

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА**

Биологический факультет
Магистерская программа «Структурная биология и биотехнология»

МОТОРИН Никита Андреевич

**ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОБОПОДГОТОВКИ НУКЛЕОСОМ И
ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ ДИНАМИКИ МЕТОДАМИ
ИНТЕГРАТИВНОЙ СТРУКТУРНОЙ БИОЛОГИИ**

Выпускная квалификационная работа магистра

Научные руководители:
профессор, д. ф.-м. н., чл.-корр. РАН
Шайтан Алексей Константинович
ведущий научный сотрудник, к. ф.-м. н.
Армеев Григорий Алексеевич

Москва
2024

Оглавление

Оглавление	2
Список использованных сокращений	4
Введение.....	5
1.Обзор литературы	8
1.1.ЯМР-спектроскопия как инструмент изучения структуры и динамики гистоновых хвостов в нуклеосоме	8
1.2.Варианты метода ЯМР-спектроскопии применительно к нуклеосомам.	10
1.3.Изучение конформационной динамики гистоновых хвостов и её изменений, вызванных ПТМ	11
1.4.Моделирование методом МД конформационной динамики гистоновых хвостов	14
1.5.Малоугловое рассеяние рентгеновских лучей как способ изучения динамики ДНК в нуклеосоме	16
2.Материалы и методы	18
2.1.Используемые в работе плазмиды и штаммы	18
2.2.Получение ДНК для сборки нуклеосом	20
2.3.Наработка рекомбинантных гистонов.....	20
2.4. Очистка рекомбинантных гистонов.	21
2.5. Сборка и очистка октамеров гистонов	22
2.6. Сборка нуклеосом методом ступенчатого диализа и контроль качества сборки.....	22
2.7. Протоколы расчетом методом молекулярной динамики с использованием различных моделей воды.....	23

2.8. Проведение экспериментов ЯМР для изучения свободного гистона H3.1 и гистона H3.1 в составе нуклеосомы	24
2.8.1. Измерение параметров релаксации ядер свободного гистона H3.1	24
2.8.2. Измерение параметров релаксации гистона H3.1 в составе нуклеосомы.....	25
3.Результаты и их обсуждение	26
3.1. Контроль качества гистоновых октамеров и нуклеосомной ДНК	26
3.2. Контроль качества собранных нуклеосом	27
3.3. Применения полученного препарата в экспериментах по МУРР	29
3.4. Изучение динамики хвоста гистона H3 методами молекулярной динамики с использованием различных моделей воды	30
3.5. Обратимое откручивание ДНК при моделировании с использованием модели воды TIP4P-D	34
3.6. Изучение структуры и динамики свободного гистона H3.1 методами ЯМР-спектроскопии.....	35
3.7. Изучение конформационной динамики хвоста гистона H3.1 в нуклеосоме методами ЯМР-спектроскопии/молекулярной динамики влияния концентрации соли на неё.....	38
Заключение.....	43
Выводы	44
Благодарности	45
Список литературы.....	46

Список использованных сокращений

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ДСН - додецилсульфат натрия

ДСН-ПААГ – полиакриламидный гель с ДСН для денатурирующего электрофореза

ДТТ – дитиотреитол

ИПТГ - Изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид

Крио-ЭМ – криоэлектронная микроскопия

МД – молекулярная динамика (или, от контекста, молекулярно-динамический)

МУРР – малоугловое рентгеновское рассеяние

ПААГ – полиакриламидный гель

п.н. – пары нуклеотидов (для ДНК)

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ЭДТА– этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭМ – электронная микроскопия

ЯМР – ядерно-магнитный резонанс

CSP - chemical shift perturbation (изменение химического сдвига)

HEPES - 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота

LB - среда Luria-Bertani

OD – оптическая плотность

ТАЕ – трис-ацетатный буфер, содержащий ЭДТА

Tris - трис(гидроксиметил)аминометана

TSEP - трис(2-карбоксиэтил)фосфин

β -МЕ – β -меркаптоэтанол

Введение

Нуклеосома – элементарная структурная единица хроматина, содержит два димера гистонов H2A-H2B и один тетрамер гистонов (H3-H4)₂, обернутый вокруг ~ 145 п.н. ДНК (Luger et al., 1997; Davey et al., 2002) . Каждый из четырех гистонов имеет неупорядоченный N-конец, ориентированный на поверхность нуклеосомы, который называется гистоновым хвостом (Рис.1).

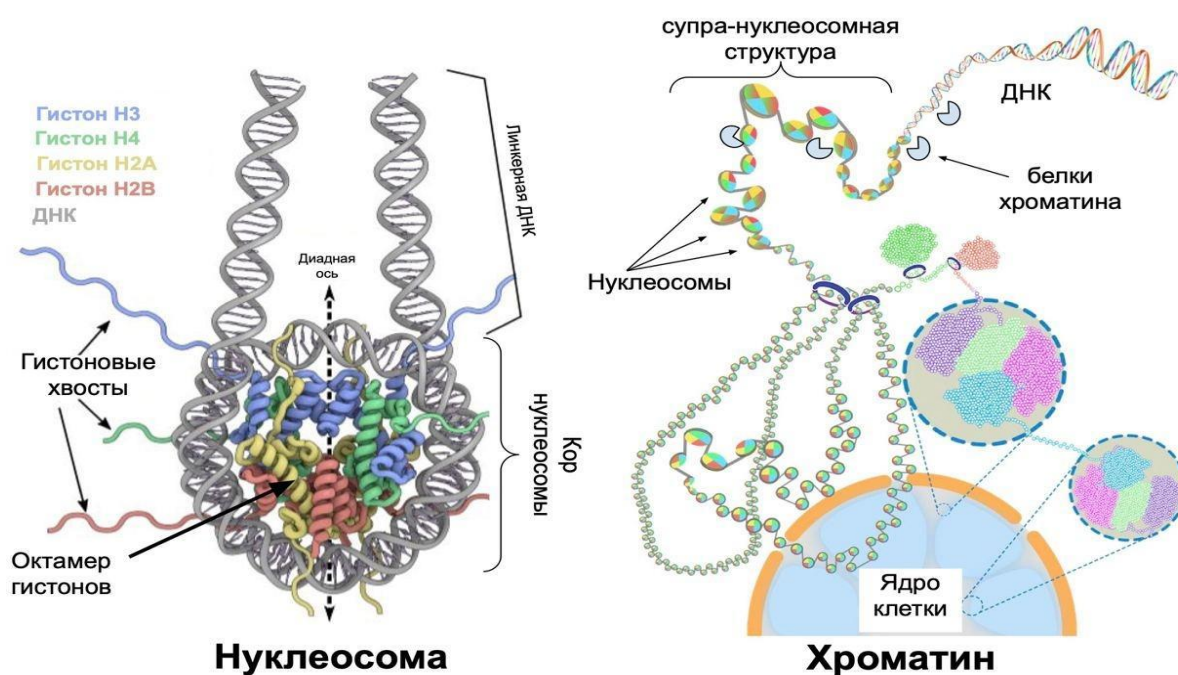


Рисунок 1. Структура нуклеосомы (Шайтан., 2021).

Изучение конформационной динамики гистоновых хвостов является важной задачей современной эпигенетики, поскольку именно гистоновые хвосты служат ключевыми мишенями для внесения эпигенетических посттрансляционных модификаций (ПТМ), что является основным механизмом регуляции активности генома. Также важной характеристикой положительно заряженных гистоновых хвостов, экспонированных на периферию нуклеосомной частицы, является возможность их

взаимодействия с ДНК. Для наиболее протяженного и расположенного в области нуклеосомной диады хвоста гистона Н3 показано участие в откручивании ДНК от гистонового октамера (Armeev et al., 2021).

При этом, неупорядоченная природа гистоновых хвостов является препятствием для использования таких методов структурной биологии как рентгеноструктурный анализ и криоэлектронная микроскопия в целях их исследования. По этой причине, перспективным подходом для изучения конформационной динамики гистоновых хвостов является использование данных ЯМР-спектроскопии в комплексе с данными моделирования методом молекулярной динамики.

Данная выпускная квалификационная работа посвящена изучению конформационной динамики хвоста гистона Н3 и его влияния на откручивание ДНК.

Цели и задачи

Цель проекта – изучение динамики хвоста гистона Н3 в нуклеосомах и его влияния на откручивание ДНК.

Были поставлены следующие задачи:

- 1) Получение рекомбинантных нуклеосом с ДНК Widom 601 и 603 для экспериментов методами структурной биологии (ЭМ, МУРР, ЯМР).
- 2) Анализ конформационной подвижности нуклеосом методами молекулярной динамики с использованием различных силовых полей для молекул воды.
- 3) Изучение динамики N-концевого хвоста гистона Н3 методами ядерного магнитного резонанса (ЯМР) в свободном виде и в составе нуклеосомы, сопоставление результатов эксперимента с моделированием.
- 4) Изучение влияния ионной силы раствора на динамику хвоста гистона Н3.

1. Обзор литературы

1.1. ЯМР-спектроскопия как инструмент изучения структуры и динамики гистоновых хвостов в нуклеосоме

Для изучения структуры и динамики нуклеосом используют широкий спектр методов современной структурной биологии. Однако для изучения конформационной динамики гистоновых хвостов, которые являются неупорядоченными белками, одним из немногих подходящих методов является ЯМР-спектроскопия.

Метод ЯМР-спектроскопии основан на эффекте Зеемана, который заключается в расщеплении энергетических уровней ядер с ненулевым спином во внешнем магнитном поле. При этом для ЯМР-спектроскопии наилучшим образом подходят ядра атомов со значением спина $S = 1/2$, к числу которых относятся ^1H , а также изотопные варианты ^{15}N ($S = 1/2$) и ^{13}C ($S = 1/2$).

По этой причине, для изучения гистоновых хвостов методами ЯМР-спектроскопии, обычно один из гистонов в нуклеосоме заменяют на его ^{15}N -меченый вариант (или на $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -меченый), что позволяет получить ЯМР-сигналы только для исследуемого гистона. ЯМР-спектроскопия позволяет изучать конформационную внутримолекулярную динамику гистоновых хвостов в составе нуклеосомы (Рис.2А).

Так, например, методом ЯМР-спектроскопии можно получить двумерный гетероядерный спектр HSQC, который определяет корреляцию ядра атома амидного протона ^1H и ядра атома азота ^{15}N , соединенных одинарной связью, и определить какой из наблюдаемых сигналов относится к какому аминокислотному остатку - провести отнесение сигналов (Рис.2Б).

При этом, положение и интенсивность сигнала для конкретного аминокислотного остатка в HSQC спектре зависит от его химического окружения. Таким образом, сравнивая различные образцы, можно

определить, на какие аминокислотные остатки в наибольшей степени оказывают влияние те или иные изменения: например, внесение ПТМ или взаимодействие хвоста гистона с неким белком. Так аминокислотные остатки, сигналы которых в HSQC-спектре сильнее всего изменили значения химических сдвигов — по-видимому в наибольшей степени меняют конформацию или характер конформационной динамики (Рис.2В). Для более точной оценки локализаций таких изменений часто анализируют профиль изменений значения химических сдвигов для ЯМР сигналов вдоль сиквенса белка.

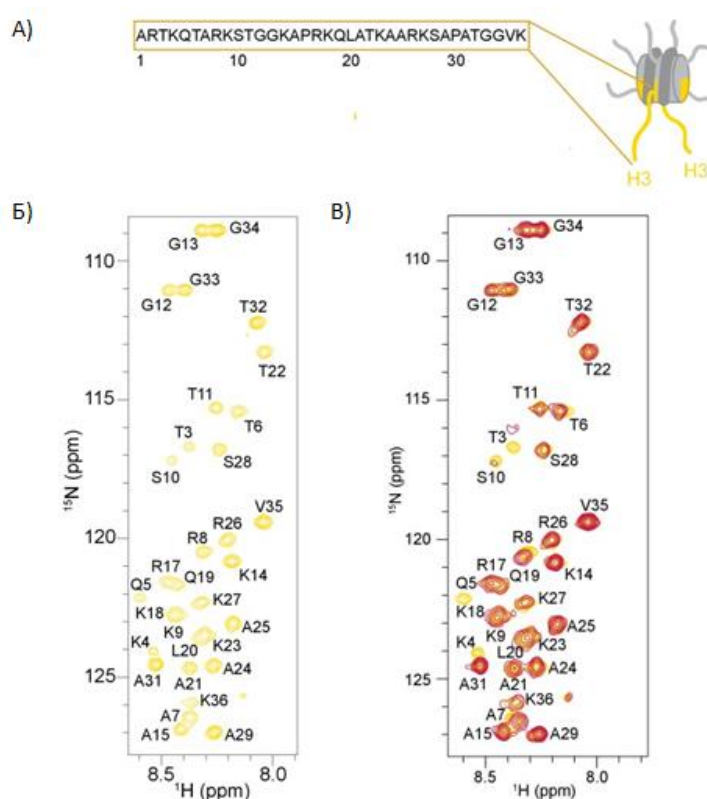


Рисунок 2. Влияние ПТМ H3K4me3 на химическое окружение и конформационную динамику хвоста гистона H3 в нуклеосоме (Morrison et al., 2018).

А) Аминокислотные остатки хвоста ^{15}N -меченого гистона H3 (жёлтым) в составе нуклеосомы. Б) Сигналы ^{15}N -меченого гистона H3 в HSQC-спектре.

В) Локальное изменение химического окружения и конформационной динамики хвоста гистона H3 в составе нуклеосомы, вызванное внесением ПТМ, наблюдаемое из изменений спектра HSQC (жёлтый – не модифицированный H3, малиновый – H3K4me3).

Более того, методом ЯМР-спектроскопии возможно измерить параметры, отражающие конформационную подвижность аминокислотных остатков. К ним относятся скорости продольной (R1) и поперечной (R2) релаксации и $^{15}\text{N}\{-^1\text{H}\}$ -NOE (hnNOE), которые можно измерить для каждого из аминокислотных остатков (для амидной группы). На основе этих данных получают информацию о «быстрых» движениях остатков в пиконаносекундном диапазоне, а также «медленных» за времена микро-миллисекунд. Также часто используют параметр R2/R1 (T1/T2) для оценки вращательной корреляции и подвижности в наносекундных диапазонах. Так например, увеличение параметра R2/R1 и R2 может свидетельствовать о снижении конформационной подвижности.

Таким образом, можно оценивать конформационную подвижность гистоновых хвостов в различных условиях, и, более того, идентифицировать области в гистоновых хвостах с наиболее изменившейся конформационной динамикой.

1.2. Варианты метода ЯМР-спектроскопии применительно к нуклеосомам

Отметим, что существуют различные варианты метода ЯМР-спектроскопии. ЯМР-спектроскопия в растворе позволяет изучать конформационную динамику гистоновых хвостов в нуклеосоме в растворе. При использовании данного подхода, в отличие от ЯМР-спектроскопии твердого тела, сигналы в ЯМР-спектрах будут наблюдаться только для хвоста ^{15}N -меченого гистона, тогда как коровая часть, на которую наматывается ДНК, в спектре видна не будет.

ЯМР-спектроскопия твердого тела, напротив, позволяет изучать как гистоновые хвосты, так и коровые участки гистонов. Так например в результате данных исследований были получены отнесения сигналов ЯМР

для коровой части гистонов(Shi et al., 2020 a; Shi et al., 2023) и была изучена взаимная динамика коровых частей гистонов H3 и H4 (Shi et al., 2020 b).

Использование обоих подходов оказывается актуальным при изучении поли- и олигонуклеосомных структур для идентификации частей нуклеосомы, принимающих участие в формировании таких структур. Так с помощью ЯМР-спектроскопии твёрдого тела было показано, что при формировании полинуклеосомных структур, конформационная динамика коровой части гистона H4 не изменяется относительно динамики в моонуклеосоме (Shi et al., 2018) и поэтому, по-видимому, его коровая часть не вовлечена в формирование этих структур.

В то же время, с помощью ЯМР-спектроскопии в растворе, было показано, что хвост гистона H3 взаимодействует с ДНК в составе полинуклеосомных структур более активно, чем в составе моонуклеосом, и поэтому оказывается менее динамичным (Zandian et al., 2021). В совокупности эти данные расширяют представление об организации хроматина в ядре.

1.3.Изучение конформационной динамики гистоновых хвостов и её изменений, вызванных ПТМ

Эпигенетические ПТМ хвостов гистонов регулируют активность генома различными способами: как за счет прямого влияния на динамику хвостов гистонов в нуклеосоме, так и с участием различных белков-посредников (Millán-Zambrano et al., 2022). Не всегда влияние ПТМ сводится только к изменению конформационной динамики гистоновых хвостов, однако в ряде случаев динамика является важнейшим фактором, влияющим на активность генома. Распространенным механизмом является изменение динамики хвостов гистонов за счет изменения эффективности их электростатических взаимодействий с нуклеосомной ДНК.

Так например, с помощью ЯМР-спектроскопии было показано, что ацетилирование каждого из коровых гистонов в нуклеосоме приводит к увеличению их динамики за счет нейтрализации положительно заряженных гистоновых хвостов (Kim et al., 2023). Аналогичный эффект наблюдается при замене H4 K16Q, имитирующей ацетилирование (Zhou et al., 2012). И к числу важнейших ПТМ гистонов относится цитруллинирование аргининов в составе N-конца, которое наиболее активно реализуется при НЕТозе нейтрофилов. Указанный НЕТоз является программируемой клеточной гибелью, при которой нейтрофилы высвобождают нити ДНК, формируя своеобразные сети. Данные ЯМР-спектроскопии свидетельствуют о том, что имитирующие цитруллинирования замены аминокислотных остатков аргининов на глутамины в N-конце гистона H3, приводят к значительному увеличению его динамики, также как и в случае ацетилирования: по причине ослабления взаимодействий с ДНК в нуклеосоме (Jennings et al., 2023) (Рис.3). Только в этом случае результатом может быть не локальная просто активация части генома, но, потенциально, запуск НЕТоза (хотя механизм этого процесса требует дополнительного изучения).

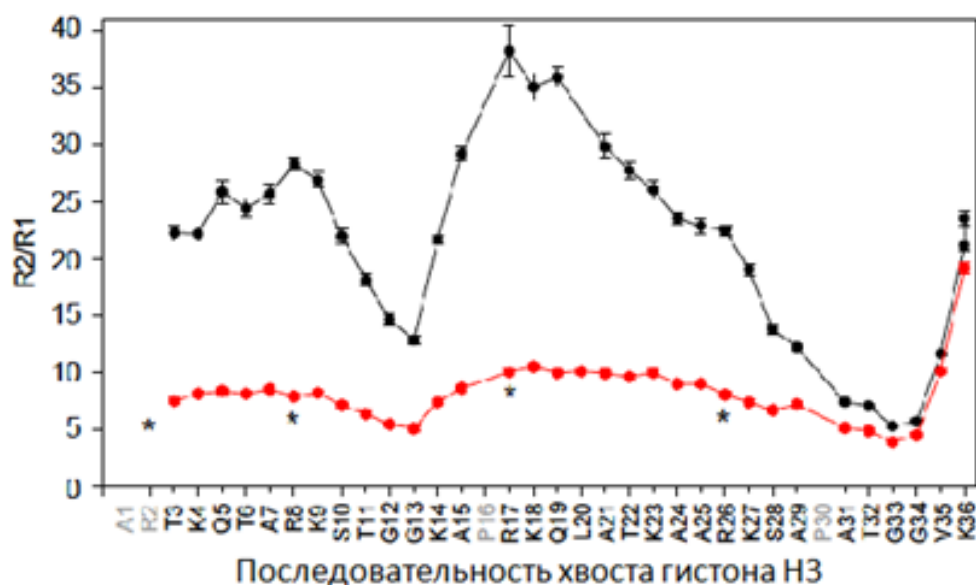


Рисунок 3. Нейтрализация аргининов в N-конце гистона H3 приводит к увеличению его подвижности (Jennings et al., 2023).

Значение $R2/R1$ для аминокислотных остатков гистона H3 без мутаций (чёрным) и с заменами аминокислотных остатков аргинина на аминокислотные остатки глутамин (красным, замеры отмечены *).

Также были проведены исследования, демонстрирующие сложные влияния ПТМ в составе одних гистоновых хвостов на динамику других гистоновых хвостов. Более того: возможно влияние и на эффективность внесения ПТМ в состав гистонового хвоста соседнего гистона. Так например убиквитинирование H2A изменяет динамику хвоста H3 и усиливает его метилирование H3K27 (Ohtomo et al., 2023). Также было показано, что ацетилованный хвост гистона H4 усиливает ацетилирование хвоста гистона H3. По-видимому этот эффект может достигаться за счет более частого контакта хвоста гистона H3 с ДНК при ацетилованном хвосте гистона H4. Вероятно, в таком состоянии хвост гистона H3 (H3K14) оказывается в более удобной конформации для ацетилтрансферазы Gcn5, отчего он эффективнее подвергается ацетилированию (Furukawa et al., 2023).

Приведенные примеры демонстрируют лишь некоторые механизмы влияния конформационной динамики гистоновых хвостов на регуляцию активности генома.

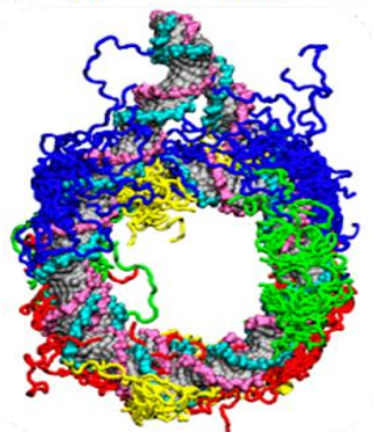
1.4. Моделирование методом МД конформационной динамики гистоновых хвостов

Моделирование методом молекулярной динамики позволяет изучить конформационную подвижность различных частей нуклеосомы, в том числе и неупорядоченных гистоновых хвостов. При этом большинство используемых силовых полей применимы и были разработаны для моделирования упорядоченных белков.

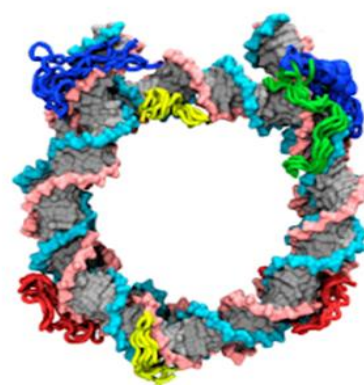
В связи с этим, для моделирования динамики неупорядоченных белков были разработаны специализированные модели воды, позволяющие воспроизводить их динамику корректно. Существует несколько параметров модели воды, обеспечивающих её применимости для моделирования неупорядоченных белков: увеличенный дипольный момент, увеличенная жесткость модели и увеличенный дисперсионный коэффициент (C_6 в потенциале 6-12) (Piana et al., 2015).

Так например трехточечная модель воды CAIPi3P имеет увеличенный дипольный момент относительно стандартной модели воды TIP3P (de Souza et al., 2020). Четырехточечная модель воды OPC имеет увеличенный дипольным моментом и жёсткую конфигурацию (Xiong et al., 2020). А четырехточечная модель воды TIP4P-D имеет в 1.5 раз увеличенный коэффициент C_6 относительно стандартной модели воды TIP3P, высокий дипольный момент, а также жесткую конфигурацию – что в совокупности обеспечивает ярко выраженный “разупорядывающий” эффект на конформационную динамику моделируемых белков (Piana et al., 2015).

Наблюдаемый конформационный ансамбль, принимаемый гистоновыми хвостами при моделировании с использованием данных моделей воды отличается от наблюдаемого при моделировании с использованием стандартных моделей (Рис.4.).



(Peng et al., 2021)



(Shaytan et al., 2016)

Рисунок 4. Конформационный ансамбль гистоновых хвостов при моделировании с использованием разных моделей воды. Слева - результат моделирования с использованием специализированной для моделирования неупорядоченных белков OPC (Peng et al., 2021); Справа - результат моделирования с использованием стандартной модели TIP3P (Shaytan et al., 2016).

При этом важным является сопоставление данных моделирования с экспериментальными данными для проверки корректности моделирования. Так в 2021 году было проведено исследование, которое показало, что динамика гистоновых хвостов в нуклеосоме при моделировании с использованием модели воды TIP4P-D согласуется с данными экспериментов ЯМР-спектроскопии. В данной работе проводили сравнение расчетных из МД-траекторий скоростей релаксации (R_1 и R_2) с измеренными в ходе эксперимента параметрами R_1 и R_2 (Rabdano et al., 2021).

Наличие экспериментального подтверждения корректности моделирования позволяет в большей степени доверять данным, полученным с помощью МД. Таким образом, можно говорить об определённого рода “синтезе” методов МД и ЯМР-спектроскопии,

которые при совместном использовании позволяют достоверно и детально охарактеризовать конформационную динамику гистоновых хвостов.

Более того, применяя метод моделирования молекулярной динамики можно наблюдать конформационные процессы в нуклеосоме, которые не удаётся наблюдать с помощью ЯМР-спектроскопии. Например, отворачивание ДНК от нуклеосомы – важнейший процесс в контексте регуляции активности генома. Так например с использованием МД-расчетов было показано, что хвост гистона H3 участвует в отворачивании ДНК (Armeev et al., 2021).

1.5. Малоугловое рассеяние рентгеновских лучей как способ изучения динамики ДНК в нуклеосоме.

Как уже было сказано, динамика ДНК в нуклеосоме имеет ключевое влияние на регуляцию активности генома. При этом молекулярное моделирование не является единственным способом изучать данный процесс: существуют и экспериментальные подходы, которые также как и ЯМР-спектроскопия, могут быть применены для изучения нуклеосом в растворе. Анализ малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) препарата нуклеосом может дать представление о динамике нуклеосомной ДНК.

При этом для многокомпонентной системы, такой как нуклеосома (состоящей из ДНК и белков), оба компонента вносят вклад в общее рассеяние. Эти вклады суммируются, чтобы получить амплитуду рассеяния; однако имеет место перекрестное рассеяние. Наличие этого перекрестного члена усложняет интерпретацию профиля рассеяния, поскольку вклад каждого компонента (который отражает его конформацию) не может быть легко извлечен из полной интенсивности рассеяния без предварительного знания формы одного компонента. Использование вариации контраста, которая увеличивает электронную плотность растворителя в соответствии с

плотностью белка, устраняет вклад белка в профиль рассеяния, оставляя только вклад ДНК. Сахароза идеально подходит для подбора контраста, поскольку она незначительно влияет на электростатические взаимодействия и стабильность нуклеосом (Рис.5.). Используя такой принцип, в 2018 году было изучено откручивание различных последовательностей ДНК от гистоновых октамера (Metauney et al., 2018).

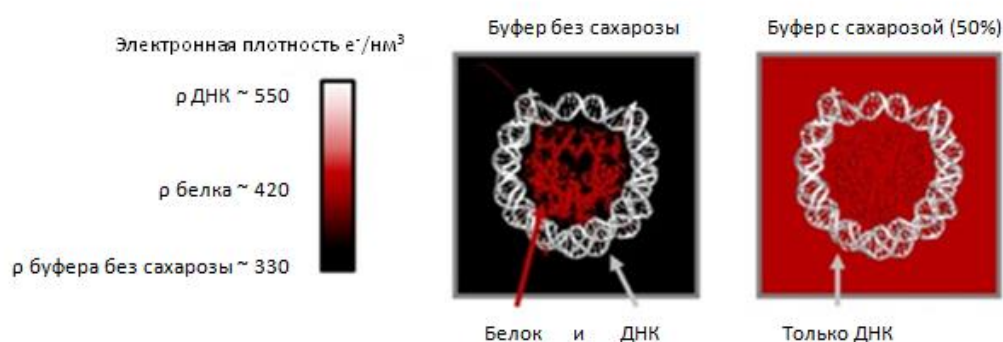


Рисунок 5. Использование сахарозы в качестве контраста при изучении МУРР нуклеосом (Tokuda et al., 2016).

Также описан метод использования данных МУРР в комбинации с молекулярным моделированием: из экспериментальных данных были извлечены определенные коэффициенты, которые используются для пространственного ограничения при молекулярном моделировании, ускоряя таким образом расчет и обеспечивая сходимость с экспериментом. Применяя данный метод, были проведены исследования откручивания ДНК от гистонного кодра для нуклеосом с вариантными гистонами (Ekimoto et al., 2019). Таким образом, данный метод является перспективным для изучения отворачивания ДНК в нуклеосомах, и в комплексе с данными МД и ЯМР-спектроскопии гистоновых хвостов, помогает изучать на атомарном уровне процессы регуляции активности генома.

2. Материалы и методы

2.1. Используемые в работе плазмиды и штаммы

Для наработки ДНК для нуклеосомы были использованы плазмиды на основе вектора pUC57, с находящейся в ней кассетой из восьми последовательностей ДНК для посадки нуклеосом, разделённых сайтами к рестриктазе EcoR V. Было использовано два вида плазмид, различающихся по последовательностям ДНК в составе кассеты: в одном случае последовательность Widom 601 (145 п.н.), в другом - Widom 603 (147 п.н.) (Рис..). В плазмиду с кассетой из последовательностей ДНК Widom 601 был встроен ген устойчивости к ампициллину, в случае Widom 603 - ген устойчивости к канамицину. Оверэкспрессию плазмид проводили в штамме *E.coli* XL-10.

Таблица 1. Использованные в работе нуклеосомные ДНК.

Название нуклеосомной ДНК	Последовательность ДНК	Длина (п.н.)
Widom 601	ATCAGAATCCCGGTGCCGAGGCCGCTCA ATTGGTCGTAGACAGCTCTAGCACCGCT TAAACGCACGTACGCGCTGTCCCCCGCG TTTAAACCGCCAAGGGGATTA CTCCCTA GTCTCCAGGCACGTGTCAGATATATACA TCGAT	145
Widom 603	ATCAGTTCGCGCGCCACCTACCGTGTG AAGTCGTCACTCGGGCTTCTAAGTACGC TTAGGCCACGGTAGAGGGCAATCCAAGG CTAACCACCGTGCATCGATGTTGAAAGA GGCCCTCCGTCCTTATTACTTCAAGTCCC TGGGAT	147

В качестве коровых гистонов для сборки нуклеосом были выбраны канонические гистоны человека (Таблица 2). Гистоны нарабатывали с использованием плазмид, на основе вектора pET-3a (для H2B, H2A и H4) и на основе вектора pET-3a для H3.1. Для наработки гистонов был использован штамм *E.coli* BL-21.

Таблица 2. Используемые в работе гистоны.

Название белка	Аминокислотная последовательность	Длина белка (аминокислотные остатки)	Молекулярная масса (кДа)
H2A	MSGRGKQGGKARAKAKTRSSRAGLOFPVGR VHRLLRKGNYSERVGAGAPVYLAHVLEYLT AEILELAGNAARDNKKTRIIPRHLQLAIRNDE ELNKLGRVTIAOGGVLPNIQAVLLPKKTESH HKAAGK	130	14.14
H2B	MPEPAKSAPAPKKGSKKAVTKAQKKDGKKR KRSRKESYSVYVYKVLKQVHPDTGISSKAMG IMNSFVNDIFERIAGEASRLAHYNKRSTITSRE IQTAVRLLLPGELAKHAVSEGTKAVTKYTSA K	126	13.89
H3.1	MARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSA PATGGVKKPHRYRPGTVALREIRRYQKSTEL LIRKLPFQRLVREIAQDFKTDLRFOSAVMAL QEACEAYLVGLFEDTNLCAIHAKRVTIMPKDI QLARRIRGERA	136	15.40
H4	MSGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLRDNIQGI TKPAIRRLARRGGVKRISGLIYEETRGVLKVF LENVIRDAVTYTEHAKRKTVTAMDVVYALK RQGRTLYGFGG	103	11.37

2.2. Получение ДНК для сборки нуклеосом

Оверэкспрессию плазмид, содержащих кассету с последовательностями ДНК для сборки нуклеосом, проводили с использованием следующего протокола: единичная колония перемещалась в 4 мл жидкой LB (с необходимым антибиотиком), после четырёх часов роста (при 37°C, 220 rpm) суспензию переносили в 100 мл жидкой LB (с целевым антибиотиком) и выращивали ещё 2 часа (при 37°C, 220 rpm). После этого 100 мл суспензии распределяли по пяти колбам с 1 литром жидкой среды LB с антибиотиком и выращивали 16 часов при 37°C, 220 rpm.

Плазмиду выделяли препаративно, после чего, очистив от примесей, проводили реакцию рестрикции, инкубировали плазмиду с рестриктазой (соотношение 300 единиц активности фермента к 1 мг плазмиды) в течение 20 часов при температуре 37°C. После этого необходимый фрагмент выделяли из реакционной смеси путём осаждения в растворе полиэтиленгликоля (ПЭГ 6000). В целом протокол аналогичен описанному в статье (Dyer et al., 2003).

2.3. Нарботка рекомбинантных гистонов

Каждый из гистонов нарабатывали путём выращивания на среде LB до оптической плотности OD₆₀₀ 0.6-0.8 (при 37°C, 220 rpm), после чего добавляли ИПТГ до конечной концентрации 0.4 mM и в течение 4 часов продолжали выращивание (при 37°C, 220 rpm).

Для экспериментов по ЯМР-спектроскопии был наработан ¹⁵N-меченый (а также ¹⁵N¹³C-меченый) гистон H3. Для этого белки были наработаны на изотоп-содержащей минимальной среде M9. Вначале клетки выращивали на богатой среде LB среде до оптической плотности OD₆₀₀ 0.4-0.5, после чего перемещали клетки в среду M9, и после одного часа роста (при 37°C,

220 rpm) добавляли ИПТГ до концентрации 0.4 mM и при тех же условиях выращивали четыре часа. Выращивание проводили, обеспечивая хорошую аэрацию (100 мл среды в 500 мл колбах). В случае наработки гистона H3 для его изучения в свободном виде, среда M9 содержала $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (1 г/л), в случае наработки гистона H3 для его изучения в составе нуклеосомы среда M9 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (1 г/л) и ^{13}C -D-глюкозу (2 г/л).

2.4. Очистка рекомбинантных гистонов

Очистку рекомбинантных гистонов проводили в соответствии с протоколом, описанным в статье (Klinker et al., 2014). Для увеличения выхода белка, после этапа лизиса клеток с использованием ультразвукового дезинтегратора, не разрушившиеся тельца включения, были в течение часа инкубированы в присутствии 8 M гуанидин хлорида (8 M гуанидин хлорид, 20 mM Na-ацетат [pH 5.2], 2 mM ДТТ) при 37°C, 220 rpm. Затем с помощью центрифугирования (30 минут 25°C, 12000 g) от осадка отделяли надосадочную жидкость, которую после диализовали против mQ и использовали в последующих этапах для очистки наработанного гистона. Все этапы очистки (от лизиса клеток до ионообменной хроматографии) проводили в присутствии 7.5 M раствора мочевины (Klinker et al., 2014).

Для ионообменной хроматографии были использованы колонки HiTrap: анионообменная колонка HiTrap Q FF для отделения от ДНК и отрицательно заряженных белков, а также катионообменная колонка HiTrap SP FF для очистки гистонов. После очистки одиночных гистонов с помощью ионообменной хроматографии, выбранные фракции диализовали против mQ в течение трех дней при ежедневной смене mQ. Очищенные гистоны хранили при -80 °C.

2.5. Сборка и очистка октамеров гистонов

Каждый из четырёх гистонов концентрировали с использованием SpeedVac, после чего их перемещали в денатурирующий раствор (7 М гуанидин хлорид, 50 mM Tris-HCl [pH 8], 10 mM ДТТ) при молярном соотношении H2A:H2B:H3:H4 ~ 1,5:1,5:1:1. В дальнейшем смесь диализовали против ренатурирующего раствора (2 М NaCl, 50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM Na-ЭДТА, 5 mM β -Me). После смесь концентрировали и проводили разделение частиц по размеру с использованием колонки Superdex 200 16/600 с целью очистки октамеров.

2.6. Сборка нуклеосом методом ступенчатого диализа и контроль качества сборки

Очищенную ДНК и октамеры смешивали в определённом молярном отношении. Для подготовки образцов для экспериментов по малоугловому рентгеновскому рассеянию (МУРР) нуклеосом это отношение соответствовало 1:1.15 (с целью минимизировать содержание свободной ДНК), а для экспериментов методом ЯМР 1:0.9 (с целью минимизировать содержание свободных гистоновых октамеров). Далее при 4 °C проводили ступенчатый диализ против буферов (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.1% NP-40, 0.2 mM ЭДТА, 5 mM β -ME) с поэтапным снижением концентрации NaCl с 2 М до 10 mM (Gerasimova et al., 2022).

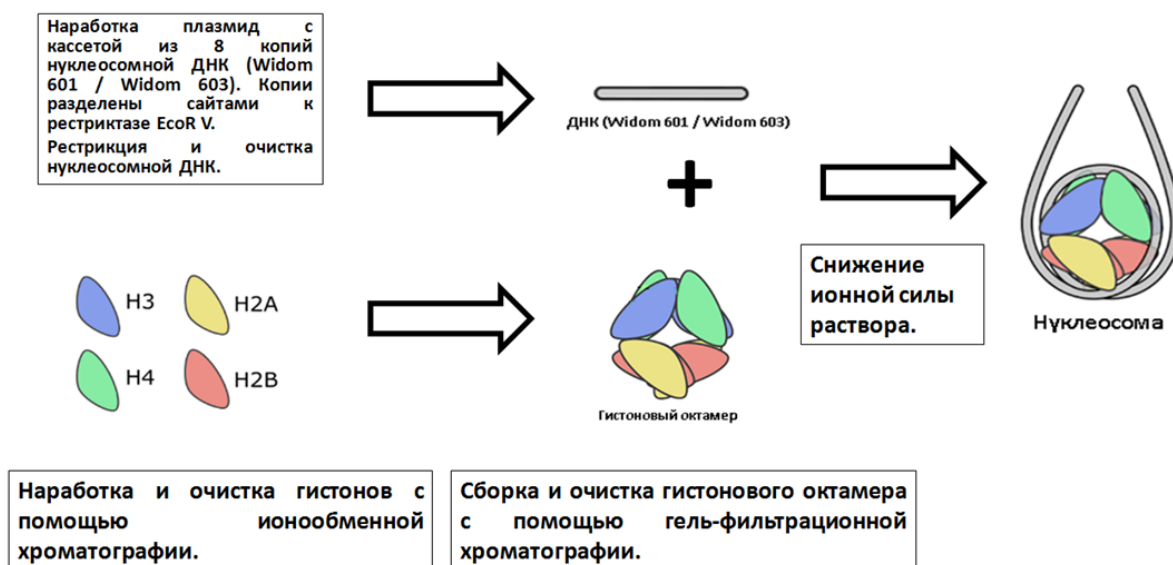


Рисунок 6. Этапы получения нуклеосом.

2.7. Протоколы расчетов методом молекулярной динамики использованием различных моделей воды

Моделирование проводилось с использованием программного пакета GROMACS версии 2020.1 (Abraham, et al. 2015) с силовыми полями Amber14sb (Maier et al., 2015) и Amber19sb (Tian et al., 2020) с использованием графических процессоров. Моделирование проводили в додекаэдрической ячейке с минимальным расстоянием от глобулы белка до границы ячейки 2 нм, протокол молекулярно-динамических расчетов аналогичен описанному в работе (Armeev et al., 2021). Моделирование проводили с использованием термостата Нозе-Гувера (Hoover, 1985), баростата Паринелло-Романа (Parrinello and Rahman, 1980; Parrinello and Rahman, 1981; Parrinello and Rahman, 1982).

При моделировании использовали модели воды OPC (Amber19sb), Tip4p/2005 (Amber14sb), Tip4p-D (Amber14sb) и CAIPi3P (Amber14sb + CUFIX). В качестве структуры нуклеосомы была использована структура 1KX5. Длительность моделирования, а также установленная температура и

концентрация NaCl варьировались в зависимости от конкретной задачи (см. раздел Результаты и обсуждения).

2.8. Проведение экспериментов ЯМР для изучения свободного гистона H3.1 и гистона H3.1 в составе нуклеосомы

2.8.1. Измерение параметров релаксации ядер свободного гистона H3.1

Все эксперименты с использованием ЯМР-спектроскопии были проведены в Институте биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова. Для проведения ЯМР-экспериментов использовали очищенный препарат 80 мкМ ^{15}N ^{13}C свободного гистона H3.1 в буфере Tris-HCl [pH 6.9], 20 мМ NaCl, 1 мМ TSEP, 5% D₂O. Перед измерением в 350 мкл препарата добавили 0.5 мкл 1М NaN₃, после чего образец был помещен в кварцевую ампулу типа Shigemí.

Отнесение сигналов атомов основной цепи (HN, N, Co, C α) подвижного хвоста гистона H3.1 было проведено с использованием ЯМР спектров 2D ^1H - ^{15}N HSQC, 3D HNCO, 3D HN(CA)CO, 3D HNCOSA, полученных на приборе Bruker Avance III 600MHz, оснащенный криодатчиком. Обработка и анализ спектров осуществлялись с помощью программы Bruker TOPSPIN. Отнесение пиков проведено с помощью программы CARA (версия 1.84, Цюрих, Швейцария). Эксперименты были проведены при температуре 25 °C

Для измерения параметров релаксации ядер ^{15}N (R1, R2, ^{15}N -{ ^1H }-NOE) концентрация NaCl в препарате гистона H3.1 была увеличена до 100 мМ. . Для данных экспериментов был использован прибор Bruker Avance III 700 MHz, оснащенный криодатчиком. Для измерения времен релаксации T1 и T2 проводили с использованием импульсных последовательностей hsqct1etf3gpsi3d.2 и hsqct2etf3gpsi3d.2, заданных 8 задержками: 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.5 с. для T1 и от 1 до 8 с. с шагом 1 с. Все эксперименты были проведены при температуре 25 °C.

2.8.2. Измерение параметров релаксации гистона H3.1 в составе нуклеосомы.

Препарат нуклеосом с ДНК Widom 601 и гистонов ^{15}N H3.1 в их составе был переведен в буфер в Tris-HCl [pH 6.9], 20 mM NaCl, 1 mM TSEP, 0,1% NP-40, 5% D₂O при концентрации нуклеосом 35 мкМ. Перед измерением в 350 мкл препарата добавили 0.5 мкл 1M NaN₃, после чего образец был помещен в кварцевую ампулу типа Shigemí. Измерения проводили при температуре 25 °С при двух различных концентрациях NaCl: 20 mM и 100 mM. Сначала проводили измерение при 20 mM NaCl, затем поднимали концентрацию до 100 mM. Был использован прибор Bruker Avance III 700 MHz, оснащенный криодатчиком.

Отнесение сигналов для участка подвижного хвоста гистона ^{15}N H3.1 (остатки 1-38) в составе нуклеосомы было взято из статьи (Morrison et al., 2021). Для отнесения сигналов снимали ЯМР спектры 2D ^1H – ^{15}N HSQC и TROSY. Для измерения параметра релаксации R₁ при 20 mM и 100 mM NaCl использовали импульсную последовательность trlt1etf3gpsi3d с задержками 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 0.8 с.

Также для оценки изменения химического окружения хвоста гистона H3 в составе нуклеосомы, вызванного изменением концентрации NaCl, было проанализировано изменение химических сдвигов сигналов ^1H и ^{15}N гистона H3 при 20 mM и 100 mM NaCl. Для их расчёта была использована формула (CSP):

$$\text{CSP}_i = \sqrt{\Delta\delta\text{H}_i^2 + (0.25 \cdot \Delta\delta\text{N}_i)^2} \quad (1)$$

где $\Delta\delta\text{H}_i$ и $\Delta\delta\text{N}_i$ - разница химсдвигов ^1H и ^{15}N в 100 mM и 20 mM NaCl.

3. Результаты и их обсуждение

3.1. Контроль качества гистоновых октамеров и нуклеосомной ДНК

После получения очищенных гистоновых октамеров и нуклеосомной ДНК был проведен контроль качества перед сборкой нуклеосом. В случае фракции гистоновых октамеров был проведён денатурирующий электрофорез, который показал, что в препарате присутствуют только четыре типа белка – коровые гистоны H2A, H2B, H3.1, H4 (Рис.7А). В случае нуклеосомной ДНК был проведен ДНК-электрофорез, демонстрирующий присутствие в препарате фрагмента нужного размера (~145/147 п.н.) и отсутствие других фрагментов ДНК (Рис.7Б).

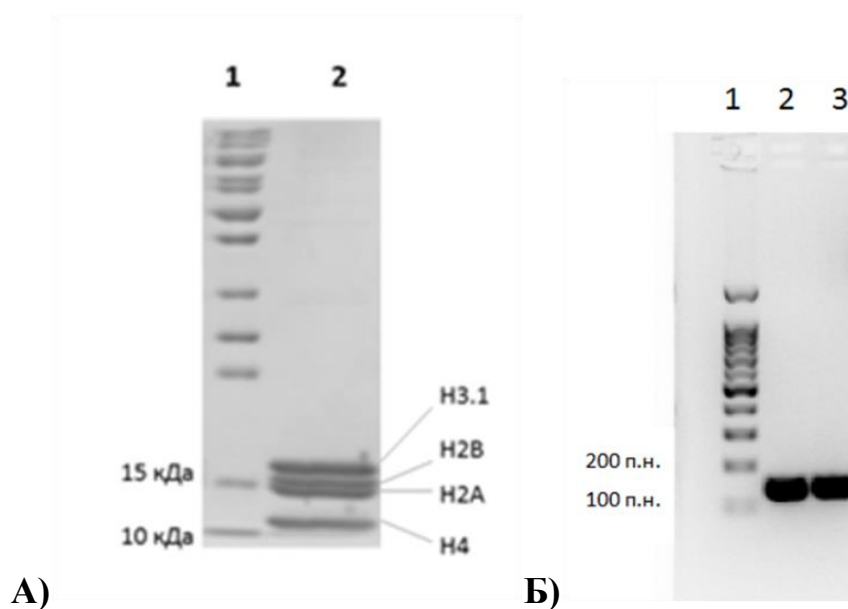


Рисунок 7. Контроль качества октамеров гистонов (А) и нуклеосомной ДНК (Б) перед сборкой нуклеосом. А) 18% ДСН-ПААГ: 1 – маркер, 2 – фракция очищенных октамеров Б) гель 2% агароза ТАЕ-буфер. 1- ДНК-маркер 100 bp, 2-3 – очищенная нуклеосомная ДНК (Oleinikov et al., 2023 с переводом) – изображение получено Моториным Н. А.

Данный контроль качества позволял снизить вероятность агрегации нуклеосом, которая может происходить в контаминированном препарате.

3.2. Контроль качества собранных нуклеосом

В качестве первичной оценки качества собранных нуклеосом, был использован нативный гель-электрофорез в 4% ПААГ (10 мМ HEPES-Na pH 8.0, 0.2 мМ ЭДТА, 10% глицерин). Показателем содержания моонуклеосом в препарате являлось присутствие полосы на уровне 400-500 п.н. ДНК, которая подвергается окрашиванию как SYBR Gold (взаимодействующего с ДНК), так и Coomassie Brilliant Blue (взаимодействующего с белком) (Рис.8А).

Также препараты были проанализированы с помощью просвечивающего электронного микроскопа, контрастируя препарат уранил ацетатом (Рис.8Б). Результат анализа показал, что в препарате присутствуют единообразные частицы диаметром ~10 нм, что соответствует диаметру моонуклеосомы и свидетельствует об их преимущественном содержании в препарате.

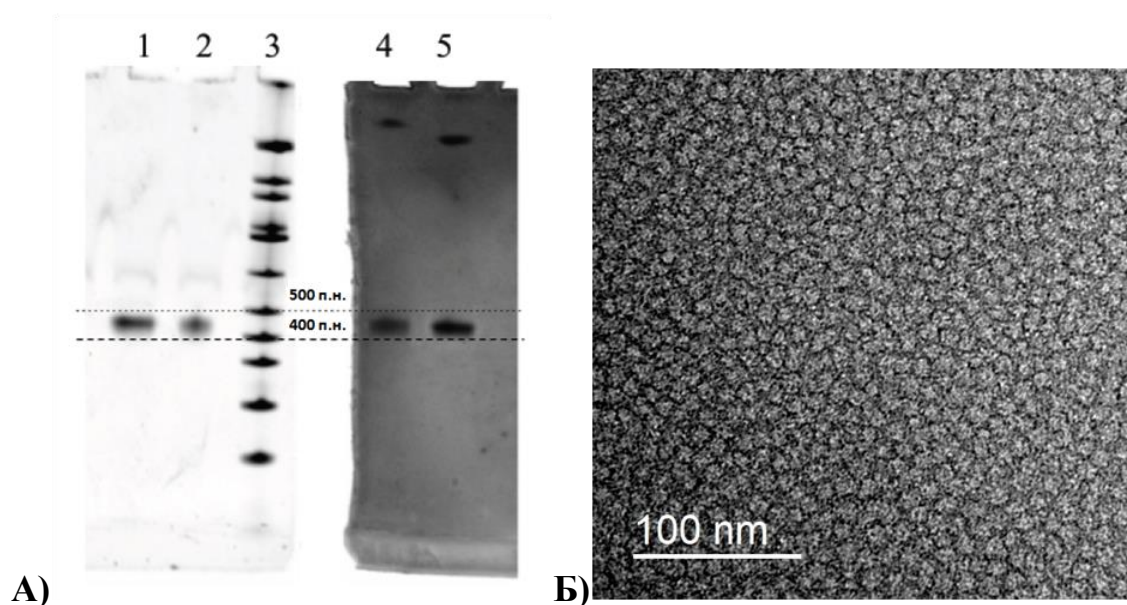


Рисунок 8. Контроль качества препаратов с нуклеосомами. А) Нативный электрофорез (Oleinikov et al., 2023 с переводом) – изображение получено Моториным Н. А. 1 – нуклеосомы с 601 Widom последовательностью (окраска SYBR GOLD), 2 – нуклеосомы с 603 Widom последовательностью (окраска SYBR GOLD), 3 – ДНК маркер 1000 bp (окраска SYBR GOLD), 4 – нуклеосомы с 603 Widom последовательностью (окраска Coomassie Brilliant Blue), 5 – нуклеосомы с 601 Widom последовательностью (окраска Coomassie Brilliant Blue). Б) Изображение нуклеосом, полученное методом электронной просвечивающей микроскопии с негативным контрастированием (для нуклеосом с 601 Widom последовательностью) - изображение получено Афониным Д. А.

Также для полученных препаратов была проведена криоэлектронная микроскопия и были получены реконструкции электронной плотности, соответствующие по форме и размерам типичным нуклеосомам, что также является свидетельством преимущественного содержания мононуклеосом в препаратах (Рис.9АБ).

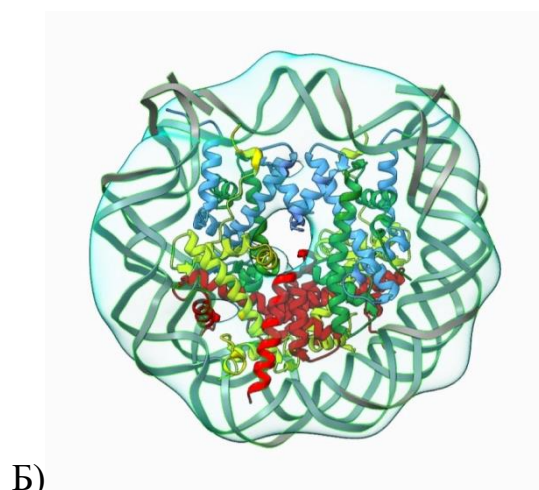
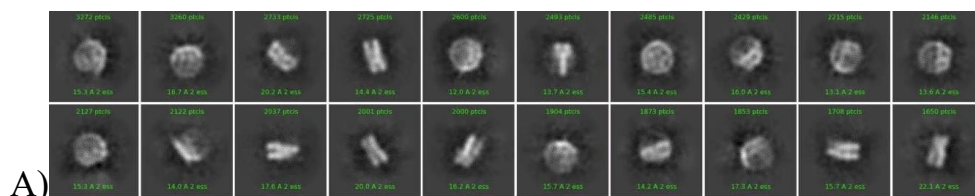


Рисунок 9. Криоэлектронная микроскопия нуклеосом с ДНК последовательности Widom 603 (сделано Моисеенко А. В.).

А) 2D-классы, полученные в ходе анализа;
 Б) Реконструкция структуры нуклеосомы: светло-голубым показана электронная плотность, в которую вписана структура нуклеосомы. Разрешение $\sim 10 \text{ \AA}$.

В совокупности полученные данные свидетельствуют о том, что описанная методика получения моноклеосом является оптимальной для использования.

3.3. Применения полученного препарата в экспериментах по МУРР

Для препаратов с концентрацией нуклеосом $\sim 1.8 \text{ мг/мл}$ в растворе с концентрацией сахарозы 30% (м/м) (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1% NP-40, 0.2 mM ЭДТА, 5 mM β -МЕ, 105 mM NaCl) были проведены эксперименты по изучению МУРР. Исследования были проведены на Курчатовском источнике синхротронного излучения на станции БиоМУР, в Москве в НИЦ «Курчатовский институт». Подготовленные для измерений

образцы помещали в 2 мм кварцевые капилляры, закрепленные в термостатическом держателе при температуре 4°C. Для измерений был использован детектор DECTRIS Pilatus3 X 1 м, установленный на расстоянии 2 м от образца. Длина волны при измерении составляла 1.445 Å, время экспозиции образцов составляло 10 мин. В результате были получены профили интенсивности рассеяния для препаратов (Рис.10).

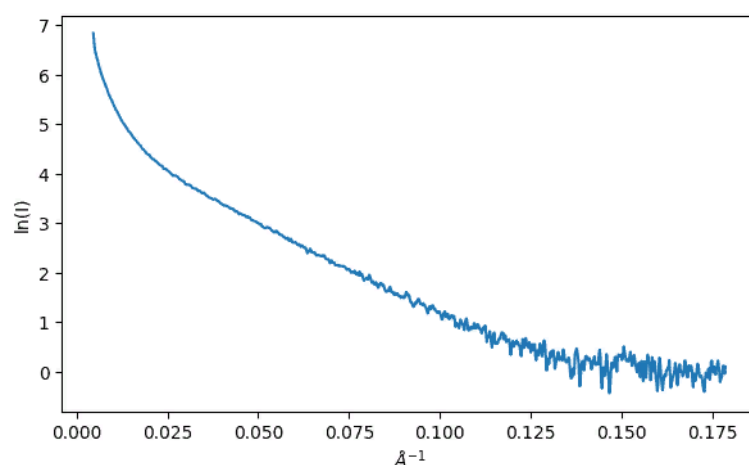


Рисунок 10. Профиль МУРР для препарат с мононуклеосомами с ДНК последовательности Widom 603.

Полученные профили рассеяния демонстрировали возможность получения данных МУРР от препаратов нуклеосом для их дальнейшего анализа и для анализа откручивания различных последовательностей ДНК от нуклеосомы.

3.4. Изучение динамики хвоста гистона Н3 методами молекулярной динамики с использованием различных моделей воды

Из МД-траекторий нуклеосомы 1KX5, проведённых при температуре 300 К, при концентрации NaCl 150 мМ, были рассчитаны параметры R1, R2 и T1/T2 для хвоста гистона Н3. Расчёт был проведён с использованием

кода, любезно предоставленного профессором Y. Peng. при концентрации NaCl 150 mM.

Таким образом, был проведён расчёт параметров R1, R2 и T1/T2 для хвоста гистона H3 на основе траектории длиной в 1 мкс, рассчитанной в силовом поле Amber19sb с использованием специализированной для моделирования неупорядоченных белков модели воды OPC. Траектория была рассчитана Федуловой А.С. в рамках консорциума по изучению динамики гистоновых хвостов в нуклеосомы при моделировании в различных моделях воды.

Значения расчётных параметров оказались приближенными к экспериментальным, также полученным для хвоста гистона H3 при 150 mM концентрации NaCl (Jennings et al., 2023), при этом также воспроизводятся тенденции увеличения значений R2 и T1/T2 (и снижения значения R1) ближе к коровой части гистона (Рис.11).

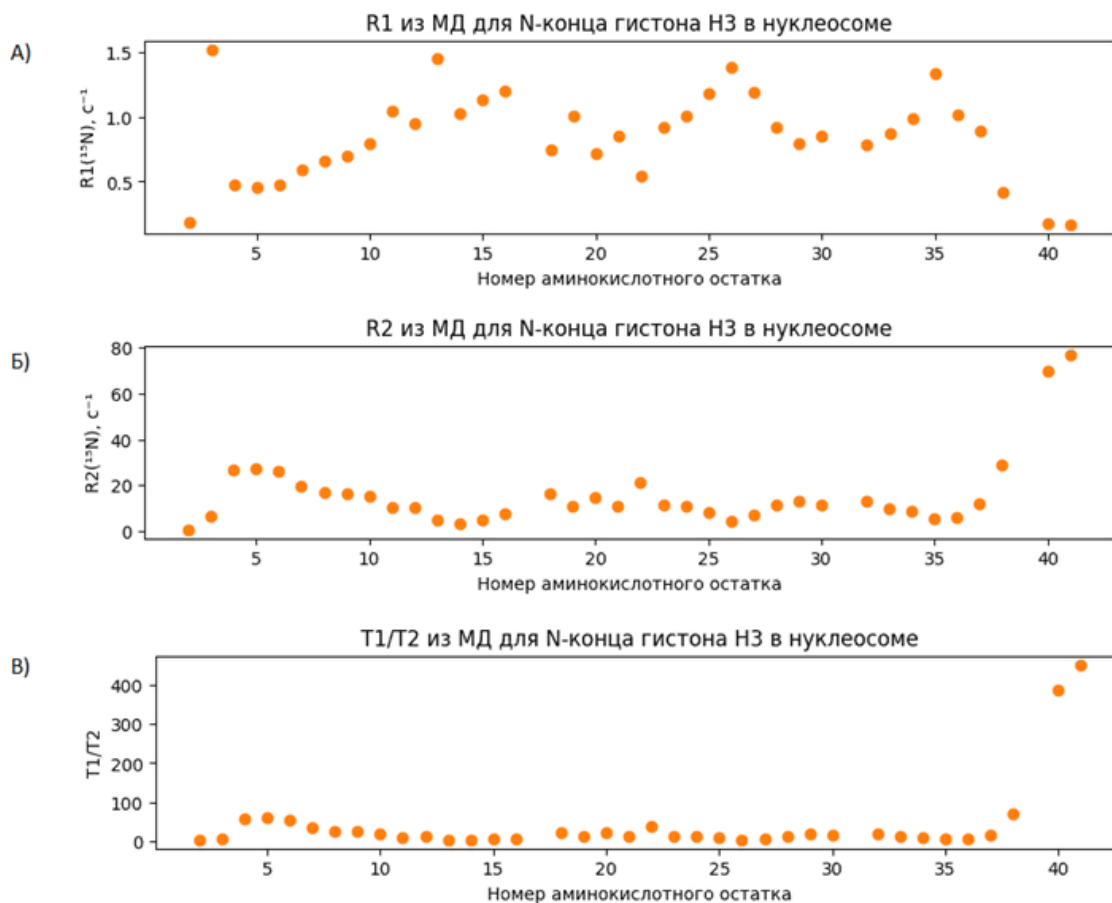


Рисунок 11. Расчётные из МД параметры R1, R2 и T1/T2.

Аналогичным образом были рассчитаны параметры T1/T2 для N-концов гистонов H3 в нуклеосоме из траекторий длиной 300 нс, проведённых в таких же условиях, но с использованием других моделей воды и других силовых полей: модель воды Tip4p/2005 и силовое поле Amber14sb), модель воды Tip4p-D (Amber14sb) и силовое поле, а также модель воды CAIPi3P и силовое поле Amber14sb с модификацией CUFIX (Рис.12).

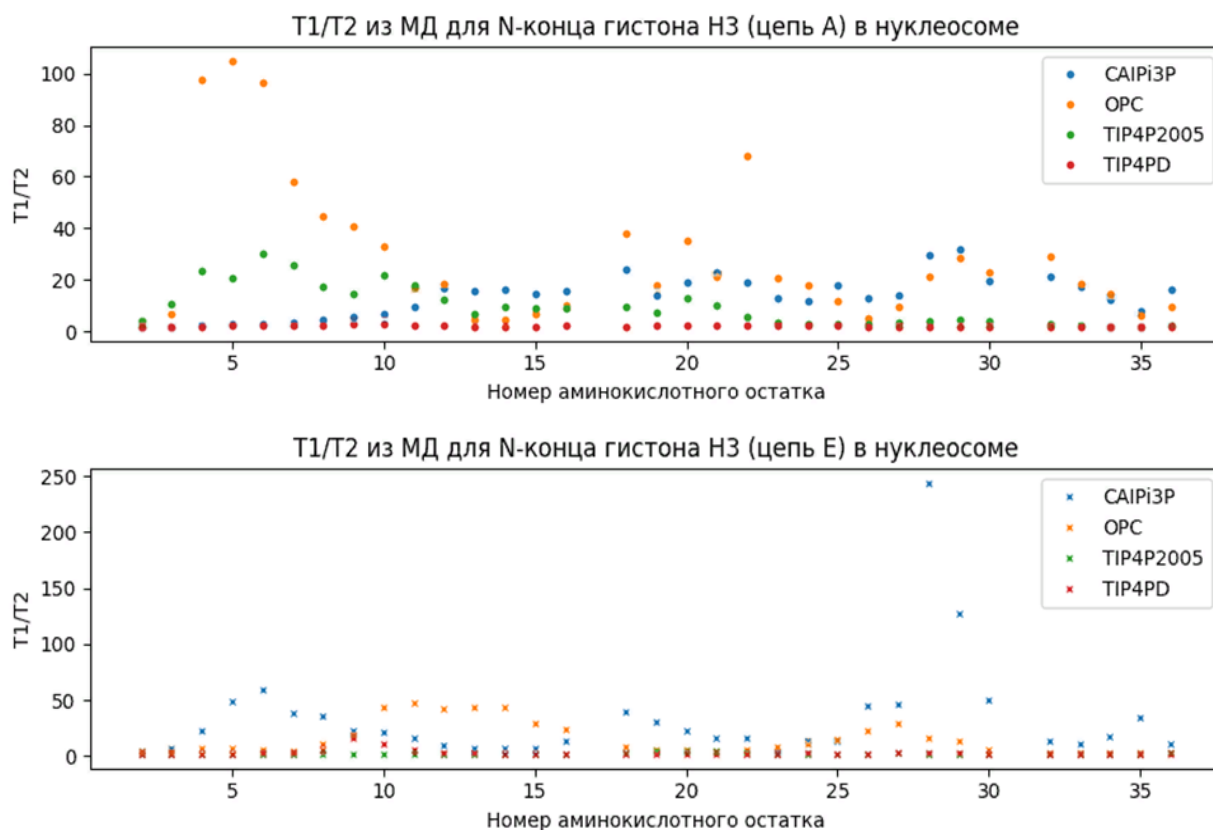


Рисунок 12. Профиль рассчитанных из молекулярной динамики R1 R2 вдоль сиквенса гистона Н3.

Наблюдается разница значений $T1/T2$, в зависимости от использованной модели воды, что подтверждает важность этого параметра при моделировании. Вместе с этим, по полученным данным можно сделать вывод о том, что хвосты гистонов Н3 являются наиболее динамичными при моделировании с использованием модели воды TIP4P-D и более динамичным, чем в ходе ЯМР-эксперимента (Jennings et al., 2023). Вместе с этим, более ранние работы свидетельствуют о высоком соответствии динамики гистоновых хвостов, наблюдаемых при моделировании с использованием модели воды TIP4P-D относительно экспериментов ЯМР (Rabdano et al., 2021). Вероятно, наблюдаемая в нашем случае завышенная динамика хвоста гистона Н3 может быть связана с недостаточным временем моделирования – хвосты гистонов не успевают “залипнуть” на ДНК. Требуются дальнейшие исследования данного вопроса.

3.5. Обратимое откручивание ДНК при моделировании с использованием модели воды TIP4P-D

Факт соответствия динамики гистоновых хвостов при моделировании с использованием модели воды TIP4P-D наблюдаемой в эксперименте (Rabdano et al., 2021), может свидетельствовать о перспективности использования данных условий моделирования для изучения функционально значимых процессов в нуклеосоме. Например, опосредованное хвостом гистона H3 откручивание ДНК (Armeev et al., 2021). Поэтому была проведена 1 мкс молекулярная динамика с использованием этой модели воды.

Было обнаружено, что откручивание ДНК от октамера гистонов в этих условиях моделирования происходит значительно быстрее (менее, чем за 1 мкс), чем при моделировании с использованием других моделей воды, где это происходит в диапазоне микросекунд (Armeev et al., 2021). При этом данный процесс является обратимым и менее, чем за 1 мкс моделирования, ДНК успевает частично диссоциировать от гистонового октамера и вернуться в начальное положение (Рис.13).

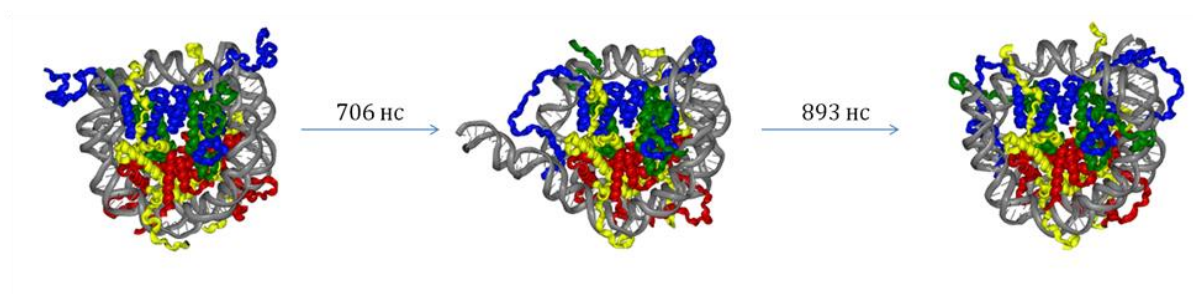


Рисунок 13. Обратимое откручивание ДНК от октамера гистонов.

Данное наблюдение можно объяснить повышенной динамикой хвоста гистона H3, который участвует в данном процессе (Armeev et al., 2021).

Возможно, за счет более частого изменения конформации хвоста этого гистона, быстрее находится такая его конформация, которая опосредует отворачивание ДНК.

3.6. Изучение структуры и динамики свободного гистона НЗ.1 методами ЯМР-спектроскопии

Для изучения с использованием ЯМР-спектроскопии свободного гистона НЗ.1 был подготовлен очищенный препарат данного белка, не содержащий большого количества примесей, которые могли бы усложнить последующие эксперименты (Рис.14.).

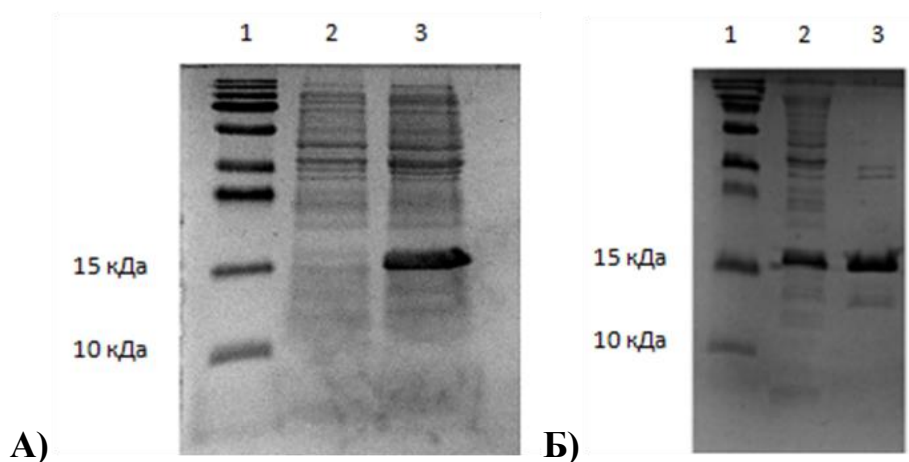


Рис.14. Нарботка гистона НЗ на минимальной среде М9 и последующая очистка.

А) SDS-PAGE 18%: 1- маркер, 2 – лизат клеток до добавления IPTG, 3 – лизат клеток после добавления IPTG и 4 часов наработки белка.

Б) SDS-PAGE 18%: 1- маркер, 2 – лизат клеток с наработанным гистоном НЗ.1, 3 – НЗ.1. после очистки.

После проведения экспериментов ЯМР-спектроскопии и получения необходимых спектров ЯМР, для $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ -меченого гистона НЗ.1 было проведено отнесение сигналов к аминокислотным остаткам белка. Примечательно, что в HSQC-спектре удалось наблюдать лишь 37

аминокислотных остатков N-конца (Рис.15А), при этом сигналов коровой части гистона не наблюдалось, что довольно необычно, так как в данном эксперименте гистон Н3.1 не находился в составе нуклеосомы. При этом, при измерении параметров R1, R2, hnNOE, их значения оказываются характерными для свободного пептида (Рис.15БВГ). Эти данные могут свидетельствовать о формировании гомоолигомеров гистона Н3.1., в составе которых N-конец является конформационно подвижным (вероятно, за счёт экспонированности на периферию).

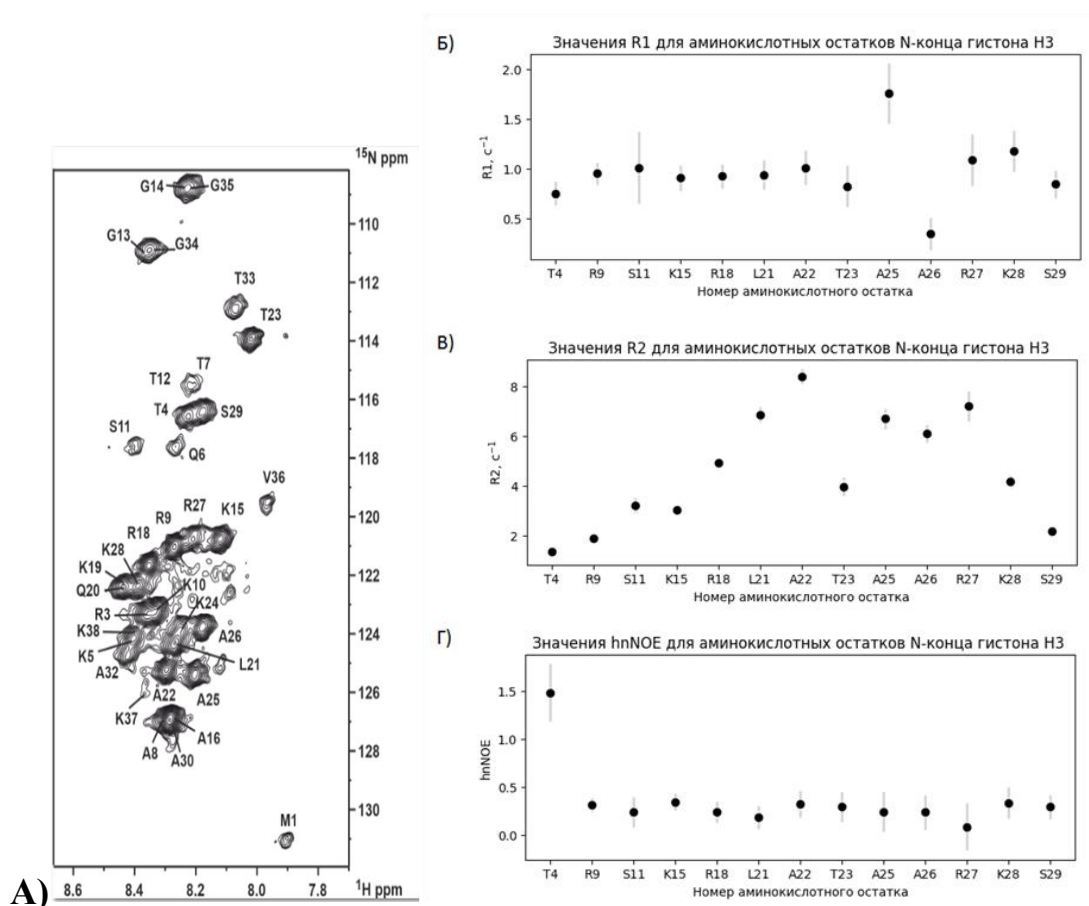


Рисунок 15. ЯМР эксперименты для очищенного Н3.1.

А) HSQC спектр для N-конца гистона Н3.1 в свободном виде. Б) Спектр R1 для N-конца гистона Н3, В) Спектр R2 для хвоста гистона Н3. Г) Спектр hnNOE для N-конца гистона Н3.

Программа AlphaFold2 предсказывает (Jumper et al., 2021; Mirdita et al., 2022), что два гистона H3.1 могут сформировать относительно устойчивый гомодимер, в основе которого был бы аналогичный тип взаимодействия “рукопожатие”, характерное для димеров H3-H4 и H2A-H2B в нуклеосоме (Рис.16.). Возможно, при формировании гомоолигомеров гистона H3.1 как раз реализуются такие взаимодействия. Однако, данный вопрос требует дальнейшего изучения.

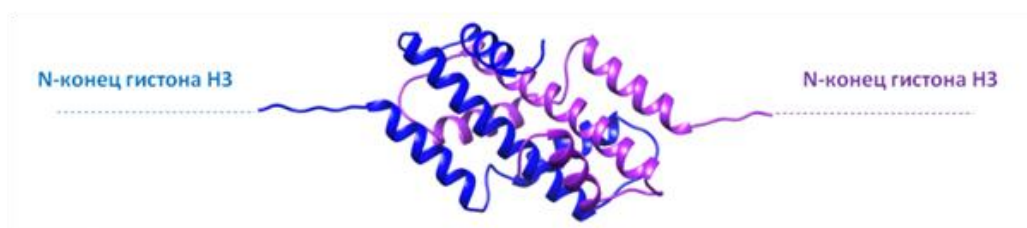


Рисунок 16. Возможная структура гомодимера гистона H3.1 (предсказание программы AlphaFold2).

Недавно, в процессе выполнения данной работы, была опубликована работа (Zhao et al., 2024), в которой была продемонстрирована возможность формирования гистоном H2A гомодимера. Примечательно, что в данной работе была показана возможность формирования инвертированного гомодимера H2A, в котором неупорядоченные N-концы оказывались сонаправлены и поэтому снижали вероятность формирования гомодимера (отчего гомодимер формировался только между гистонами H2A с отсутствующими N-концами).

В нашем случае программа AlphaFold2 предсказывает формирование канонического гомодимера H3.1, что объясняет почему в данном случае N-концы не снижают вероятность олигомеризации.

3.7. Изучение конформационной динамики хвоста гистона H3.1 в нуклеосоме методами ЯМР-спектроскопии/молекулярной динамики влияния концентрации соли на неё

Для N-конца гистона H3.1 в составе нуклеосомы, при изменении концентрации NaCl в экспериментах ЯМР наблюдались некоторые изменения (Рис. 17А). Так например, значения R1 для выбранных аминокислотных остатков (которым соответствовали пики с наибольшей интенсивностью и наименьшей ошибкой R1) при увеличении концентрации NaCl увеличивали собственное значение (Рис.17Б.). Это может быть результатом ослабления электростатических взаимодействий хвоста гистона H3.1 с ДНК при увеличении ионной силы раствора.

Также при изменении концентрации NaCl наблюдалось изменение положения сигналов для ряда аминокислотных остатков в HSQC-спектре. При этом локализация наибольших изменений значения химических сдвигов наблюдалась в следующих участках N-конца гистона H3.1: 7-12, 16-20, 25-30, а также для аминокислотного остатка K37 (Рис..17В). Примечательно, что в большинстве случаев эти области максимального изменения химического окружения локализованы вблизи аргининов. что может быть связано с ослаблением электростатических взаимодействий этих аминокислотных остатков с нуклеосомной ДНК и, как следствие - изменением конформационной динамики.

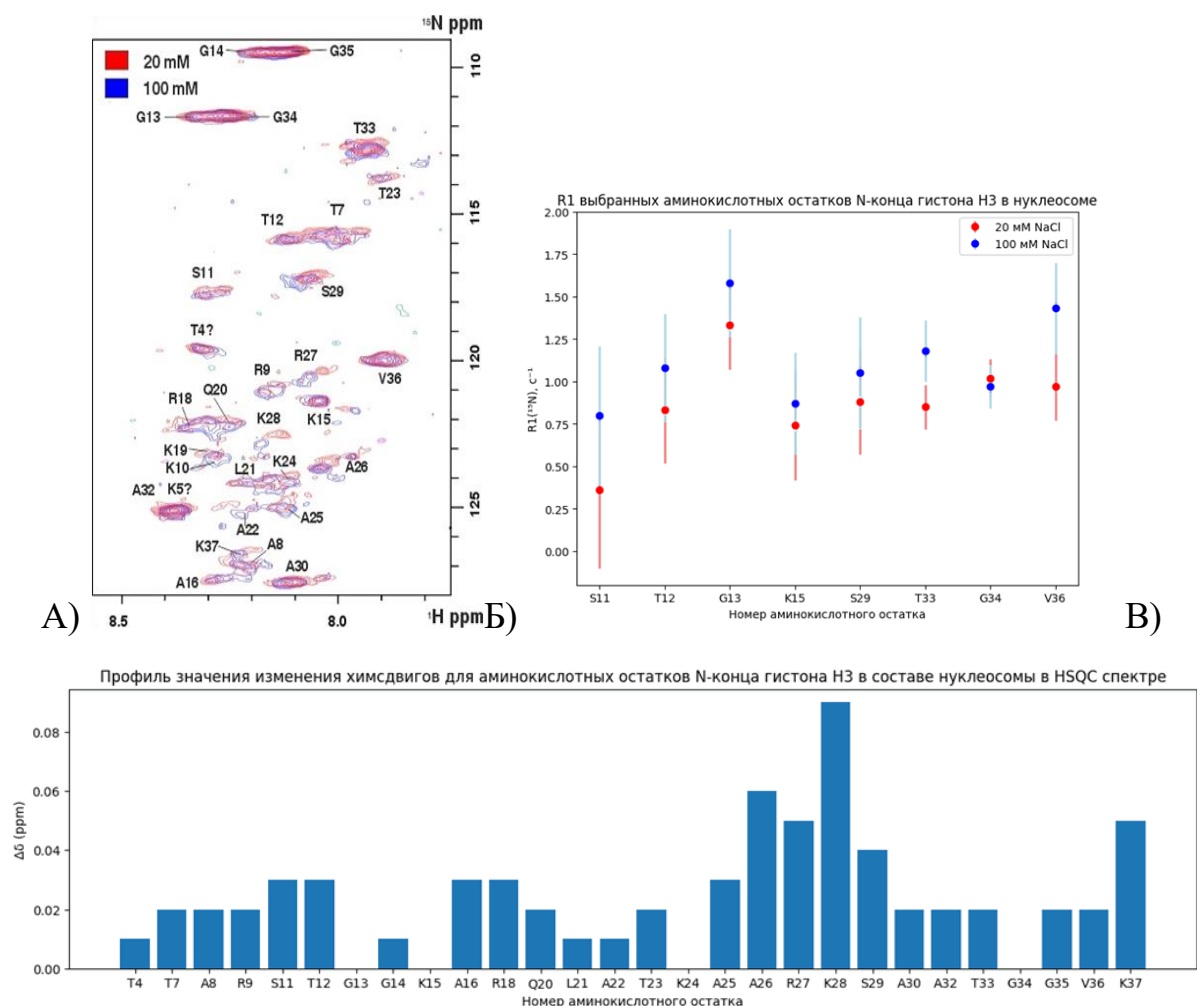


Рисунок 17. Отличия в динамике гистоновых хвостов НЗ в составе нуклеосомы, вызванные изменением концентрации NaCl. А) HSQC спектр для хвоста гистона НЗ в нуклеосоме при различной концентрации NaCl, Б) Изменение в значениях $R1$, вызванные изменением концентрации NaCl. В) Профиль изменения значений химических сдвигов при изменении ионной силы раствора.

Для сравнения определенных из эксперимента значений $R1$ с расчетными из МД значениями $R1$, были проведены МД-расчеты длительностью 300 нс (температура 25°C, концентрация NaCl 20 и 100 mM соответственно). К сожалению, расчётные и экспериментальные значения $R1$ не показали хорошего соответствия (Рис.18.).

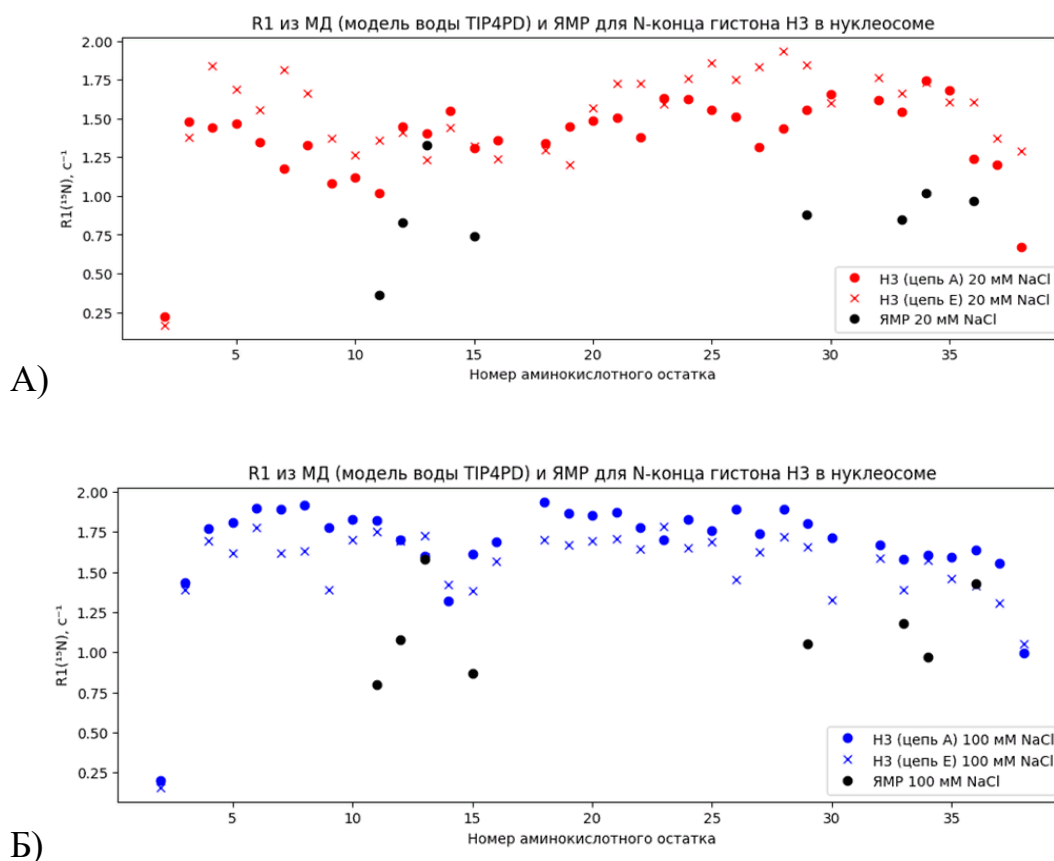


Рисунок 18. R1 из эксперимента ЯМР-спектроскопии и МД при различной концентрации NaCl в растворе.

Однако рассчитанные из МД параметры T1/T2 подтверждают гипотезу об ослаблении взаимодействий ДНК и гистоновых хвостов при повышении ионной силы раствора, приводящей к повышенной подвижности гистоновых хвостов (Рис.19). При этом, области наибольшего изменения T1/T2 (участки 9-13, 16-19) частично совпадают с областями с наибольшим изменением химических сдвигов из эксперимента (Рис.17В), а профиль значений T1/T2 вдоль аминокислотной последовательности при увеличении концентрации соли по форме выпрямляется, что может свидетельствовать об ослаблении электростатических взаимодействий, обеспечивающих разницу

конформационной динамики в рамках гистонового хвоста при более низкой ионной силе.

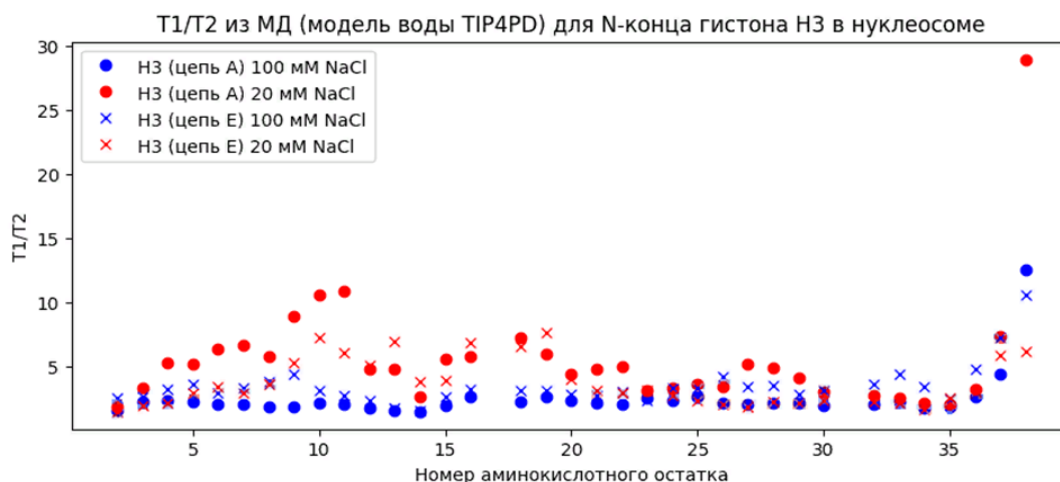


Рисунок 19. Изменение $T1/T2$ хвоста гистона H3.1, вызванное изменением ионной силы

Примечательно, что для остатков H3K15 и H3K24 (несмотря на положительный заряд) при изменении ионной силы раствора практически не меняется ни расчетное $T1/T2$, ни изменение химических сдвигов, тогда как для других положительно-заряженных остатков эти параметры изменяются. Этот факт является свидетельством гетерогенности взаимодействий разных частей гистонового хвоста с ДНК.

Наибольшее изменение локальной конформационной динамики при аминокислотных остатках аргининов может быть связано с особенностями взаимодействий этих аминокислотных остатков с ДНК и их склонностью располагаться в областях малой бороздки ДНК (Rohs et al., 2009). Возможно, за счёт увеличения ионной силы раствора позиционирование аргининов в этих областях оказывается менее вероятной, отчего мы

наблюдаем изменение химических сдвигов в этих участках и тенденцию увеличения их подвижности из данных молекулярного моделирования и ЯМР-спектроскопии.

Заключение

В результате работы была проведена и отработана методика получения мононуклеосом в препаративных количествах для изучения их структуры и динамики. Также были проведены эксперименты, по результатам которых была выдвинута гипотеза о возможности формирования гистоном H3.1 гомоолигомеров при сохранении конформационной подвижности N-конца.

По результатам работы были идентифицированы участки N-конца гистона H3 в составе нуклеосомы, конформационная динамика которых оказалась наиболее чувствительной к изменению ионной силы раствора. Предположительно, наибольшие изменения затрагивали аминокислотные остатки аргининов за счёт их специфики взаимодействия с нуклеосомной ДНК.

Выводы

1) Нуклеосомы на основе рекомбинантных гистонов человека (в том числе изотопно-меченных) и позиционирующих последовательностей ДНК Widom 601 и 603 могут быть получены *in vitro* в концентрации до 35 мкМ, что позволяет исследовать их структуру и динамику методами ЭМ, МУРР, ЯМР.

2) В ходе моделирования методами молекулярной динамики показано, что наблюдаемая подвижность гистоновых хвостов и ДНК зависит от используемых моделей воды. Модель воды TIP4P-D обеспечивает наиболее быструю динамику хвоста гистона H3. Использование модели воды TIP4P-D позволяет промоделировать откручивание и прикручивание ДНК в нуклеосоме опосредуемое хвостом гистона H3 на микросекундных временах.

3) С помощью методов ЯМР-спектроскопии показано, что свободный гистон H3.1, возможно, формирует гомоолигомеры, в которых его N-конец сохраняет высокую подвижность.

4) С помощью методов ЯМР-спектроскопии и молекулярной динамики показаны участки N-конца гистона H3, конформационная динамика которых наиболее чувствительна к изменению ионной силы раствора.

Благодарности

Автор выражает благодарность своим научным руководителям А.К. Шайтану и Г.А. Армееву, а также Шенкареву З.О., Федуловой А.С., Миронову П.А. и коллективу кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ.

Список литературы

1. Abraham M.J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J.C., Hess B., Lindahl E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers // *SoftwareX*. 2015. V. 1–2. P. 19–25.
2. Armeev G.A., Kniazeva A.S., Komarova G.A., Kirpichnikov M.P., Shaytan A.K. Histone dynamics mediate DNA unwrapping and sliding in nucleosomes // *Nat Commun*. 2021. V. 12. № 1. P. 2387.
3. 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 1.9Å Resolution // *Journal of Molecular Biology*. 2002. V. 319. № 5. P. 1097–1113.
4. Dyer P.N., Edayathumangalam R.S., White C.L., Bao Y., Chakravarthy S., Muthurajan U.M., Luger K. Reconstitution of Nucleosome Core Particles from Recombinant Histones and DNA // *Methods in Enzymology*. : Elsevier, 2003. P. 23–44.
5. Elathram N., Ackermann B.E., Clark E.T., Dunn S.R., Debelouchina G.T. Phosphorylated HP1 α –Nucleosome Interactions in Phase Separated Environments // *J. Am. Chem. Soc*. 2023. V. 145. № 44. P. 23994–24004.
6. Furukawa A., Wakamori M., Arimura Y., Ohtomo H., Tsunaka Y., Kurumizaka H., Umehara T., Nishimura Y. Acetylated histone H4 tail enhances histone H3 tail acetylation by altering their mutual dynamics in the nucleosome // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 2020. V. 117. № 33. P. 19661–19663.
7. Hoover W.G. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions // *Phys. Rev. A*. 1985. V. 31. № 3. P. 1695–1697.
8. Jennings C.E., Zoss C.J., Morrison E.A. Arginine anchor points govern H3 tail dynamics // *Front. Mol. Biosci*. 2023. V. 10. P. 1150400.
9. Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O.,

Tunyasuvunakool K., Bates R., Židek A., Potapenko A., Bridgland A., Meyer C., Kohl S.A.A., Ballard A.J., Cowie A., Romera-Paredes B., Nikolov S., Jain R., Adler J., et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold // *Nature*. 2021. V. 596. № 7873. P. 583–589.

10. Kim T.H., Nosella M.L., Bolik-Coulon N., Harkness R.W., Huang S.K., Kay L.E. Correlating histone acetylation with nucleosome core particle dynamics and function // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2023. V. 120. № 15. P. e2301063120.

11. Klinker H., Haas C., Harrer N., Becker P.B., Mueller-Planitz F. Rapid Purification of Recombinant Histones // *PLoS ONE*. 2014. V. 9. № 8. P. e104029.

12. Lu X., Simon M.D., Chodaparambil J.V., Hansen J.C., Shokat K.M., Luger K. The effect of H3K79 dimethylation and H4K20 trimethylation on nucleosome and chromatin structure // *Nat Struct Mol Biol*. 2008. V. 15. № 10. P. 1122–1124.

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. V. 389. № 6648. P. 251–260.

14. Maier J.A., Martinez C., Kasavajhala K., Wickstrom L., Hauser K.E., Simmerling C. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB // *J. Chem. Theory Comput*. 2015. V. 11. № 8. P. 3696–3713.

15. 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 // *Biophysical Journal*. 2018. V. 115. № 5. P. 773–781.

16. Millán-Zambrano G., Burton A., Bannister A.J., Schneider R. Histone post-translational modifications — cause and consequence of genome function // *Nat Rev Genet*. 2022. V. 23. № 9. P. 563–580.

17. Mirdita M., Schütze K., Moriwaki Y., Heo L., Ovchinnikov S., Steinegger M. ColabFold: making protein folding accessible to all // *Nat Methods*. 2022. V. 19. № 6. P. 679–682.

18. Morrison E.A., Bowerman S., Sylvers K.L., Wereszczynski J., Musselman C.A. The conformation of the histone H3 tail inhibits association of the BPTF PHD finger with the nucleosome // *eLife*. 2018. V. 7. P. e31481.
19. Morrison E.A., Baweja L., Poirier M.G., Wereszczynski J., Musselman C.A. Nucleosome composition regulates the histone H3 tail conformational ensemble and accessibility // *Nucleic Acids Research*. 2021. V. 49. № 8. P. 4750–4767.
20. Ohtomo H., Ito S., McKenzie N.J., Uckelmann M., Wakamori M., Ehara H., Furukawa A., Tsunaka Y., Shibata M., Sekine S., Umehara T., Davidovich C., Koseki H., Nishimura Y. H2A Ubiquitination Alters H3-tail Dynamics on Linker-DNA to Enhance H3K27 Methylation // *Journal of Molecular Biology*. 2023. V. 435. № 4. P. 167936.
21. Oleinikov P.D., Fedulova A.S., Armeev G.A., Motorin N.A., Singh-Palchevskaia L., Sivkina A.L., Feskin P.G., Glukhov G.S., Afonin D.A., Komarova G.A., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V., Shaytan A.K. Interactions of Nucleosomes with Acidic Patch-Binding Peptides: A Combined Structural Bioinformatics, Molecular Modeling, Fluorescence Polarization, and Single-Molecule FRET Study // *IJMS*. 2023. V. 24. № 20. P. 15194.
22. Parrinello M. and Rahman A. Collective effects in solids and liquids // *J. Chem. Phys.* 1982. V. 49. № 16. P. 2662-2666
23. Parrinello M. and Rahman A. Polymorphic Transitions in Single Crystals: A New Molecular Dynamics Method // *J. Appl. Phys.* 1981. V. 52. № 12. P. 7182-7190
24. Parrinello M. and Rahman A. Crystal structure and pair potentials: A molecular-dynamics study // *Phys. Rev. Lett.* 1980. V. 45. № 14. P. 1196-1200.
25. Peng Y., Li S., Landsman D., Panchenko A.R. Histone tails as signaling antennas of chromatin // *Current Opinion in Structural Biology*. 2021. V. 67. P. 153–160.
26. Piana S., Donchev A.G., Robustelli P., Shaw D.E. Water Dispersion Interactions Strongly Influence Simulated Structural Properties of Disordered Protein States // *J. Phys. Chem. B*. 2015. V. 119. № 16. P. 5113–5123.

27. Rabdano S.O., Shannon M.D., Izmailov S.A., Gonzalez Salguero N., Zandian M., Purusottam R.N., Poirier M.G., Skrynnikov N.R., Jaroniec C.P. Histone H4 Tails in Nucleosomes: a Fuzzy Interaction with DNA // *Angew Chem Int Ed*. 2021. V. 60. № 12. P. 6480–6487.
28. Rohs R., West S.M., Sosinsky A., Liu P., Mann R.S., Honig B. The role of DNA shape in protein–DNA recognition // *Nature*. 2009. V. 461. № 7268. P. 1248–1253.
29. Shaytan A.K., Armeev G.A., Goncarencu 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 // *Journal of Molecular Biology*. 2016. V. 428. № 1. P. 221–237.
30. Shi X., Prasanna C., Nagashima T., Yamazaki T., Pervushin K., Nordenskiöld L. Structure and Dynamics in the Nucleosome Revealed by Solid-State NMR // *Angew Chem Int Ed*. 2018. V. 57. № 31. P. 9734–9738.
31. Shi X., Prasanna C., Pervushin K., Nordenskiöld L. Solid-state NMR ¹³C, ¹⁵N assignments of human histone H3 in the nucleosome core particle // *Biomol NMR Assign*. 2020a. V. 14. № 1. P. 99–104.
32. Shi X., Prasanna C., Soman A., Pervushin K., Nordenskiöld L. Dynamic networks observed in the nucleosome core particles couple the histone globular domains with DNA // *Commun Biol*. 2020b. V. 3. № 1. P. 639.
33. Shi X., Kannaian B., Prasanna C., Soman A., Nordenskiöld L. Structural and dynamical investigation of histone H2B in well-hydrated nucleosome core particles by solid-state NMR // *Commun Biol*. 2023. V. 6. № 1. P. 672.
34. Tian C., Kasavajhala K., Belfon K.A.A., Raguet L., Huang H., Migués A.N., Bickel J., Wang Y., Pincay J., Wu Q., Simmerling C. ff19SB: Amino-Acid-Specific Protein Backbone Parameters Trained against Quantum Mechanics Energy Surfaces in Solution // *J. Chem. Theory Comput*. 2020. V. 16. № 1. P. 528–552.
35. Tokuda J.M., Pabit S.A., Pollack L. Protein–DNA and ion–DNA interactions

revealed through contrast variation SAXS // *Biophys Rev.* 2016. V. 8. № 2. P. 139–149.

36. Xiong Y., Shabane P.S., Onufriev A.V. Melting Points of OPC and OPC3 Water Models // *ACS Omega.* 2020. V. 5. № 39. P. 25087–25094.

37. Xu Y., Du J., Lau A.T.Y. Posttranslational modifications of human histone H3: An update // *Proteomics.* 2014. V. 14. № 17–18. P. 2047–2060.

38. Zandian M., Gonzalez Salguero N., Shannon M.D., Purusottam R.N., Theint T., Poirier M.G., Jaroniec C.P. Conformational Dynamics of Histone H3 Tails in Chromatin // *J. Phys. Chem. Lett.* 2021. V. 12. № 26. P. 6174–6181.

39. Zhao H., Wu H., Guseman A., Abeykoon D., Camara C.M., Dalal Y., Fushman D., Papoian G.A. The role of cryptic ancestral symmetry in histone folding mechanisms across Eukarya and Archaea // *PLoS Comput Biol.* 2024. V. 20. № 1. P. e1011721.

40. Zhou B.-R., Feng H., Ghirlando R., Kato H., Gruschus J., Bai Y. Histone H4 K16Q Mutation, an Acetylation Mimic, Causes Structural Disorder of Its N-Terminal Basic Patch in the Nucleosome // *Journal of Molecular Biology.* 2012. V. 421. № 1. P. 30–37.