разработанное программное обеспечение было определено относительное расположение ДНК в нуклеосоме, содержащий вариант гистона CENH3. Определенное таким методом положение отстоит на 3 н.п. от положения определенного ранее методом футпринтинга микрококковой нуклеазой [111]. Благодаря точному определению положения ДНК относительно диады, была построена модель нуклеосомы, содержащей вариант гистона CENH3 (Рис. 21 Б)

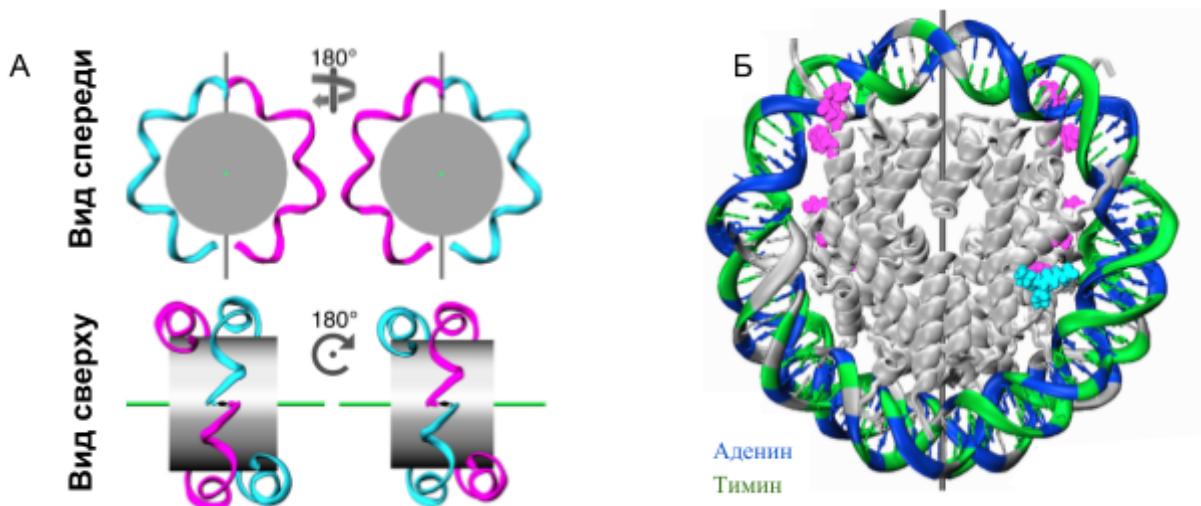


Рисунок 21. Определение ориентации положения ДНК на гистоновом октамере. А) Иллюстрация взаимной ориентации цепей ДНК в нуклеосоме при повороте вдоль диадной оси. Б) Модель нуклеосомы, построенной по данным гидроксильного футпринтинга.

4.5. Модель разворачивания ДНК и потери гистонов при взаимодействии с гистоновым шапероном FACT

Сборка и гистоновый состав нуклеосом может регулироваться гистоновыми шаперонами. Один из таких шаперонов - FACT отвечает за введение в состав нуклеосом димера гистонов H2A-H2B. Наши коллеги из группы исследования транскрипции произвели ряд экспериментов с применением метода spFRET для обнаружения конформационных изменений в нуклеосомах под действием FACT. Для этого использовали набор из 3 пар меток на разных участках нуклеосомной ДНК вблизи входа в нуклеосому (проксимальные), по центру нуклеосомы (медиальные) и вблизи выхода их нуклеосомы (дистальные) (Рис. 22). Было показано, что FACT вызывает значительные и обратимые изменения в эффективности переноса энергии между метками. По этим данным были построены вероятные модели изменений

в нуклеосоме под действием шаперона FACT при помощи разработанных методов моделирования нуклеосом.

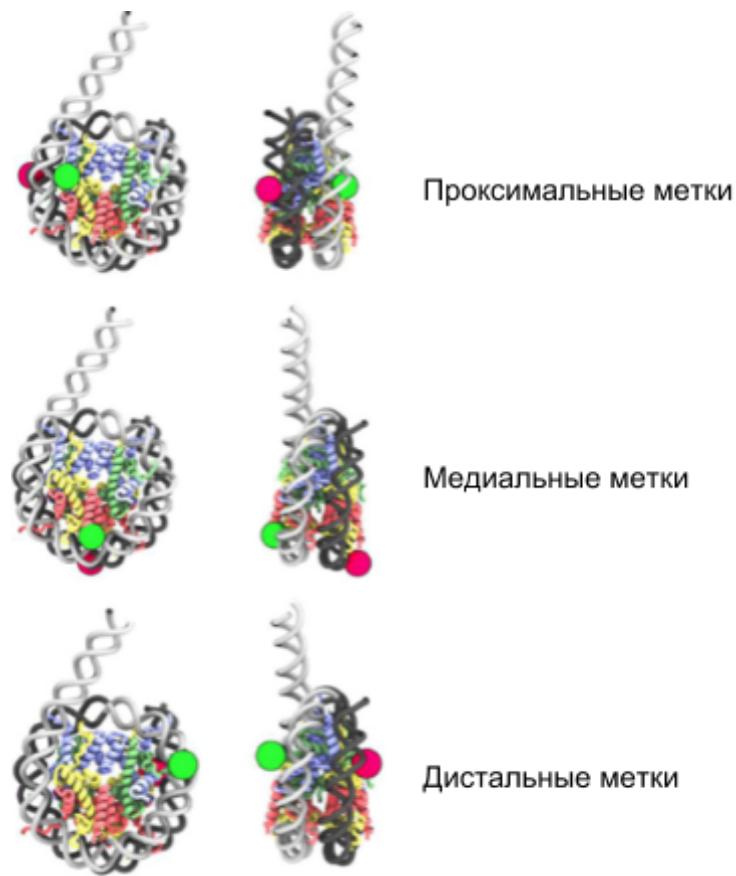


Рисунок 22. Расположение флуоресцентных меток на нуклеосоме. Зеленым показаны положения донора (Cy3), красным - акцептора (Cy5).

Исходя из измеренного фактора детекции и расчетов эффективности переноса энергии из молекулярных моделей (см. 2.3. Измерение spFRET, квантовых выходов и коэффициента детекции микроскопа) нами было показано, что для того, чтобы произошло такое значительное изменение эффективности переноса, от нуклеосомы должно быть открученено около 100 н.п. ДНК: 40 н.п. с одной стороны и 60 н.п. с другой стороны (Рис. 23).

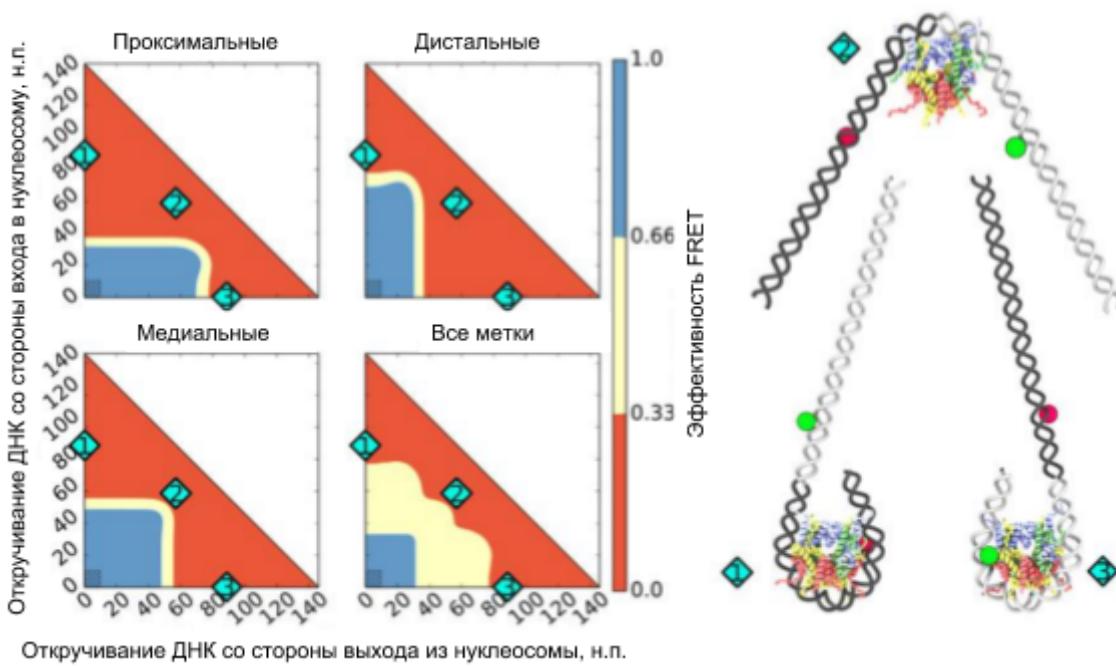


Рисунок 23. Анализ зависимости эффективности FRET степени разворачивания нуклеосом. Слева: тепловые карты ожидаемых эффективностей переноса энергии на трех парах флуорофоров. Красные и голубые области соответствуют степеням откручивания ДНК с низкой и высокой эффективностью FRET соответственно. Затемненные участки тепловых карт (левый нижний угол) отвечают нативным состояниям нуклеосом (состояниям близким к наблюдаемым в кристаллических структурах). Справа: Модели конформаций нуклеосом, соответствующие отмеченным номерам на картах.

По этим данным были построены молекулярные модели, соответствующие таким степеням отворота ДНК (Рис. 24): модель откручивания ДНК с сохранением гистонового октамера (Рис. 24.2), модель откручивания ДНК с образованием структуры “бабочка” (Рис. 24.3), модель с образованием двух хемисом (Рис. 24.5), а также модель полного разрушения октамера гистонов (Рис. 24.4). Все эти модели в равной степени соответствуют наблюдаемым изменениям в эффективности переноса энергии в присутствии гистонового шаперона FACT.

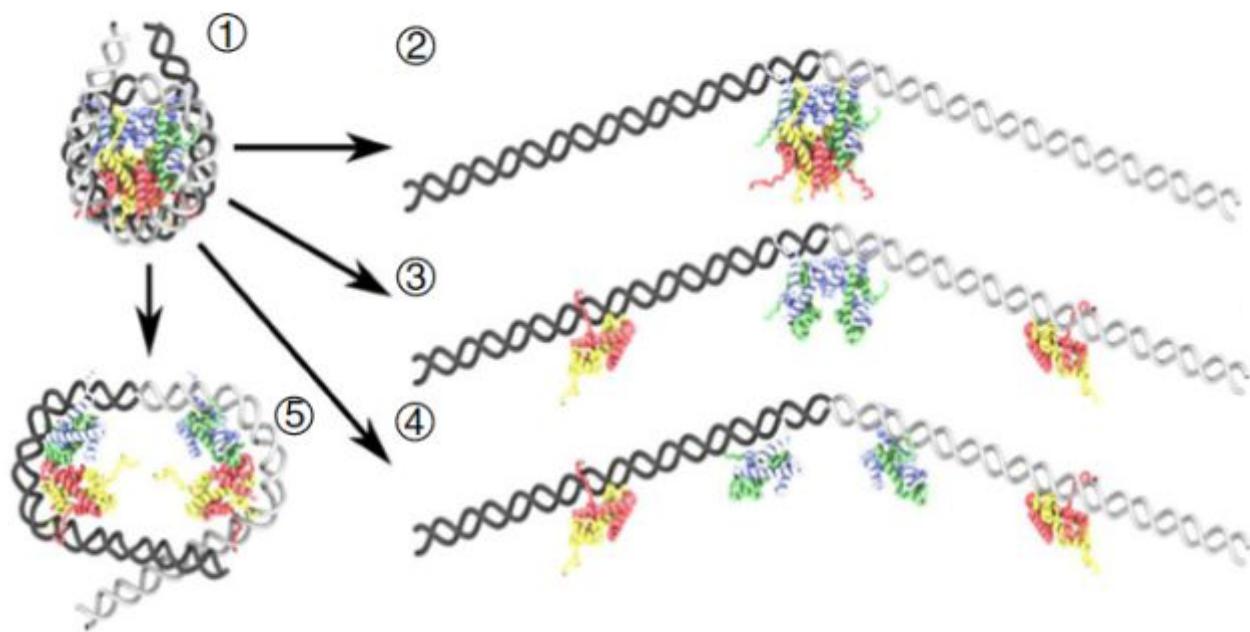


Рисунок 24. Модели разворачивания нуклеосом, вызванного взаимодействием с шапероном FACT. Интактные нуклеосомы (1) могут разворачиваться от интактного октамера (2), ДНК может отворачиваться с разрушением (3) или без (4) разрушения интерфейса взаимодействия гистонов H3–H3 или путем открытия интерфейса H3-H3 без откручивания ДНК (5) с формированием двух хемисом.

Потеря гистонов в процессе откручивания ДНК при низких концентрациях нуклеосом должна быть необратимой, так как в ходе экспериментов в раствор дополнительно добавляли конкурирующую за гистоны ДНК, не меченную флуорофорами. Тот факт, что наблюдаемый эффект был обратим, свидетельствует о том, что разворачивание октамера должно происходить без потери гистонов H2A-H2B.

4.6. Модель компактных динуклеосом

Другим примером влияния внешних факторов на структуру нуклеосом является образование компактных динуклеосом. Формирование таких частиц было показано в работе [112], где при помощи атомно-силовой микроскопии

были исследованы нуклеосомы, собранные на ДНК, содержащей 2 позиционирующих последовательности. Нашиими коллегами из группы исследования транскрипции были получены данные об изменениях в эффективности переноса энергии между метками на ДНК при формировании динуклеосом на матрице, содержащей лишь одну позиционирующую последовательность, а также получены распределения расстояний между нуклеосомами методом электронной микроскопии.

При моделировании динуклеосом необходимо ввести 3 параметра: длина линкера между областями нуклеосом (отступ), откручивание ДНК от первой нуклеосомы и откручивание от второй нуклеосомы (Рис. 25 слева). Для упрощения поиска моделей, соответствующим экспериментальным данным, было введено допущение, что нуклеосомы разворачиваются одновременно (то есть степень откручивания ДНК равна для обеих нуклеосом). Моделирование производилось при помощи разработанных методов, описанных выше. Были рассчитаны все возможные межнуклеосомные расстояния в пространстве переменных отступ-откручивание (Рис. 25 справа).

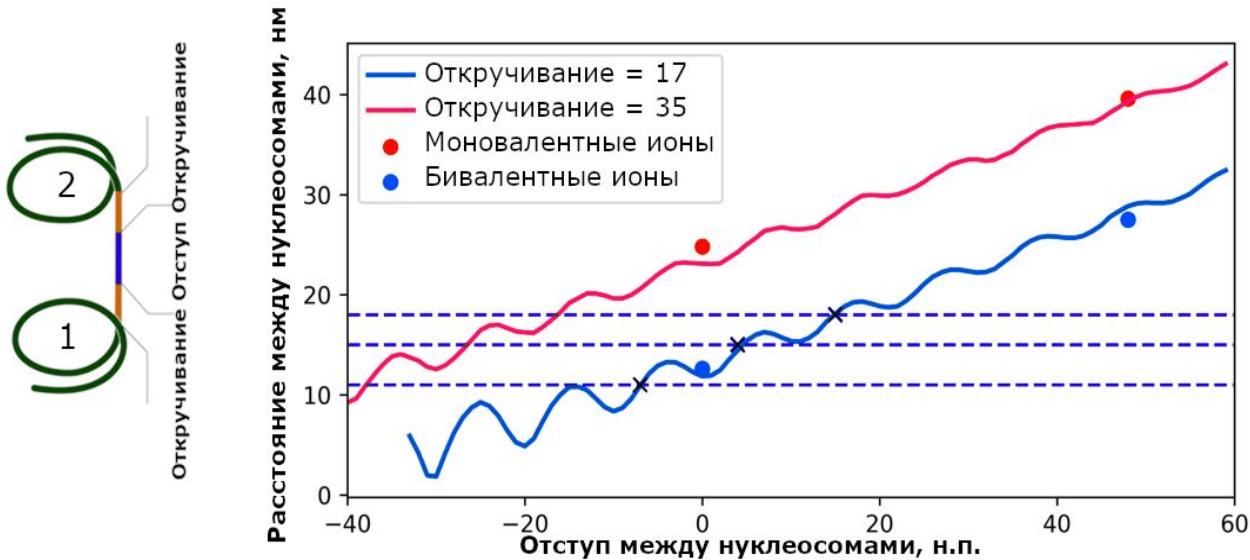


Рисунок 25. Слева: схема модели динуклеосомы. Справа: Зависимость межнуклеосомных расстояний от отступа между нуклеосомными территориями

для разных степеней симметричного откручивания. Точками отмечены данные из работы [112]. Линиями показаны зависимости межнуклеосомных расстояний для разных степеней отворота ДНК (17 н.п. и 35 н.п.). Эти зависимости хорошо совпадают с парами экспериментальных точек. Штриховкой показаны линии, соответствующие расстояниям из электронной микроскопии, пересечения с которыми отмечены крестиками. Данные пересечения соответствуют состояниям отступа в моделях основных классов, наблюдавшихся в электронной микроскопии.

Расстояниям, измеренным при помощи электронной микроскопии, соответствует множество комбинаций отступ-откручивание. По этой причине для уточнения моделей были использованы данные из работы [112], которая была проведена в похожих условиях. В этой работе величина отступа была зафиксирована, так как нуклеосомы были собраны на ДНК матрице с двумя позиционирующими последовательностями. Таким образом, изменение в расстояниях между нуклеосомами может происходить только по причине откручивания ДНК от нуклеосом. Экспериментальные точки из работы [112], согласно нашим моделям, соответствуют степени откручивания в 17 н.п. для измерений в присутствии двухвалентных ионов и 35 н.п. в отсутствии таковых. Используя величину откручивания ДНК в присутствии двухвалентных ионов, были определены величины отступа между нуклеосомами: -7, 4 и 15 н.п. для классов 1, 2, и 3 соответственно (Рис. 26). Полученные модели расположены периодично с шагом в 10 н.п. Такая периодичность может быть как свидетельством наличия способностей последовательности к позиционированию нуклеосом, так и результатом влияния подложки на образец в эксперименте. Влияние подложки может быть больше, чем энергия взаимодействий ДНК, что приведет к скольжению нуклеосом (изменению отступа).

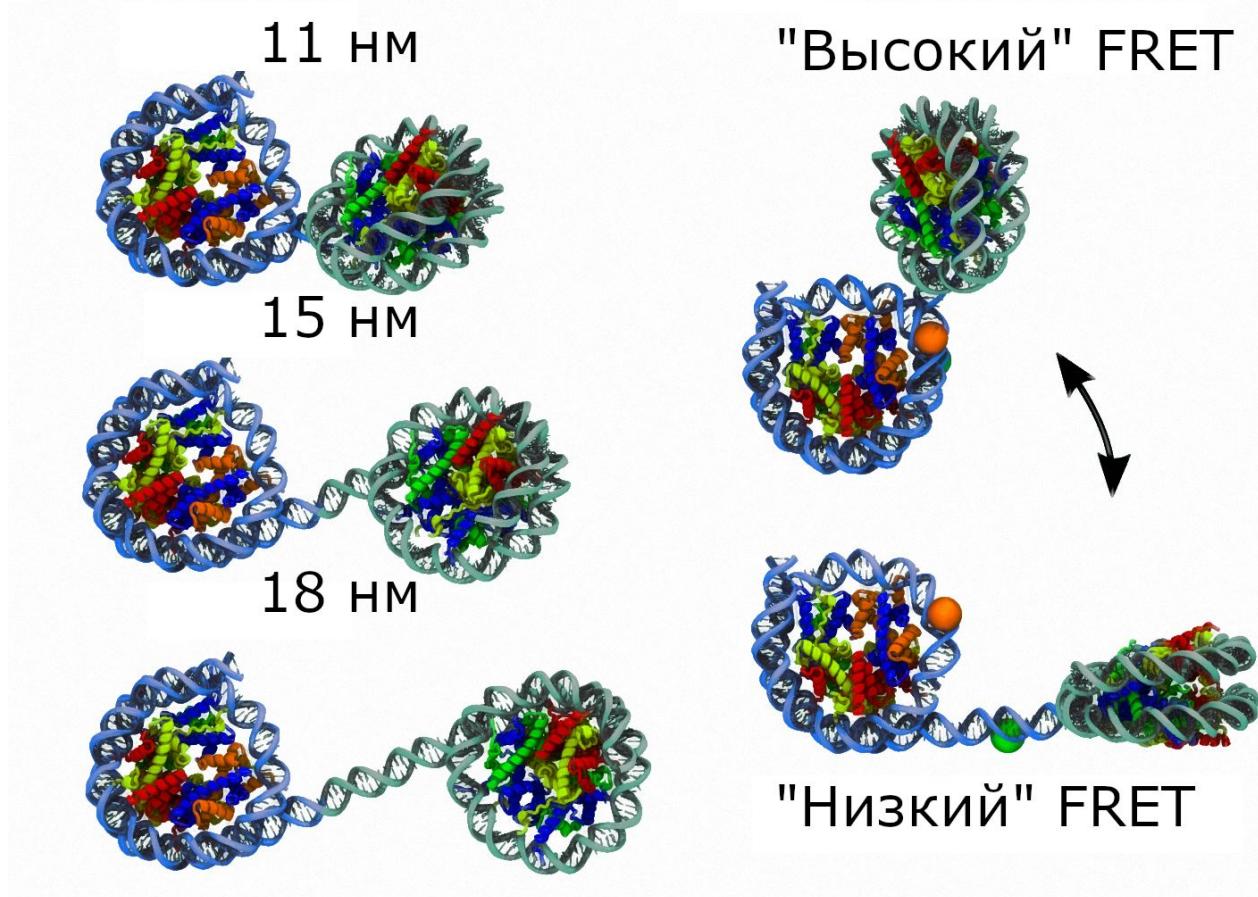


Рисунок 26. Модели динуклеосом. Слева: основные классы, наблюдаемые в ЭМ. Справа: симметричность и асимметричность откручивания может приводить к изменению эффективности FRET.

Исходя из предоставленных нам данных spFRET эффективность переноса энергии для динуклеосом ниже, чем для нуклеосом. Такое изменение эффективности свидетельствует об отвороте на 24-30 н.п. Возможной причиной такого откручивания ДНК может быть электростатическое отталкивание гистоновых октамеров. Другая причина может заключаться в том, что одна нуклеосома может скользить по последовательности, захватывая позиционирующую последовательность другой. В работе [112] откручивание ДНК на 17 н.п. происходило как для близко расположенных нуклеосом (отступ = 0), так и для далеко расположенных нуклеосом (отступ = 48). В случае отталкивания нуклеосом, откручивание должно снижаться с увеличением

расстояния между ними, однако этого не происходит. Более того, откручивание в 17 н.п. не должно приводить к значительному снижению эффективности переноса энергии, что говорит в пользу того, что вторая нуклеосома захватывает территорию первой, чем вызывает значительное откручивание ДНК на ней. В пользу данной концепции говорит тот факт, что в эксперименте использовалась ДНК, недостаточно длинная для позиционирования обеих нуклеосом в завернутом состоянии. Столкивающиеся нуклеосомы могут также взаимодействовать друг с другом длинными N-концами гистоновых хвостов. [4]. Помимо этого, большие величины откручивания ДНК были недавно показаны для нуклеосом в нативных условиях в исследовании методом криоэлектронной микроскопии [24], такое асимметричное разворачивание определенно приведет к падению эффективности переноса энергии.

Глава 5.

Разработанные программы

5.1. Программа для обработки интегрированного по времени сигнала флуоресценции

В ходе выполнения работы была разработана FRETty - программа для анализа данных spFRET. Это программное обеспечение позволяет быстро выполнять вычисление spFRET и визуализацию нескольких наборов данных и имеет интерактивный пользовательский интерфейс (рис.3). FRETty написан на языке Python с использованием широко используемых библиотек (numpy [113], matplotlib [114] и PyQt) и может быть легко модифицирован. Он распространяется в форме установочного файла для Windows и может быть установлен на MacOS или GNU / Linux из исходных файлов.

Основной рабочий процесс FRETty показан на Рис. 27. Несколько файлов можно загрузить или перетащить в панель списка файлов (рис. 3А), а затем выбрать для дальнейшего анализа. Интенсивности измеренных сигналов, а также гистограммы интенсивностей отображаются на вкладке “Raw Data”. Все настройки приведены на одной панели вместе с формулами, которые используются для расчета эффективности FRET.

Результаты расчетов эффективности FRET для одного или нескольких файлов можно визуализировать с использованием настраиваемого интерфейса matplotlib, а также экспортить в файлы csv или напрямую копировать из панели “Export” в любой редактор электронных таблиц для дальнейшего анализа и визуализации.

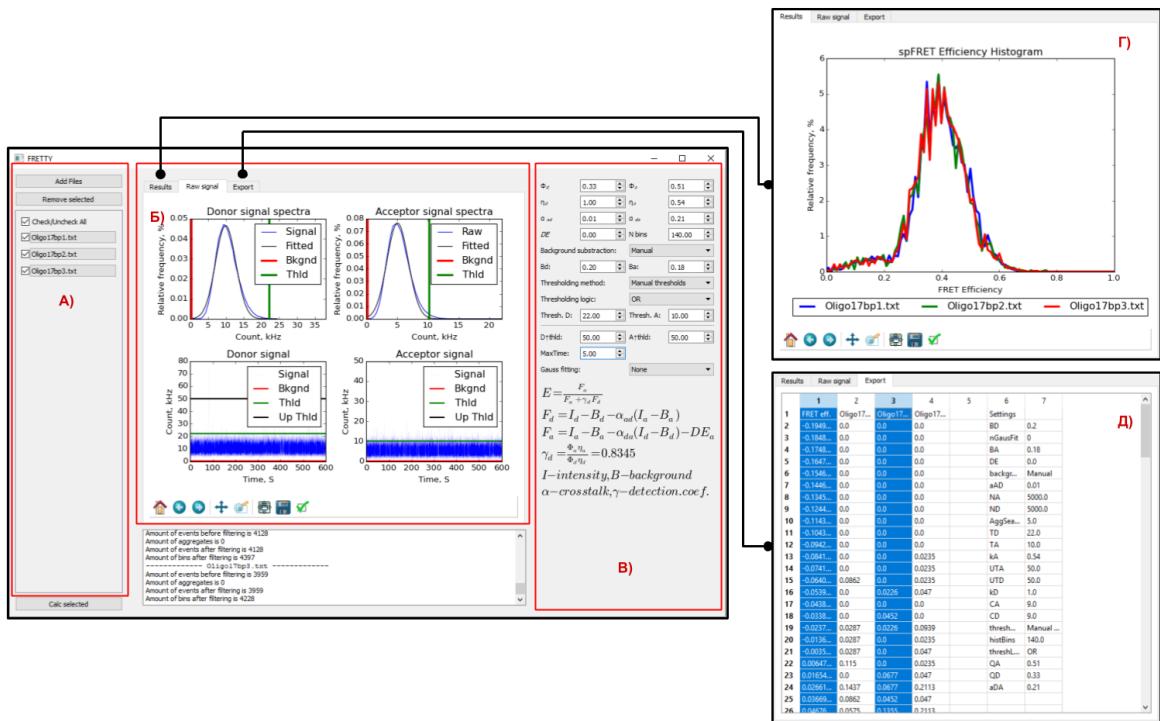


Рисунок 27. Внешний вид интерфейса программы FRETty. А) Список обрабатываемых файлов. Б) Панель просмотра данных. В) Панель настроек и справки. Г) Панель отображения результатов. Д) Панель экспорта результатов.

5.2. Программа для обработки профилей перекисного расщепления ДНК

В ходе выполнения работы была реализована программа HYDROID [92]. Алгоритмы, реализованные в данной программе основаны на идеях, предложенных в более ранних работах [115–117]. Тем не менее HYDROID (в отличие от других программ) свободно распространяется через репозитарий ANACONDA, и отличается наличием новых подходов, облегчающих задачу анализа профилей гидроксил-радикального расщепления.

Программа позволяет в полуавтоматическом режиме сопоставлять пики профиля расщепления с позициями вдоль последовательности ДНК, сравнивая их с аналогичными пиками, полученными в результате реакций Максама-Гилберта [64]. Программа позволяет идентифицировать не только хорошо разрешенные пики, но и аппроксимировать положение пиков по

соседним, в случае малой интенсивности или большой плотности пиков. На следующем этапе обработки программа позволяет аппроксимировать профиль перекисного расщепления при помощи линейной комбинации Гауссовых функций, каждая из которых описывает форму одного пика из экспериментального профиля. Оптимизация производится по методу наименьших квадратов. При оптимизации дополнительно используется набор ограничений: ширины Гауссовых функций должны монотонно уменьшаться с увеличением массы (уменьшением величины пробега) фрагментов ДНК. Такая регуляризация повышает точность процедуры подгонки и выполняется функцией, реализованной в HYDROID. В других работах профили расщепления описывали наборами функций Лоренца вместо Гауссовых функций. Такое приближение необходимо для устранения искажений, которые появлялись во время сканирования электрофоретических гелей ([115] комментарии). В случае, когда изображение детектируют при помощи конфокальных сканеров, аппроксимация Лоренцевыми функциями дает большее среднеквадратичное отклонение, нежели аппроксимация Гауссианами. В результате работы HYDROID предоставляет рассчитанные частоты расщепления ДНК для каждого нуклеотида ДНК.

Следует отметить, что профили интенсивности расщепления ДНК обычно различаются по абсолютной величине из-за их зависимости от множества экспериментальных факторов (неточность при введении образца, время экспозиции и т. д.). Чтобы обеспечить адекватное сравнение двух экспериментальных профилей, они должны быть нормированы. Для этого в HYDROID реализован набор способов нормировки профилей. Программа также позволяет рассчитывать теоретические профили гидроксил-радикального расщепления ДНК из молекулярных моделей комплексов, содержащих ДНК. Для решения данной задачи используется программа FreeSASA.

Вклад автора в разработку программы заключается в создании алгоритма построения изображений теоретических профилей расщепления ДНК, тестировании программы, разработке графического интерфейса (Рис. 28).



Рисунок 28. Внешний вид одного из этапов работы программы HYDROID_GUI - программы для анализа профилей гидроксильного футпринтинга ДНК.

Заключение

В рамках данной работы произведено комплексное исследование нуклеосом и их комплексов при помощи разнообразных методов молекулярного моделирования. Проведены рекордные расчеты траекторий молекулярной динамики нуклеосом, исследованы разнообразные моды конформационной подвижности в нуклеосомах, которые ранее были описаны в литературе. В работе предложен новый метод моделирования нуклеосом и их комплексов, основанный на комбинации механистических моделей ДНК и данных spFRET, гидроксильного расщепления ДНК, а также данных, полученных методом электронной микроскопии. Разработанный метод позволил исследовать структуру нуклеосом в комплексе с линкерным гистоном, определить структурные перестройки, вызванные гистоновым шапероном FACT, охарактеризовать степень откручивания ДНК и отступ в компактных динуклеосомах.

Выводы

1. Методами МД показано, что в октамере гистонов присутствует динамическая мода, при которой изменяется расстояние между соседними супервитками ДНК вдоль суперспиральной оси нуклеосомы.
2. Методами МД показано, что откручивание ДНК от гистонового октамера приводит к изменению конформации гистонового октамера, что согласуется с последними экспериментальными данными.
3. Методами МД показано, что линкерные области нуклеосомы не должны сближаться, что позволяет предсказать пространственную структуру нуклеосомы по данным структурного анализа ее фрагмента.
4. Разработанные в диссертации методы и программное обеспечение, объединяющие подходы молекулярного моделирования, анализа данных

spFRET и гидроксильного футпринтинга, позволили реконструировать трехмерные структуры ряда нуклеосом и их комплексов. В частности, данными методами:

- 4.1. Показано, что нуклеосома в комплексе с линкерным гистоном обладает “стеблеобразной” (stem-like) структурой в линкерной области.
- 4.2. Определено положение ДНК в *in vitro* модели центромерной нуклеосомы третьей хромосомы *S. cerevisiae*.
- 4.3. Показано, что при связывании нуклеосомы с гистоновым шапероном FACT откручивается не менее 100 н.п. ДНК.
- 4.4. Показано, что компактные динуклеосомы отличаются большей степенью откручивания ДНК, чем одиночные нуклеосомы.
- 4.5. Показано что энергия деформации ДНК в модели нуклеосомы с линкерным гистоном отличается для разных типов связывания линкерного гистона относительно оси псевдосимметрии нуклеосомы.

Благодарности

Автор выражает благодарность:

научным руководителям в.н.с А.К. Шайтану и профессору К.В. Шайтану за постановку задач, обсуждение результатов и помошь в выполнении работы,

м.н.с. М.Е. Валиевой за предоставленные данные о взаимодействии нуклеосом с FACT,

м.н.с. А.В. Любителеву за предоставленные данные о взаимодействии нуклеосом с гистоном H1,

проф. О.С. Соколовой за предоставленные данные о формировании компактных динуклеосом,

проф. А.В. Феофанову за помошь в освоении методов молекулярной спектроскопии,

всем сотрудникам, студентам и аспирантам кафедры биоинженерии за ценную критику и поддержку.

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова [118]. Работы были поддержаны грантами РНФ 14-24-00031, 18-74-10006.

Список литературы

1. Valieva M.E., Armeev G.A., Kudryashova K.S., Gerasimova N.S., Shaytan A.K., Kulaeva O.I., McCullough L.L., Formosa T., Georgiev P.G., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Large-scale ATP-independent nucleosome unfolding by a histone chaperone // Nat. Struct. Mol. Biol. 2016. Vol. 23, № 12. Р. 1111–1116.
2. Армeeв Г.А., Шайтан К.В., Шайтан А.К. Релаксация структуры нуклеосомы при отворачивании ДНК: исследование методом молекулярной динамики // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. 2016. № 3. Р. 34–37.
3. Армeeв Г.А., Горковец Т.К., Ефимова Д.А., Шайтан К.В., Шайтан А.К. Моделирование структуры ДНК-белковых комплексов с использованием экспериментальных данных по резонансному переносу энергии и перекисному окислению // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. 2016. № 1. Р. 35–40.
4. Shaytan A.K., Armeev G.A., Gonçalves A., Zhurkin V.B., Landsman D., Panchenko A.R. Coupling between Histone Conformations and DNA Geometry in Nucleosomes on a Microsecond Timescale: Atomistic Insights into Nucleosome Functions // J. Mol. Biol. 2016.
5. Shaytan A.K., Xiao H., Armeev G.A., Wu C., Landsman D., Panchenko A.R. Hydroxyl-radical footprinting combined with molecular modeling identifies unique features of DNA conformation and nucleosome positioning // Nucleic Acids Res. 2017. Vol. 45, № 16. Р. 9229–9243.
6. Shaytan A.K., Xiao H., Armeev G.A., Gaykalova D.A., Komarova G.A., Wu C., Studitsky V.M., Landsman D., Panchenko A.R. Structural interpretation of DNA-protein hydroxyl-radical footprinting experiments with high resolution using HYDROID // Nat. Protoc. 2018. *in press*

7. Армееев Г.А., Шайтан К.В., Шайтан А.К. Исследование ионного окружения и электрических характеристик нуклеосом методом молекулярной динамики // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2015. № 4. Р. 24–28.
8. Армееев Г.А., Шайтан К.В., Шайтан А.К. Конформационная подвижность нуклеосомы: исследование методом молекулярной динамики // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. 2015. № 3. Р. 49–54.
9. Горковец Т.К., Армееев Г.А., Шайтан К.В., Шайтан А.К. Совместное влияние аминокислотной последовательности гистона H1 и нуклеотидной последовательности ДНК на структуру хроматосомы: анализ методами молекулярного моделирования // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. 2018. Vol. 73, № 2. P. 99–105.
10. Shaytan A.K., Armeev G.A., Gonçalves A., Zhurkin V.B., Landsman D., Panchenko A.R. Trajectories of microsecond molecular dynamics simulations of nucleosomes and nucleosome core particles // Data Brief. 2016. Vol. 7. P. 1678–1681.
11. Kornberg R.D. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA // Science. 1974. Vol. 184, № 4139. P. 868–871.
12. Richmond T.J., Finch J.T., Rushton B., Rhodes D., Klug A. Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution // Nature. 1984. Vol. 311, № 5986. P. 532–537.
13. Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution // Nature. 1997. Vol. 389, № 6648. P. 251–260.
14. Studitsky V.M., Clark D.J., Felsenfeld G. Overcoming a nucleosomal barrier to transcription // Cell. 1995. Vol. 83, № 1. P. 19–27.
15. Davey C.A., Sargent D.F., Luger K., Maeder A.W., Richmond T.J. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å

- resolution // J. Mol. Biol. Elsevier, 2002. Vol. 319, № 5. P. 1097–1113.
16. Shaytan A.K., Landsman D., Panchenko A.R. Nucleosome adaptability conferred by sequence and structural variations in histone H2A-H2B dimers // Curr. Opin. Struct. Biol. 2015. Vol. 32. P. 48–57.
 17. 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. ACS Publications, 2008. Vol. 113, № 9. P. 2604–2613.
 18. Pennings S., Meersseman G., Bradbury E.M. Mobility of positioned nucleosomes on 5 S rDNA // J. Mol. Biol. 1991. Vol. 220, № 1. P. 101–110.
 19. Eslami-Mossallam B., Schiessel H., van Noort J. Nucleosome dynamics: Sequence matters // Adv. Colloid Interface Sci. 2016. Vol. 232. P. 101–113.
 20. Stumme-Diers M.P., Banerjee S., Hashemi M., Sun Z., Lyubchenko Y.L. Nanoscale dynamics of centromere nucleosomes and the critical roles of CENP-A // Nucleic Acids Res. 2018. Vol. 46, № 1. P. 94–103.
 21. Mozziconacci J., Victor J.-M. Nucleosome gaping supports a functional structure for the 30nm chromatin fiber // J. Struct. Biol. 2003. Vol. 143, № 1. P. 72–76.
 22. Ngo T.T.M., Ha T. Nucleosomes undergo slow spontaneous gaping // Nucleic Acids Res. 2015. Vol. 43, № 8. P. 3964–3971.
 23. Mihardja S., Spakowitz A.J., Zhang Y., Bustamante C. Effect of force on mononucleosomal dynamics // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2006. Vol. 103, № 43. P. 15871–15876.
 24. Bilokapic S., Strauss M., Halic M. Histone octamer rearranges to adapt to DNA unwrapping // Nat. Struct. Mol. Biol. 2018. Vol. 25, № 1. P. 101–108.
 25. Böhm V., Hieb A.R., Andrews A.J., Gansen A., Rocker A., Tóth K., Luger K., Langowski J. Nucleosome accessibility governed by the dimer/tetramer interface // Nucleic Acids Res. 2011. Vol. 39, № 8. P. 3093–3102.
 26. Ordu O., Kremser L., Lusser A., Dekker N.H. Modification of the histone

- tetramer at the H3-H3 interface impacts tetrasome conformations and dynamics // J. Chem. Phys. 2018. Vol. 148, № 12. P. 123323.
27. Henikoff S., Thakur J., Kasinathan S., Talbert P.B. Remarkable Evolutionary Plasticity of Centromeric Chromatin // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 2017. Vol. 82. P. 71–82.
28. Sinha K.K., Gross J.D., Narlikar G.J. Distortion of histone octamer core promotes nucleosome mobilization by a chromatin remodeler // Science. 2017. Vol. 355, № 6322.
29. Bilokapic S., Strauss M., Halic M. Structural rearrangements of the histone octamer translocate DNA // Nat. Commun. 2018. Vol. 9, № 1. P. 1330.
30. Xiao H., Wang F., Wisniewski J., Shaytan A.K., Ghirlando R., FitzGerald P.C., Huang Y., Wei D., Li S., Landsman D., Panchenko A.R., Wu C. Molecular basis of CENP-C association with the CENP-A nucleosome at yeast centromeres // Genes Dev. 2017. Vol. 31, № 19. P. 1958–1972.
31. Jing Y., Liu Z., Tian G., Bao X., Ishibashi T., Li X.D. Site-Specific Installation of Succinyl Lysine Analog into Histones Reveals the Effect of H2BK34 Succinylation on Nucleosome Dynamics // Cell Chem Biol. 2018. Vol. 25, № 2. P. 166–174.e7.
32. Fenley A.T., Anandakrishnan R., Kidane Y.H., Onufriev A.V. Modulation of nucleosomal DNA accessibility via charge-altering post-translational modifications in histone core // Epigenetics Chromatin. 2018. Vol. 11, № 1. P. 11.
33. Takizawa Y., Tanaka H., Machida S., Koyama M., Maehara K., Ohkawa Y., Wade P.A., Wolf M., Kurumizaka H. Cryo-EM structure of the nucleosome containing the ALB1 enhancer DNA sequence // Open Biol. 2018. Vol. 8, № 3.
34. Mauney A.W., Tokuda J.M., Gloss L.M., Gonzalez O., Pollack L. Local DNA Sequence Controls Asymmetry of DNA Unwrapping from Nucleosome Core Particles // Biophys. J. 2018.
35. Ngo T.T.M., Zhang Q., Zhou R., Yodh J.G., Ha T. Asymmetric unwrapping of

- nucleosomes under tension directed by DNA local flexibility // Cell. 2015. Vol. 160, № 6. P. 1135–1144.
36. Sultanov D.C., Gerasimova N.S., Kudryashova K.S., Maluchenko N.V., Kotova E.Y., Langelier M.-F., Pascal J.M., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V., Studitsky V.M. Unfolding of core nucleosomes by PARP-1 revealed by spFRET microscopy // AIMS Genet. 2017. Vol. 4, № 1. P. 21–31.
37. Van Duyne, Sergei A. Vinogradov, Michael A. Lampson, Ben E. Black, Samantha J. Falk, Lucie Y. Guo, Nikolina Sekulic, Evan M. Smoak, Tomoyasu Mani, Glennis A. Logsdon, Kushol Gupta, Lars E. T. Jansen, Gregory D. CENP-C reshapes and stabilizes CENP-A nucleosomes at the centromere // Science. 2015. Vol. 348, № 6235. P. 699–703.
38. Biswas M., Langowski J., Bishop T.C. Atomistic simulations of nucleosomes // WIRES Comput Mol Sci. John Wiley & Sons, Inc., 2013. Vol. 3, № 4. P. 378–392.
39. Arya G., Schlick T. Role of histone tails in chromatin folding revealed by a mesoscopic oligonucleosome model // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences, 2006. Vol. 103, № 44. P. 16236–16241.
40. Schlick T. Chromatin fiber polymorphism triggered by variations of DNA linker lengths // Proceedings of the. National Acad Sciences, 2014.
41. Erler J., Zhang R., Petridis L., Cheng X., Smith J.C., Langowski J. The role of histone tails in the nucleosome: a computational study // Biophys. J. 2014. Vol. 107, № 12. P. 2911–2922.
42. Materese C.K., Saveliev A., Papoian G.A. Counterion atmosphere and hydration patterns near a nucleosome core particle // J. Am. Chem. Soc. 2009. Vol. 131, № 41. P. 15005–15013.
43. Ruscio J.Z., Onufriev A. A computational study of nucleosomal DNA flexibility // Biophys. J. 2006. Vol. 91, № 11. P. 4121–4132.
44. Lasker K., Phillips J.L., Russel D., Velázquez-Muriel J., Schneidman-Duhovny

- D., Tjioe E., Webb B., Schlessinger A., Sali A. Integrative structure modeling of macromolecular assemblies from proteomics data // Mol. Cell. Proteomics. 2010. Vol. 9, № 8. P. 1689–1702.
45. Russel D., Lasker K., Webb B., Velázquez-Muriel J., Tjioe E., Schneidman-Duhovny D., Peterson B., Sali A. Putting the pieces together: integrative modeling platform software for structure determination of macromolecular assemblies // PLoS Biol. 2012. Vol. 10, № 1. P. e1001244.
46. Dahan M., Deniz A.A., Ha T., Chemla D.S., Schultz P.G., Weiss S. Ratiometric measurement and identification of single diffusing molecules // Chem. Phys. 1999. Vol. 247, № 1. P. 85–106.
47. Klose D., Klare J.P., Grohmann D., Kay C.W.M., Werner F., Steinhoff H.-J. Simulation vs. reality: a comparison of in silico distance predictions with DEER and FRET measurements // PLoS One. 2012. Vol. 7, № 6. P. e39492.
48. Okumus B., Wilson T.J., Lilley D.M.J., Ha T. Vesicle encapsulation studies reveal that single molecule ribozyme heterogeneities are intrinsic // Biophys. J. 2004. Vol. 87, № 4. P. 2798–2806.
49. Li G., Levitus M., Bustamante C., Widom J. Rapid spontaneous accessibility of nucleosomal DNA // Nat. Struct. Mol. Biol. 2005. Vol. 12, № 1. P. 46–53.
50. Roy R., Hohng S., Ha T. A practical guide to single-molecule FRET // Nat. Methods. 2008. Vol. 5, № 6. P. 507–516.
51. Zanetti-Domingues L.C., Tynan C.J., Rolfe D.J., Clarke D.T., Martin-Fernandez M. Hydrophobic fluorescent probes introduce artifacts into single molecule tracking experiments due to non-specific binding // PLoS One. 2013. Vol. 8, № 9. P. e74200.
52. Sisamakis E., Valeri A., Kalinin S., Rothwell P.J., Seidel C.A.M. Accurate single-molecule FRET studies using multiparameter fluorescence detection // Methods Enzymol. 2010. Vol. 475. P. 455–514.
53. Ingargiola A., Lerner E., Chung S., Weiss S., Michalet X. FRETBursts: An Open

Source Toolkit for Analysis of Freely-Diffusing Single-Molecule FRET // PLoS One. 2016. Vol. 11, № 8. P. e0160716.

54. 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, № 9. P. 2604–2613.
55. Ha T., Ting A.Y., Liang J., Caldwell W.B., Deniz A.A., Chemla D.S., Schultz P.G., Weiss S. Single-molecule fluorescence spectroscopy of enzyme conformational dynamics and cleavage mechanism // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1999. Vol. 96, № 3. P. 893–898.
56. McCann J.J., Choi U.B., Zheng L., Weninger K., Bowen M.E. Optimizing methods to recover absolute FRET efficiency from immobilized single molecules // Biophys. J. 2010. Vol. 99, № 3. P. 961–970.
57. Lee N.K., Kapanidis A.N., Wang Y., Michalet X., Mukhopadhyay J., Ebright R.H., Weiss S. Accurate FRET measurements within single diffusing biomolecules using alternating-laser excitation // Biophys. J. 2005. Vol. 88, № 4. P. 2939–2953.
58. Ferreon A.C.M., Gambin Y., Lemke E.A., Deniz A.A. Interplay of alpha-synuclein binding and conformational switching probed by single-molecule fluorescence // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2009. Vol. 106, № 14. P. 5645–5650.
59. Rhys Williams A.T., Winfield S.A., Miller J.N. Relative fluorescence quantum yields using a computer-controlled luminescence spectrometer // Analyst. The Royal Society of Chemistry, 1983. Vol. 108, № 1290. P. 1067–1071.
60. Nir E., Michalet X., Hamadani K.M., Laurence T.A., Neuhauser D., Kovchegov Y., Weiss S. Shot-noise limited single-molecule FRET histograms: comparison between theory and experiments // J. Phys. Chem. B. 2006. Vol. 110, № 44. P. 22103–22124.

61. Watkins L.P., Chang H., Yang H. Quantitative single-molecule conformational distributions: a case study with poly-(L-proline) // J. Phys. Chem. A. 2006. Vol. 110, № 15. P. 5191–5203.
62. Torella J.P., Holden S.J., Santoso Y., Hohlbein J., Kapanidis A.N. Identifying molecular dynamics in single-molecule FRET experiments with burst variance analysis // Biophys. J. 2011. Vol. 100, № 6. P. 1568–1577.
63. Hayes J.J., Tullius T.D., Wolffe A.P. The structure of DNA in a nucleosome // Proceedings of the National Academy of Sciences. National Acad Sciences, 1990. Vol. 87, № 19. P. 7405–7409.
64. Jain S.S., Tullius T.D. Footprinting protein-DNA complexes using the hydroxyl radical // Nat. Protoc. 2008. Vol. 3, № 6. P. 1092–1100.
65. Hayes J.J., Bashkin J., Tullius T.D., Wolffe A.P. The histone core exerts a dominant constraint on the structure of DNA in a nucleosome // Biochemistry. 1991. Vol. 30, № 34. P. 8434–8440.
66. Hayes J.J., Clark D.J., Wolffe A.P. Histone contributions to the structure of DNA in the nucleosome // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1991. Vol. 88, № 15. P. 6829–6833.
67. Churchill M.E., Hayes J.J., Tullius T.D. Detection of drug binding to DNA by hydroxyl radical footprinting. Relationship of distamycin binding sites to DNA structure and positioned nucleosomes on 5S RNA genes of *Xenopus* // Biochemistry. 1990. Vol. 29, № 25. P. 6043–6050.
68. Widlund H.R., Kuduvali P.N., Bengtsson M., Cao H., Tullius T.D., Kubista M. Nucleosome structural features and intrinsic properties of the TATAAACGCC repeat sequence // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274, № 45. P. 31847–31852.
69. Bjorklund C.C., Davis W.B. Attenuation of DNA charge transport by compaction into a nucleosome core particle // Nucleic Acids Res. 2006. Vol. 34, № 6. P. 1836–1846.
70. Morozov A.V., Fortney K., Gaykalova D.A., Studitsky V.M., Widom J., Siggia

- E.D. Using DNA mechanics to predict in vitro nucleosome positions and formation energies // Nucleic Acids Res. 2009. Vol. 37, № 14. P. 4707–4722.
71. Schwanbeck R., Xiao H., Wu C. Spatial contacts and nucleosome step movements induced by the NURF chromatin remodeling complex // J. Biol. Chem. 2004. Vol. 279, № 38. P. 39933–39941.
72. 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 // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010. Vol. 107, № 21. P. 9620–9625.
73. Balasubramanian B., Pogozelski W.K., Tullius T.D. DNA strand breaking by the hydroxyl radical is governed by the accessible surface areas of the hydrogen atoms of the DNA backbone // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1998. Vol. 95, № 17. P. 9738–9743.
74. Halgren T.A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94 // J. Comput. Chem. Wiley Online Library, 1996. Vol. 17, № 5-6. P. 490–519.
75. Allen M.P., Tildesley D.J., Banavar J.R. Computer Simulation of Liquids // Phys. Today. American Institute of Physics, 1989. Vol. 42, № 3. P. 105–106.
76. Frenkel D., Smit B. Understanding Molecular Simulation: From Algorithms to Applications / Elsevier, 2001. 664 p.
77. Guy A.T., Piggot T.J., Khalid S. Single-stranded DNA within nanopores: conformational dynamics and implications for sequencing; a molecular dynamics simulation study // Biophys. J. 2012. Vol. 103, № 5. P. 1028–1036.
78. Lindorff-Larsen K., Piana S., Palmo K., Maragakis P., Klepeis J.L., Dror R.O., Shaw D.E. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field // Proteins: Struct. Funct. Bioinf. Wiley Online Library, 2010. Vol. 78, № 8. P. 1950–1958.

79. Huang J., MacKerell A.D. Jr. CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data // *J. Comput. Chem.* 2013. Vol. 34, № 25. P. 2135–2145.
80. Banks D.D., Gloss L.M. Equilibrium folding of the core histones: the H3-H4 tetramer is less stable than the H2A-H2B dimer // *Biochemistry*. 2003. Vol. 42, № 22. P. 6827–6839.
81. Essmann U., Perera L., Berkowitz M.L., Darden T., Lee H., Pedersen L.G. A smooth particle mesh Ewald method // *J. Chem. Phys.* American Institute of Physics, 1995. Vol. 103, № 19. P. 8577–8593.
82. Bussi G., Donadio D., Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling // *J. Chem. Phys.* 2007. Vol. 126, № 1. P. 014101.
83. Nosé S., Klein M.L. A study of solid and liquid carbon tetrafluoride using the constant pressure molecular dynamics technique // *J. Chem. Phys.* American Institute of Physics, 1983. Vol. 78, № 11. P. 6928–6939.
84. Pronk S., Páll S., Schulz R., Larsson P., Bjelkmar P., Apostolov R., Shirts M.R., Smith J.C., Kasson P.M., van der Spoel D., Hess B., Lindahl E. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit // *Bioinformatics*. 2013. Vol. 29, № 7. P. 845–854.
85. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: visual molecular dynamics // *J. Mol. Graph.* 1996. Vol. 14, № 1. P. 33–38.
86. el Hassan M.A., Calladine C.R. The assessment of the geometry of dinucleotide steps in double-helical DNA; a new local calculation scheme // *J. Mol. Biol.* 1995. Vol. 251, № 5. P. 648–664.
87. Lu X., Olson W.K. 3DNA: a software package for the analysis, rebuilding and visualization of three - dimensional nucleic acid structures // *Nucleic Acids Res.* 2003. Vol. 31, № 17. P. 5108–5121.
88. Olson W.K., Gorin A.A., Lu X.-J., Hock L.M., Zhurkin V.B. DNA sequence-dependent deformability deduced from protein–DNA crystal complexes

- // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences, 1998. Vol. 95, № 19. P. 11163–11168.
89. Jones E., Oliphant T., Peterson P., Others. SciPy: Open source scientific tools for Python, 2001-- // URL <http://www.scipy.org>. 2007. Vol. 73. P. 86.
90. Zoete V., Cuendet M.A., Grosdidier A., Michelin O. SwissParam: a fast force field generation tool for small organic molecules // J. Comput. Chem. 2011. Vol. 32, № 11. P. 2359–2368.
91. Abràmoff M.D., Magalhães P.J., Ram S.J. Image processing with ImageJ // Biophotonics international. Laurin Publishing, 2004. Vol. 11, № 7. P. 36–42.
92. Shaytan A.K., Xiao H., Armeev G.A., Carl W., Landsman D., Panchenko. A.R. Structural interpretation of DNA-protein hydroxyl-radical footprinting experiments with high resolution using HYDROID // Nat. Protoc. United Kingdom, 2018. P. in press.
93. Kudryashova K.S., Chertkov O.V., Nikitin D.V., Pestov N.A., Kulæva 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.
94. Savelyev A., Papoian G.A. Electrostatic, steric, and hydration interactions favor Na(+) condensation around DNA compared with K(+) // J. Am. Chem. Soc. 2006. Vol. 128, № 45. P. 14506–14518.
95. Bondarenko V.A., Steele L.M., Ujvári A., Gaykalova D.A., Kulæva O.I., Polikanov Y.S., Luse D.S., Studitsky V.M. Nucleosomes can form a polar barrier to transcript elongation by RNA polymerase II // Mol. Cell. 2006. Vol. 24, № 3. P. 469–479.
96. Pachov G.V., Gabdoulline R.R., Wade R.C. On the structure and dynamics of the complex of the nucleosome and the linker histone // Nucleic Acids Res. 2011. Vol. 39, № 12. P. 5255–5263.

97. Nurse N.P., Jimenez-Useche I., Smith I.T., Yuan C. Clipping of flexible tails of histones H3 and H4 affects the structure and dynamics of the nucleosome // *Biophys. J.* 2013. Vol. 104, № 5. P. 1081–1088.
98. Tóth K., Brun N., Langowski J. Chromatin compaction at the mononucleosome level // *Biochemistry*. 2006. Vol. 45, № 6. P. 1591–1598.
99. Bednar J., Garcia-Saez I., Boopathi R., Cutter A.R., Papai G., Reymer A., Syed S.H., Lone I.N., Tonchev O., Crucifix C., Menoni H., Papin C., Skoufias D.A., Kurumizaka H., Lavery R., Hamiche A., Hayes J.J., Schultz P., Angelov D., Petosa C., Dimitrov S. Structure and Dynamics of a 197 bp Nucleosome in Complex with Linker Histone H1 // *Mol. Cell.* 2017. Vol. 66, № 3. P. 384–397.e8.
100. 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. U. S. A.* 2013. Vol. 110, № 48. P. 19390–19395.
101. 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, № 4. P. 628–638.
102. Zhou B.-R., Feng H., Ghirlando R., Li S., Schwieters C.D., Bai Y. A Small Number of Residues Can Determine if Linker Histones Are Bound On or Off Dyad in the Chromatosome // *J. Mol. Biol.* 2016. Vol. 428, № 20. P. 3948–3959.
103. Öztürk M.A., Cojocaru V., Wade R.C. Toward an Ensemble View of Chromatosome Structure: A Paradigm Shift from One to Many // *Structure*. 2018. Vol. 26, № 8. P. 1050–1057.
104. 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, № 9. P. 2818–2829.
105. 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. U. S. A.*

- A. 2013. Vol. 110, № 48. P. 19390–19395.
106. 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, № 6182. P. 376–380.
107. Ober M., Lippard S.J. A 1,2-d(GpG) cisplatin intrastrand cross-link influences the rotational and translational setting of DNA in nucleosomes // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. Vol. 130, № 9. P. 2851–2861.
108. Cannistraro V.J., Pondugula S., Song Q., Taylor J.-S. Rapid deamination of cyclobutane pyrimidine dimer photoproducts at TCG sites in a translationally and rotationally positioned nucleosome in vivo // *J. Biol. Chem.* 2015. Vol. 290, № 44. P. 26597–26609.
109. Flaus A., Luger K., Tan S., Richmond T.J. Mapping nucleosome position at single base-pair resolution by using site-directed hydroxyl radicals // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996. Vol. 93, № 4. P. 1370–1375.
110. Kassabov S.R., Henry N.M., Zofall M., Tsukiyama T., Bartholomew B. High-resolution mapping of changes in histone-DNA contacts of nucleosomes remodeled by ISW2 // *Mol. Cell. Biol.* 2002. Vol. 22, № 21. P. 7524–7534.
111. Cole H.A., Howard B.H., Clark D.J. The centromeric nucleosome of budding yeast is perfectly positioned and covers the entire centromere // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011. Vol. 108, № 31. P. 12687–12692.
112. Engeholm M., de Jager M., Flaus A., Brenk R., van Noort J., Owen-Hughes T. Nucleosomes can invade DNA territories occupied by their neighbors // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009. Vol. 16, № 2. P. 151–158.
113. Walt S. van der, Colbert S.C., Varoquaux G. The NumPy Array: A Structure for Efficient Numerical Computation // *Comput. Sci. Eng.* IEEE Computer Society, 2011. Vol. 13, № 2. P. 22–30.
114. Hunter J.D. Matplotlib: A 2D Graphics Environment // *Comput. Sci. Eng.* AIP Publishing, 2007. Vol. 9, № 3. P. 90–95.

115. Shadle S.E., Allen D.F., Guo H., Pogozelski W.K., Bashkin J.S., Tullius T.D. Quantitative analysis of electrophoresis data: novel curve fitting methodology and its application to the determination of a protein-DNA binding constant // Nucleic Acids Res. 1997. Vol. 25, № 4. P. 850–860.
116. Takamoto K., Chance M.R., Brenowitz M. Semi-automated, single-band peak-fitting analysis of hydroxyl radical nucleic acid footprint autoradiograms for the quantitative analysis of transitions // Nucleic Acids Res. 2004. Vol. 32, № 15. P. E119.
117. Das R., Laederach A., Pearlman S.M., Herschlag D., Altman R.B. SAFA: semi-automated footprinting analysis software for high-throughput quantification of nucleic acid footprinting experiments // RNA. 2005. Vol. 11, № 3. P. 344–354.
118. Воеводин В., Жуматий С., Соболев С. Практика суперкомпьютера «Ломоносов» // Открытые системы. 2012.