

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. Ломоносова
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА БИОИНЖЕНЕРИИ

АРМЕЕВ ГРИГОРИЙ АЛЕКСЕЕВИЧ

**ИЗУЧЕНИЕ ПРИНЦИПОВ ФОРМИРОВАНИЯ НУКЛЕОСОМ
МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ**

**REVEALING PRINCIPLES OF NUCLEOSOME FORMATION VIA
MOLECULAR MODELING**

дипломная работа

Научный руководитель:

к.ф-м.н. А.К. Шайтан

рецензент:

к.х.н. А.В.Головин

Москва, 2014

Аннотация

Работа посвящена изучению принципов устройства и формирования нуклеосом с помощью молекулярного моделирования. Проводится обзор литературных источников по объекту исследования – нуклеосомам. Производится описание теоретических основ компьютерного молекулярного моделирования методом молекулярной динамики, а так же методов расчета электростатических характеристик молекулярных систем. В работе производится полноатомное моделирование нуклеосомы в явном растворителе в силовом поле AMBER 99 BSC0 на временном промежутке 1 мкс. Производится ковариационный анализ траектории молекулярной системы с последующим исследованием обнаруженных коллективных движений. Предлагается метод, позволяющий вычислять распределения физических величин в объеме расчетной ячейки вокруг дрейфующей макромолекулы. Определяется распределение молекул воды в системе, предполагается роль внутринуклеосомальной воды. Определяется распределение одновалентных ионов в системе, выявляются места предпочтительного нахождения ионов, предлагается функция, выполняемая ионами, окружающими нуклеосомы. Рассматривается распределение электростатического потенциала вокруг нуклеосомы.

Список сокращений

МД – молекулярная динамика

Н.П. – нуклеотидная пара

ПТМ – посттрансляционные модификации

ФАСТ - хроматин-ремоделирующий фактор (facilitates chromatin transcription)

FRET - Ферстеровский резонансный перенос энергии

Содержание

1	Введение	5
1.1	Постановка задачи	7
1.1.1	Цель работы	7
1.1.2	Задачи:	7
2	Обзор литературы	8
2.1	Нуклеосома – структурная единица хроматина	8
2.2	Нуклеосома – динамическая структура	12
2.3	Физические свойства нуклеосом	14
2.3.1	Энергия гистон-гистоновых взаимодействий	14
2.3.2	Энергия ДНК-гистоновых взаимодействий.	15
2.4	Позиционирование нуклеосом на ДНК	17
2.4.1	Роль механических свойств ДНК в позиционировании нуклеосом. .	18
2.5	Вода и ионы в нуклеосоме.	19
2.6	Транскрипция сквозь нуклеосомы	20
2.6.1	Влияние посттрансляционных модификаций на транскрипцию.	21
3	Методы	23
3.1	Метод молекулярной динамики	23
3.2	Применение методов МД к моделированию нуклеосом	25
3.3	Методы расчета электростатических характеристик нуклеосом	28
4	Результаты и обсуждение	30
4.1	Моделирование нуклеосомы	30
4.2	Подвижность ДНК в нуклеосоме.	32
4.3	Ковариационный анализ	35

4.4	Вода в нуклеосоме.....	38
4.5	Ионы в нуклеосоме.....	41
4.6	Распределение электростатического потенциала.....	44
5	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	47
6	Приложение.....	50
7	Список литературы.....	51

1 Введение

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 этого доступа – основные функции хроматина. На первом этапе компактизации ДНК наибольшее значение играет взаимодействие ДНК с белками – гистонами и формирование нуклеосом. Понимание структуры нуклеосом и организации взаимодействий в нуклеосомах является важным этапом на пути изучения структуры и динамики хроматина.

Структура нуклеосом долгое время после их открытия (1974 г.) оставалась неясной, было построено множество моделей, от близких к современным представлениям до довольно экстравагантных. Дебаты по поводу структуры продолжались вплоть до 1997 года, когда была определена методами рентгеновской кристаллографии первая структура нуклеосомы в атомарном разрешении (Luger, et al., 1997). Рост количества разрешенных кристаллических структур стимулировал рост количества исследований проводимых в данной области. Долгое время полученные структуры рассматривались как конечное и основное конформационное состояние нуклеосомы, однако поскольку в условиях кристалла система может находиться лишь в одном из устойчивых состояний, совместимых с кристаллической упаковкой, в настоящее время активно обсуждается представление о нуклеосоме, как о динамической единице (Zlatanova, et al., 2009). Малые размеры нуклеосом затрудняют их исследование экспериментальными методами, молекулярное моделирование позволяет взглянуть на организацию изнутри, с атомистического уровня.

Понимание принципов работы хроматина – следующая большая задача молекулярной биологии, сравнимая с задачей расшифровки генома. На уровне нуклеосом осуществляется большое количество различных механизмов регуляции экспрессии генов. Один из таких механизмов – так называемый нуклеосомальный

барьер (Studitsky, et al., 2004). При приближении РНК полимеразы, нуклеосома должна претерпевать конформационные изменения, для того чтобы сделать ДНК доступной. В частности, известны мутации (SIN мутанты), которые облегчают транскрипцию. Различные последовательности имеют разное сродство к гистонам, модулируя вероятность прохождения полимеразы. Понимание связанных с нуклеосомами механизмов регуляции транскрипции на атомистическом уровне – одна из задач молекулярного моделирования. Нуклеосомы взаимодействуют не только с полимеразой, многие факторы транскрипции (к примеру, p53 – супрессор образования опухолей), а также многие вспомогательные белки транскрипции (например, FACT) связываются с нуклеосомами. Понимание механизмов действия этих белков является ключевым для определения механизмов регуляции транскрипции. Регуляция и модификация белков, взаимодействующих с нуклеосомами может быть использована в терапевтических целях для лечения онкологических заболеваний. Поэтому изучение структуры, энергетики, динамики нуклеосом является первым шагом к пониманию более сложных взаимодействий, регулирующих транскрипцию.

Изучение межмолекулярных взаимодействий на атомистическом уровне и понимание энергетики данных взаимодействий, их функциональной значимости является одной из основных задач молекулярной биологии. В последнее время в комплексе методов исследований наравне с традиционными экспериментальными методами (включая рентгеновскую кристаллографию, FRET, футпринтинг, ChIP-Seq, различными методами анализа скорости транскрипции и другие) важную роль стали играть методы структурного и динамического компьютерного моделирования. В частности, метод молекулярной динамики рассматривается как своеобразный «вычислительный микроскоп» (Dror, et al., 2012). На основе «замороженных» структур биомакромолекул, получаемых методами рентгеновской кристаллографии, молекулярная динамика (МД) позволяет построить динамическую модель, исследовать ее движения и конформационные изменения. Методы кристаллографии не лишены неточностей, связанных с плотной упаковкой и отбором конформеров, совместимых с этой упаковкой. Также следует отметить, что МД позволяет решать

такие задачи, как исследование распределения ионов и воды вокруг биомолекул, которые с трудом решаются методами кристаллографии.

Применение методов компьютерного моделирования, в частности, МД представляется перспективным для изучения нуклеосом, так как они являются динамическими структурами – имеют мобильные хвосты, обратимо связывают ДНК и характеризуются внутренней подвижностью. Изучение таких динамических особенностей экспериментальными методами является проблематичным, хотя последние успехи в SP FRET (Ферстеровском резонансном переносе энергии в пределах одной частицы) позволяют комбинировать данные моделирования и FRET.

1.1 Постановка задачи

1.1.1 Цель работы

Создать полноатомную МД модель пригодную для дальнейших исследований, определить структурные и динамические характеристики нуклеосом методом молекулярного моделирования, определить роль растворителя и ионного окружения в формировании структуры нуклеосом, оценить вклад электрических взаимодействий в определение свойств нуклеосом.

1.1.2 Задачи:

- Создать уравновешенные модели нуклеосом в явном растворителе.
- Получить устойчивые на всем времени симуляции модельные системы нуклеосом в воде.
- Исследовать подвижность нуклеосом и гистонных комплексов, классифицировать полученные моды движений, определить их назначение.
- Исследовать распределение воды и ионов в составе нуклеосомы, оценить их роль в определении свойств нуклеосом.
- Исследовать распределение электростатического потенциала вокруг нуклеосом.

2 Обзор литературы

2.1 Нуклеосома – структурная единица хроматина

Изучение природы нуклеосом, их устройства и принципов организации было сильно облегчено благодаря результатам рентгеноструктурного анализа. Первая точная структура нуклеосомы была получена в 1997 году в работе (Luger, et al., 1997). На данный момент в базе данных PDB находится более 80 различных структур нуклеосом в атомарном разрешении, включающих различные гистоновые варианты, мутантные формы (например, мутанты, влияющие на транскрипцию), комплексы с транскрипционными и другими факторами, посттрансляционными модификациями и разнообразными последовательностями ДНК.

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 с соединяющими соседние нуклеосомы линкерными участками ДНК. Нуклеосому, содержащую гистон H1, называют хроматосомой. Далее по тексту термины нуклеосома и ядро нуклеосомной частицы следует считать синонимичными.

Нуклеосома представляет собой октамер белков гистонов, который несет на себе 145-147 нуклеотидных пар. ДНК закручена вокруг гистонного октамера, образуя 1,65 витка левозакрученной суперспирали, то есть ДНК отрицательно сверхспирализована. Белковое ядро нуклеосомы образует цилиндр диаметром 65 Å и высотой 60 Å (рисунок 1). Для нуклеосомы характерна ось псевдосимметрии – диадная ось, интересно, что в большинстве известных структур с нечетным количеством нуклеотидов центральная нуклеотидная пара ДНК лежит на диадной оси (коды PDB 1kx5, 3lz0, 3ut9), и в случае четного количества нуклеотидов ДНК либо частично сдвигается в сторону (код PDB 3av2) либо деформируется с удлинением небольшого участка (1aoi).

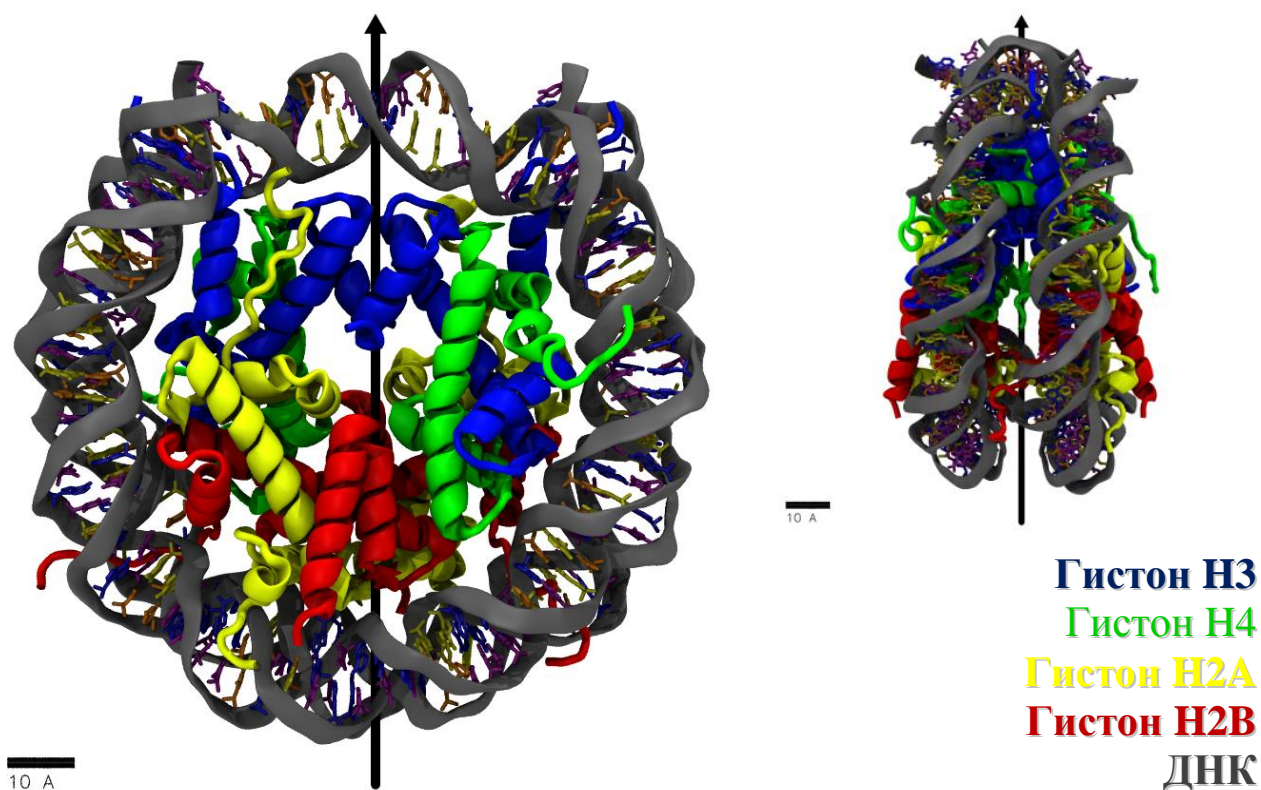


Рисунок 1 Визуализация нуклеосомы, 147 н.п., ДНК и белок отображены в виде вторичной структуры. Визуализация построена по структуре с кодом 1KX5 банка данных PDB (Davey, et al., 2002). Слева направо вид спереди и вид сбоку, стрелкой показана диадная ось.

В ядро нуклеосомы входит четыре семейства гистонов H3 и H4 (их называют коровыми гистонами), H2A и H2B, каждый из гистонов представлен дважды. 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 (Talbert, et al., 2012), находящихся в так называемых гистоновых кластерах. Кластеризация генов, вероятно, является одним из механизмов позволяющих сохранить их от мутаций.

Для всех гистонов характерно типовое устройство третичной структуры (Рисунок 2а) - «гистоновый фолд» (histone fold), которое выглядит следующим

образом: α -спираль1($\alpha 1$)-петля1(L1)- α -спираль2($\alpha 2$)-петля2(L2) - α -спираль3($\alpha 3$), к фолду могут прикрепляться дополнительные спирали, характерные для конкретного типа гистона, например, гистон H3 содержит N-концевую α -спираль (αN), H2B – C-концевую α -спираль, H2A содержит на C конце малую α -спираль и петлю, которые вместе формируют «докинг домен» (docking domain).

Димеризация гистонов происходит с образованием мотива «рукопожатия» (handshake motif), $\alpha 2$ -спирали которой лежат антипараллельно друг другу, а L1 и L2 петли формируют небольшие β -листы. Димеры гистонов содержат ось псевдосимметрии, которая проходит сквозь центр $\alpha 2$ -спиралей.

При формировании октамера, димеры гистонов образуют структуры, называемые четырехспиральными контактами (four helix bundle), которые показаны на рисунке 2б, всего в нуклеосоме содержится три таких структуры: одна между гистонами H3 и две между гистонами H4 и H2B. Октамер гистонов содержит в своем центре свободное пространство, которое называют нуклеосомной порой. Гистонный состав нуклеосом не постоянен, например, в активно транскрибируемых генах происходит постоянный обмен димерами гистонов H2A-H2B (Studitsky, et al., 1995, Thiriet and Hayes, 2005), а при формировании 30 нм фибриллы к нуклеосомам присоединяется гистон H1.

а)

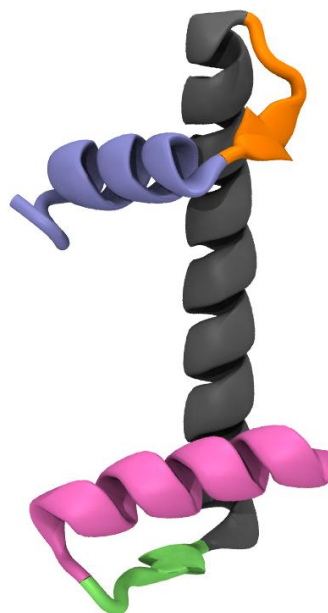
α -спираль 1

петля 1

α -спираль 2

петля 2

α -спираль 3



б)

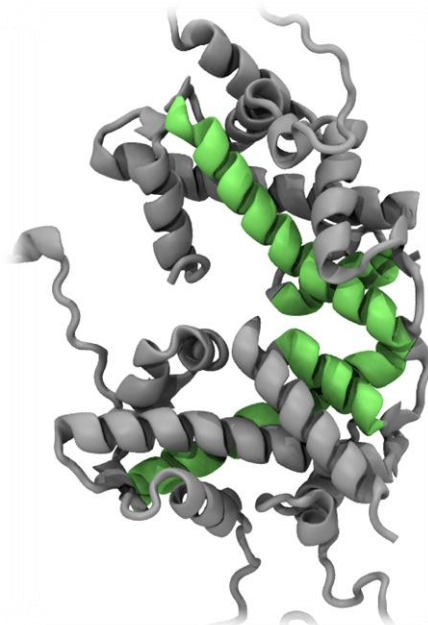


Рисунок 2 Визуализация третичной структуры характерных гистоновых укладок. а) Гистоновый мотив, цветом показаны элементы мотива. б) Четырехспиральный контакт, зеленым цветом показаны спирали, участвующие в образовании контакта.

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. Формирование сайтов связывания с ДНК обеспечено L1 L2 цепями и концевым участком контакта $\alpha 1-\alpha 1$. Каждый димер гистонов координирует на себя 2,5 витка спирали ДНК, которая огибает его, формируя арку с углом раствора 140° . Связывание ДНК происходит за счет следующих группировок атомов:

1. N-концевые участки $\alpha 1$ спиралей гистонов H3, H4 и H2B, а так же $\alpha 2$ спирали коровых (H3-H4) гистонов фиксируют на себе по одной фосфатной группировке ДНК при помощи положительного заряда, наведенного дипольными моментами на концы спиралей.
2. Между кислородами в фосфатных группировках ДНК и азотами из амидных группировок аминокислотного остова, а так же гидроксильными радикалами формируются водородные связи.

Преимущественно в этом участвуют последний и предпоследний витки $\alpha 1$ и $\alpha 2$ спиралей.

3. Боковые цепи аргининов из структурированных доменов гистонов входят в малую бороздку ДНК в 10 из 14 контактов в структурированных участках белков, в остальных четырех случаях, в малой бороздке находится боковая цепь аргинина из неструктурированных участков гистонов H3 и H2B.
4. Связи с гистонами образуются за счет взаимодействий неполярных аминокислот с дезоксирибозными кольцами ДНК.
5. Участки ДНК на выходах из нуклеосомы дополнительно фиксированы αN спиралью гистона H3.

Сборка нуклеосом в живой клетке происходит при помощи сложной системы белков – шаперонов (Burgess and Zhang, 2013), которые также могут быть специфичны для различных вариантов гистонов. Нуклеосомы – первый уровень компактизации хроматина, на следующем этапе при участии гистона H1 (или H5) формируется 30 нм фибрилла, которая стабилизируется межгистонными взаимодействиями.

2.2 Нуклеосома – динамическая структура

Гистоны способны формировать не только нуклеосомы, но и другие комплексы с ДНК, при сборке нуклеосом *in vitro* можно получить набор интермедиатов нуклеосом, таких как тетрасомы и гексасомы (Zlatanova, et al., 2009) (Рисунок 3 сверху). Структура гексасомы была рассчитана методом молекулярной динамики в работе (Армеев, et al., 2013), где для создания структуры гексасомы, удалялся один из димеров гистонов H2A-H2B, после чего часть ДНК отворачивалась от гексамера гистонов. Хроматин в ядрах подвергается постоянной перестройке, по всей видимости, в живой клетке так же содержатся некоторые количества нуклеосомных интермедиатов.

Нуклеосома – подвижная структура, которой свойственны как высокочастотные тепловые движения, так и крупномасштабные конформационные переходы. Исходя из распределения В-факторов в кристаллических структурах, подвижность ДНК

значительно выше, нежели подвижность белковой составляющей нуклеосомы. В то же время находящиеся в малых бороздках ДНК аргинины препятствуют скольжению нити ДНК на гистонах, ограничивая ее мобильность (Biswas, et al., 2013).

Масштабную подвижность нуклеосом классифицируют на «дыхание» (breathing), разматывание ДНК (unwinding) и раскрытие (gaping) (Zlatanova, et al., 2009). Первые два типа конформационной подвижности описывают частичную диссоциацию ДНК от гистонов (Рисунок 3 снизу), под «дыханием» понимают симметричное разматывание ДНК. Такие движения потенциально облегчают входение полимераз в нуклеосому и показаны экспериментально (Tomschik, et al., 2009). Известно, что раскручивание и «дыхание» нуклеосомы в присутствии фактора перестройки хроматина FACT (*facilitates chromatin transcription*) приводит к стабилизации «раскрытых» состояний, повышая доступность нуклеосом для полимераз (Hondele and Ladurner, 2013). Третье движение – раскрытие было предсказано теоретически. Полагается, что такой тип движений может играть роль в определении плотности упаковки 30 нм фибриллы при коллективном движении всех нуклеосом (Mozziconacci and Victor, 2003).



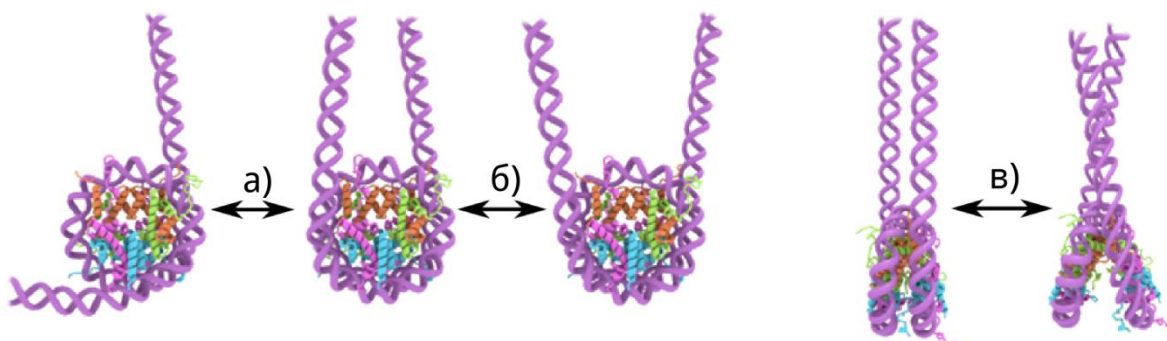


Рисунок 3 Сверху - визуализация модели нуклеосомы и ее интермедиатов. Слева на право: нуклеосома, гексасома, тетрасома. Снизу - модель движений в нуклеосоме. а) раскручивание б) “Дыхание” и) открывание.

2.3 Физические свойства нуклеосом

Одним из свидетельств в пользу того, что для нуклеосом характерна сложная иерархия взаимодействий, является тот факт, что нуклеосомы не способны к спонтанной сборке при физиологической ионной силе, отчасти это происходит из-за того, что при такой концентрации соли гистоны не специфически взаимодействуют с ДНК. Тем не менее, искусственная сборка нуклеосом возможна, существуют протоколы для сборки нуклеосом *in vitro* как при помощи вспомогательных шаперонов (Andrews and Luger, 2011), так и путем диализа – медленного изменения ионной силы. Благодаря тому, что при высоких концентрациях соли тетрамер гистонов H3-H4 способен связываться с ДНК, а димеры – нет, сборка происходит при длительном диализе 2М раствора NaCl против 0,25 М раствора соли. Изначально, в растворе содержатся тетрамеры гистонов H3-H4, димеры H2A-H2B и ДНК. Примечательно, что собранная нуклеосома способна существовать при 2М растворе соли, но, по всей видимости, она менее стабильна, чем тетрамер гистонов H3-H4 в тех же условиях.

2.3.1 Энергия гистон-гистоновых взаимодействий

Отдельные компоненты нуклеосом способны к существованию в растворах с ДНК, например, димер H2A-H2B стабилен в 200 мМ растворе KCl, обработка димера гуанидинхлоридом приводит к одностадийной денатурации до бесструктурных цепей, с энергией перехода 17 ккал/моль (Banks and Gloss, 2003). При этом гистоны H3-H4 в

200 мМ KCl представлены смесью тетрамера, димеров и иных частично денатурированных комплексов. Увеличение ионной силы до 1,5 М KCl, как и обработка ТМАО (триметиламинооксидом), сдвигает равновесие в сторону тетрамерной формы. Денатурация тетрамера гуанидинхлоридом в присутствии 1 М ТМАО происходит в две стадии: первый этап – распад тетрамера на два димера Н3-Н4 с энергией перехода 10 ккал/моль, второй этап – разложение димера с энергией перехода 12,4 ккал/моль (энергия завышена из-за присутствия ТМАО). Различие в устойчивости димеров связано со структурными отличиями (Banks and Gloss, 2003). Существует гипотеза, что относительно низкая стабильность тетрамера Н3-Н4 играет функциональную роль в способности нуклеосомы по-разному связывать ДНК с разной последовательностью. Обрезка длинных положительно заряженных гистоновых хвостов приводит к незначительному понижению свободной энергии диссоциации димера Н3-Н4 (11,7 ккал/моль), что говорит о том, что гистонные хвосты не принимают непосредственного участия в формировании белковой компоненты нуклеосом (Banks and Gloss, 2003).

2.3.2 Энергия ДНК-гистоновых взаимодействий.

Оценку связывания ДНК с гистонами можно произвести двумя путями: путем измерения доступности ДНК для обработки эндонуклеазами и путем разворачивания единичных нуклеосом или их цепочек.

Первые эксперименты, измеряющие доступность ДНК путем обработки эндонуклеазами были произведены в работе (Polach and Widom, 1995). Было показано, что равновесная константа частичной диссоциации ДНК (вероятности отматывания ДНК до определенного уровня в нуклеосоме) падает по направлению от входа в нуклеосому к центру. Такое поведение свидетельствует в пользу гипотезы о том, что доступ к внутреннему витку ДНК происходит путем постепенного отматывания внешней петли ДНК от поверхности октамера (Anderson and Widom, 2000). Константа диссоциации для последовательности «601.2» (см. раздел позиционирование нуклеосом) изменяется вдоль последовательности от 10^{-6} до 10^{-4} при комнатной температуре, в то время, как для гена 5S РНК морского ежа (*Parechinus angulosus*)

диапазон значений находится в промежутке 10^{-5} до 10^{-2} . Эти значения позволяют оценить энергию связывания ДНК с гистонами как 8,5 ккал/моль и 7 ккал/моль для «601.2» и 5S последовательностей соответственно. Данные энергии отвечают за отделение половины всей ДНК от нуклеосомы, для оценки полной энергии связывания ДНК с нуклеосомой, энергии должны быть удвоены (Kulić and Schiessel, 2004).

ДНК-гистоновые взаимодействия могут быть экспериментально оценены путем растягивания нуклеосом или их цепочек при помощи оптического или магнитного пинцета (Mack, et al., 2012). Оптический пинцет позволяет измерять весьма малые силы, действующие на ДНК. Диэлектрическую нанометровую бусину закрепляют на конце ДНК, второй конец фиксируют на предметном стекле. При равномерном движении предметного столика, по смещению бляшки можно измерять мгновенную силу, действующую на конец ДНК. Магнитный пинцет позволяет закручивать ДНК, путем прикрепления на один из концов магнитной бусины, которая вращается в переменном магнитном поле. Второй конец ДНК закрепляют на кантилевере атомно-силового микроскопа и снимают силовую кривую. Методы широко распространились, с их помощью было произведено сравнение свойств разнообразных вариантов нуклеосом, мутантов (например SIN мутант (Mack, et al., 2012), влияющий на транскрипцию) и посттрансляционных модификаций (Brower-Toland, et al., 2005). В одной из первых работ (Brower-Toland, et al., 2002) по растягиванию нуклеосом было показано, что при приложении силы, ДНК удлиняется ступенчато, такое поведение укладывается в трехстадийную модель: в начале воздействия, внешний виток ДНК может быть обратимо отделен, дальнейшее удлинение требует преодоления энергетического барьера и приводит к необратимому скручиванию внутреннего витка ДНК, на последней стадии октамер полностью отделяется от ДНК. Интересно, что кривые зависимости сила-растяжение сохраняют форму даже если гистоны в октамере были ковалентно сшиты, таким образом процесс отделения ДНК от гистонов, по всей видимости, не связан с процессом разборки нуклеосомы на димеры. В то же время, молекулярно-динамические исследования показали, что быстрое растяжение

нуклеосомы приводит к диссоциации гистонов друг от друга (Ettig, et al., 2011).

Одним из возможных объяснений наличия барьера для отделения внутренней петли ДНК являются специфические взаимодействия ДНК с октамером в позиции +36 - +46 относительно диадной оси (Brower-Toland, et al., 2002) (Luger and Richmond, 1998). Тем не менее, такое поведение можно объяснить в рамках простой физической модели (Kulić and Schiessel, 2004) если представить, что такое поведение объясняется влиянием двух факторов: отталкиванием витков ДНК в нуклеосоме, которое исчезает при снятии внешнего витка, снижая энергию адсорбции внешнего относительно внутреннего и натяжением ДНК без снятия (Mack, et al., 2012). Интересно, что поведение нуклеосом при растяжении зависит от условий, в которых оно производилось: в условиях низкой концентрации хроматина, растяжение вызывает последовательное высвобождение гистона H1, а затем и H2A-H2B димера. Данный эффект скорее всего связан диссоциацией октамеров свободных от ДНК на составляющие компоненты, чем с механическим отделением димеров при растягивании ДНК (Claudet, et al., 2005). Ацетилирование N-концевых доменов гистонов приводит к уменьшению силы, необходимой для силового разворачивания нуклеосом, что объясняется значительным снижением числа зарядовых взаимодействий ДНК-гистоны.

2.4 Позиционирование нуклеосом на ДНК

Как отмечалось выше, преимущественное взаимодействие ДНК с гистонами происходит при помощи фосфатных группировок ДНК, при этом прямого считывания последовательности не происходит, и гистоны взаимодействуют с ДНК неспецифично. Однако существует эффект непрямого считывания, что видно из разницы энергий связывания ($\Delta\Delta G$) для различных последовательностей, некоторые последовательности ДНК связываются с гистонами предпочтительнее. Существует метод для оценки $\Delta\Delta G$ сборки нуклеосом на разных последовательностях ДНК. Метод заключался в том, что радиоактивно-меченый фрагмент ДНК с известной последовательностью вместе с ДНК со случайной последовательностью инкубируют при высокой концентрации соли с ограниченным количеством гистонных октамеров.

После диализа против 0,1 М раствора соли, разницу между долей меченой и случайной ДНК в составе нуклеосом используют для расчета $\Delta\Delta G$ последовательности. (Shrader and Crothers, 1989) (Andrews and Luger, 2011).

Для поиска последовательности, связывающейся с гистонами наилучшим образом, использовали метод SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) для сканирования библиотеки случайных последовательностей ДНК размером 5×10^{12} . В качестве эталонной последовательности использовали хорошо изученную последовательность из гена рибосомальной (5S) РНК морского ежа (*Parechinus angulosus*). По результатам сканирования были выявлены последовательности с высокой энергией связывания до 2,9 ккал/моль, наиболее аффинной последовательностью являлась «601» последовательность. Несмотря на большой размер библиотеки последовательностей, реальное количество возможных последовательностей более чем на 100 порядков выше, таким образом, весьма вероятно, существуют другие более аффинные последовательности (Lowary and Widom, 1998). Последовательности из теломерных участков хромосом показали наименьшее сродство, наиболее строго позиционирующиеся последовательности отличаются от них энергией связывания на 7 ккал/моль. Такой разброс энергий, похоже, занижен, так как в библиотеку последовательностей не входили поли-ГЦ и поли-АТ богатые участки, известные слабыми взаимодействиями с гистонами. Несмотря на споры о том, что значение диапазона энергий связывания занижено из-за условий сборки нуклеосом, текущая оценка диапазона для всех возможных последовательностей равна примерно 0,5 ккал/моль на один сайт связывания гистонов с ДНК, что эквивалентно энергии одной слабой водородной связи. Таким образом, стабильность комплекса ДНК-гистоны, зависит от множества взаимодействий, и даже одна молекула воды способна внести в нее существенный вклад. Не все сайты взаимодействия равнозначны, так, к примеру, сайты связывания тетрамера Н3-Н4 с геном 5S прочнее, чем сайты на димерах Н2А-Н2В (Davey, et al., 2002).

2.4.1 Роль механических свойств ДНК в позиционировании нуклеосом.

Существуют сведения, что изгиб ДНК происходит по определенным

динуклеотидам, однако, этот вопрос находится в стадии активного обсуждения. Сведения, полученные разными научными группами, противоречат друг другу (Trifonov, 2011, Zhurkin, 2011).

Принято считать, что зависимость энергии связывания от последовательности ДНК объясняется не разницей в организации взаимодействий с нуклеотидными парами (так называемое, прямое считывание, характерное для факторов транскрипции) в сайтах связывания (где практически отсутствуют специфические взаимодействия с азотистыми основаниями), а изменением конформационной энергии суперспирали ДНК. Существует также предположение, что последовательности, отобранные на основании наилучшей адаптации к конфигурации суперспирали ДНК в нуклеосоме, склонны к максимизации количества прямых взаимодействий в сайтах связывания за счет вытеснения молекул воды, участвующих в образовании водородных связей. Такая замена не приведет к значительному изменению энергии взаимодействия в сайте связывания, но освобожденная в растворитель молекула воды приведет к выигрышу по энтропии (Davey, et al., 2002).

2.5 Вода и ионы в нуклеосоме.

Из кристаллической структуры нуклеосом видно, что в ее состав входит большое число молекул воды, особенно интересно наличие воды на интерфейсе октамер-ДНК. Всего в кристаллической структуре нуклеосомы содержится 121 молекула воды, опосредующей взаимодействия гистонов и ДНК путем образования водородных связей. Наличие такой оболочки играет адаптерную роль, позволяя координировать ДНК в различных конформациях, тем самым повышая ее доступность и снижая влияние последовательности нуклеотидов на позиционирование ДНК. В работе (Materese, et al., 2009) было показано, что нуклеосома содержит в себе больше тысячи молекул воды, которые позволяют ионам глубоко проникать в гистонный комплекс.

Известно, что двухвалентные катионы способствуют компактизации хроматина. В кристаллической структуре были определены места связывания ионов марганца. Марганец, ассоциированный с гистонами находится на поверхности между

нуклеосомами, организуя их взаимодействия в кристалле. 13 остальных ионов марганца скоординированы в большей бороздке ДНК, преимущественно в районе GG и GC динуклеотидов (Davey and Richmond, 2002), вероятно, экранируя заряды ДНК на соседних нуклеосомах, позволяя повысить плотность упаковки кристалла.

2.6 Транскрипция сквозь нуклеосомы

Компактизация хроматина – одна из важнейших функций нуклеосом, но, помимо хранения ДНК, нуклеосомы должны оставлять возможность для транскрипции генов. Известно, что существует, по крайней мере, два механизма прохождения РНК полимераз сквозь нуклеосомы.

РНК полимеразы III работают на активно транскрибируемых генах, преимущественно несущих последовательности самостоятельных РНК, таких как рибосомальные. Механизм транскрипции, осуществляемой при помощи РНК полимеразы III, подразумевает скидывание всех гистонов с ДНК во время прохождения фермента по нити, после завершения транскрипции нуклеосомы восстанавливаются заново (Studitsky, et al., 1997). Такой механизм обеспечивает обмен всех гистонов и не позволяет модифицированными гистонам H3 и H4 оставаться на одних и тех же участках гена.

РНК полимеразы II транскрибируют последовательности генов, которые кодируют белки. Транскрипция, осуществляемая РНК полимеразой II, происходит иначе: фермент достигает определенного положения на нуклеосоме (39 или 49 азотистых оснований от входа в нуклеосому), затем происходит диссоциация дистального конца ДНК (около 50 н.п.) и дистального димера гистонов H2A-H2B, что облегчает дальнейшее прохождение полимеразы по нуклеосоме (Kulaeva, et al., 2009). После того, как полимеразы покинет получившуюся гексасому, гистоны H2A-H2B возвращаются назад, дополняя комплекс до нуклеосомы.

В сохранении гистонов, ассоциированных с определенным геном, видится глубокий биологический смысл. Так как вероятность прохождения РНК полимеразы зависит от прочности связывания ДНК с гистонами (следовательно, от гистоновых вариантов, последовательности ДНК и ПТМ), сохранение позиций нуклеосом

обеспечивает дополнительный контроль над уровнем экспрессии генов. Таким образом, нуклеосомы формируют так называемый «гистонный код», который не теряется при умеренной экспрессии генов.

2.6.1 Влияние посттрансляционных модификаций на транскрипцию.

ПТМ гистонов способны модулировать поведение нуклеосом во время транскрипции, часть возможных модификаций показана на рисунке 4.

Предполагается два основных механизма действия гистоновых ПТМ, которые, по всей видимости, не являются взаимоисключающими. Первый – цис механизм приводит к прямому изменению взаимодействий между ДНК и гистонами. Примерами таких модификаций являются ацетилирование лизинов и аргининов в гистоновых хвостах, что приведет к частичной потере положительного заряда на гистонах и как следствие снижению аффинности гистонов к ДНК, облегчая транскрипцию. Второй – транс механизм предполагает, что ПТМ опознаются специальными факторами негистоновой природы, которые либо сами по себе изменяют структуру хроматина, либо делают это опосредованно через другие факторы (Mack, et al., 2012).

Влияние ПТМ на процесс транскрипции может быть опосредованно изменением конформации нуклеосомы. Так, при помощи электронной микроскопии было показано, что гиперацетилированные нуклеосомы теряют свою форму, удлиняясь при адсорбции на сетках при малой ионной силе. Позже при помощи атомно-силовой микроскопии было показано значительное уменьшение жесткости нуклеосом в ответ на гиперацетилирование. Подобное поведение можно объяснить переходом нуклеосомы в состояние расплавленной глобулы, которое характеризуется нативной вторичной структурой, но отличается разобщенной третичной структурой и меньшей плотностью упаковки белка (Marino-Ramirez, et al., 2005).

Структура нуклеосомы (PDB код 1KX5)



ПТМ гистонов

H2A	H2B	H3	H4
H2AS1ph	H2BK5ac	H3R2me1	H4S1ph
H2AR3me2	H2BK5me1	H3R2me2	H4R3me1
H2AR3ci	H2BK12ac	H3R2ci	H4R3me2
H2AK5ac	H2BS14ph	H3T3ph	H4R3ci
H2AK9ac	H2BK15ac	H3K4ac	H4K5ac
H2AK9bio	H2BK16ac	H3K4me1	H4K8ac
H2AK13bio	H2BK20ac	H3K4me2	H4K8bio
H2AK13ar	H2BK30ar	H3K4me3	H4K12ac
H2AK119ub	H2BK46ac	H3S6ph	H4K12bio
H2AT120ph	H2BK120ac	H3T6ph	H4K16ac
H2AK121ub	H2BK120ub	H3R8ci	H4K16ar
H2AK125bio		H3K9ac	H4K20me1
H2AK127bio		H3K9me1	H4K20me2
H2AK129bio		H3K9me2	H4K20me3
H2AS137ph		H3K9me3	H4K91ac
H2AS139ph		H3K9bio	H4K91ub
H2AY142ph		H3S10ph	
		H3T11ph	
		H3K14ac	
		H3R17me1	
		H3R17me2	
		H3R17ci	
		H3K18ac	
		H3K18bio	
		H3K23ac	
		H3R26me1	
		H3R26ci	
		H3K27ac	
		H3K27me1	
		H3K27me2	
		H3K27me3	
		H3K27ar	
		H3S28ph	
		H3S31ph	
		H3K36ac	
		H3K36me3	
		H3K36me1	
		H3K36me2	
		H3K37ar	
		H3Y41ph	
		H3T45ph	
		H3K56ac	
		H3K79me1	
		H3K79me2	
		H3K79me3	

Рисунок 4 Визуализация набора гистоновых модификаций. Сферами разных цветов показаны сайты внесения модификации, цветовой код указан на рисунке и соответствует названию модификации.

3 Методы

3.1 Метод молекулярной динамики

Для исследования нуклеосом и их интермедиатов использовался метод молекулярной динамики. При исследовании молекулярных систем данным методом молекулы описываются моделями классической механики. Набор констант взаимодействий и способ описания молекул через законы классической механики называется силовым полем. Существует множество классических и полуклассических силовых полей, которые отличаются классами соединений, для которых они были созданы, хотя созданы и генерализованные силовые поля (такие как MMFF), способные к описанию 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. (Allen and Tildesley, 1989, Frenkel and Smit, 2001)

Межмолекулярные взаимодействия представляются в виде парных взаимодействий между атомами с потенциалами Леннард-Джонса и Кулона:

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

Взаимодействия внутри молекул описываются как парными, так и внутримолекулярными потенциалами:

$$U_{\text{связей}} = U_{\text{связь}} + U_{\text{угол}} + U_{\text{торсион}} + U_{\text{ложноторсион}}$$

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 (двухгранные) 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. Несмотря на простоту идеи метода, при ее реализации возникают как технические, так и теоретические трудности.

Еще во времена появления кинетической модели идеального газа ученые столкнулись с парадоксом обратимости. Законы механики симметричны относительно времени: движение тела вдоль траектории можно обратить, и тело начнет двигаться в обратном направлении по той же траектории. Поскольку молекулярная динамика основана на механической модели, то это означает, что всякому движению молекул в системе с возрастанием энтропии должно соответствовать движение молекул с убыванием энтропии, чего не наблюдается в природе. Для снятия парадокса используют статистическую трактовку энтропии, считая события, приводящие к росту энтропии, маловероятными, при этом применяют не только законы классической механики, но и представления о молекулярном хаосе. Вообще говоря, достаточно длинные траектории системы, подсчитанные методом молекулярной динамики, необратимы из-за роста численной ошибки при решении дифференциальных уравнений.

Помимо парадокса обратимости стоит помнить о том, что для достижения системой всех возможных микросостояний необходимо продолжительное время, хотя, по всей видимости, при нормальных условиях для биологических систем заселен относительно небольшой диапазон микросостояний, а перебор всех состояний для белковой молекулы занял бы времена на много порядков превышающие время жизни вселенной.

В молекулярной динамике применяют моделирование в заданных ансамблях, В связи с ограничениями технической реализации, обычно используют лишь NVT (канонический ансамбль) и NPT (изобароизотермический ансамбль). Для того чтобы задать необходимый ансамбль применяют алгоритмы термостатирования и баростатирования. Методы позволяющие задавать нужный ансамбль условно можно разделить на три типа: искусственная модификация классических уравнений движения (методы Берендсена, Нозе-Гувера, и т.п.), добавление некоторого случайного шума в решение уравнений движения (метод Андерсена и т.п.), метод стохастической динамики Ланжевена. Модификация классических уравнений

движения сводится к тому, чтобы замедлять скорость частиц в системе в случае ее перегрева и ускорить при чрезмерном охлаждении. Стохастические методы часто реализуют путем добавления в систему случайных взаимодействий с некоторым резервуаром виртуальных частиц, распределение скоростей которых задано в соответствии с необходимой температурой. В случае стохастической динамики используют численное решение уравнения 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.

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

3.2 Применение методов МД к моделированию нуклеосом

Для проведения исследований мы использовали силовое поле AMBER99SB-BSC0 (Guy, et al., 2012, Lindorff-Larsen, et al., 2010). Модель была создана на основании кристаллической структуры, взятой из банка RCSB PDB с индексом 1KX5 (Davey, et al., 2002). От нуклеосом удалялись подвижные гистоновые «хвосты» согласно позиций взятых в работе (Banks and Gloss, 2003), ионы марганца заменялись ионами магния, так же 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 мМ, 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.

$$N_{ions} = \frac{0.15}{55} N_{H_2O}$$

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 превышению. После добавления воды и ионов общее количество атомов в системе составило 210331. Объем элементарной ячейки равен 2100 нм³, внешний вид системы изображен на Рисунке 5.

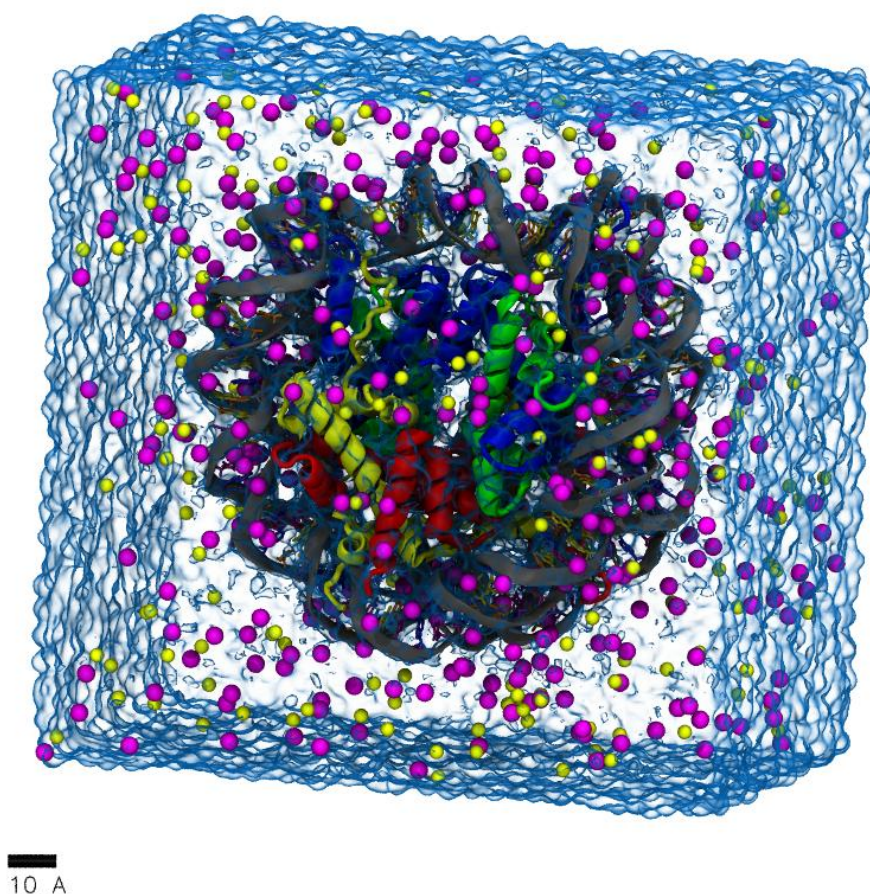


Рисунок 5 Визуализация расчетной ячейки для нуклеосомы в явном растворителе при 150 мМ NaCl. Гистоны и ДНК отображены в виде вторичной структуры, ионы в виде сфер, желтым цветом показаны ионы хлора, розовым – натрия. Полупрозрачная поверхность ограничивает объем воды в расчетной ячейке.

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

На каждом шаге релаксации, использовался особый набор параметров моделирования, наборы параметров сведены в таблице Таблица 1 в приложении. Расчет траекторий динамики производился с шагом интегрирования 2 фс, такой шаг допустим при использовании Gromacs, скомпилированного с двойной точностью (большей точностью переменных с плавающей точкой) Для того, чтобы избежать чрезмерного перемещения нуклеосомы в пространстве, на Са атомы аминокислот гистона H3 накладывался дополнительный гармонический потенциал возвращающий их в начальное положение. Для того, чтобы избежать краевых эффектов, использовались периодические граничные условия. Электростатические взаимодействия учитывались при помощи метода PME (Essmann, et al., 1995), с шагом решетки 1 Å, радиусом обрезания 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 (Bussi, et al., 2007), вода и макромолекула термостатировались отдельно. В качестве баростата применялся изотропный баростат Паринелло-Рамана (Nose and Klein, 1983). Для исследования крупномасштабных скоррелированных движений нуклеосомы использовался метод ковариационного анализа, а так же метод расчета наименьшего среднеквадратичного отклонения структуры по траектории (RMSD). Расчеты производились в программе Gromacs 4.5.4 (Pronk, et al., 2013) на суперкомпьютере МГУ «Ломоносов» (V. Sadovnichy, 2013) с использованием от 64 до 1024 процессоров. Обработка траекторий производилась при помощи встроенных в пакет Gromacs утилит и собственных исполняемых файлов написанных на языках Python и TCL на

вычислительных кластерах кафедры Биоинженерии. Для визуализации траекторий и моделей применялась программа VMD 1.9.1. (Humphrey, et al., 1996). Для построения графиков применялась программа Gnuplot.

3.3 Методы расчета электростатических характеристик нуклеосом

Расчет электростатических характеристик биологических систем можно производить различными методами, чаще всего исследователи применяют методы, решающие уравнение Пуассона-Больцмана. В случае нуклеосомы, использование данного метода сильно затруднено, так как применение неявного растворителя не позволяет учитывать электрические свойства воды и ионов в бороздках ДНК и между ДНК и гистонами (Biswas, et al., 2013). Явный учет электрических взаимодействий в биологических системах также затруднен в силу их большого размера. Сложность прямого учета кулоновских взаимодействий сильно возрастает вместе с ростом объема системы. Обрезание кулоновского потенциала на малых расстояниях неизбежно приведет к появлению артефактов на границе обрезки.

По этой причине, для расчета электростатических полей в периодических граничных условиях применяют метод сумм Эвальда (Essmann, et al., 1995). В данном методе, бесконечная сумма для кулоновского потенциала в реальном пространстве заменяется на две конечные суммы в реальном и обратном пространстве.

Для расчета карт распределения электростатического потенциала использовался модуль PMEPOТ (Aksimentiev and Schulten, 2005) программы VMD. Модуль PMEPOТ способен рассчитывать усредненную по траектории МД карту распределения электростатического потенциала, но наибольший интерес представляет собой не усредненное по времени распределение потенциала в ячейке, а распределение потенциала вокруг исследуемого биополимера, который может перемещаться по ячейке, что приведет к смазыванию карты потенциала. Для того чтобы получить такое распределение был создан модуль на языке python для программы VMD. Принцип работы модуля представлен на рисунке 6. Сверху показан простой алгоритм суммации, в этом случае объект (серый квадрат), который повернут на второй карте относительно первой будет просуммирован некорректно. Снизу показан способ с

выравниванием расчетной ячейки по объекту. Для этого рассчитывают матрицу трансформации, которую необходимо применить к карте распределения величины для того, чтобы совместить структуру в ней со структурой в начальной карте. После применения матрицы трансформации, карты суммируют, линейно интерполируя каждую новую карту на решетке первой карты. Чтобы избежать появления краевых артефактов, связанных с поворотом расчетной ячейки, при интерполяции карту представляют периодической (рисунок Рисунок 6 снизу в центре). Полученный программный модуль также используется для расчета карт распределения воды и ионов вокруг нуклеосомы. Для ускорения работы, реализована возможность параллельного вычисления карт на многопроцессорных системах.

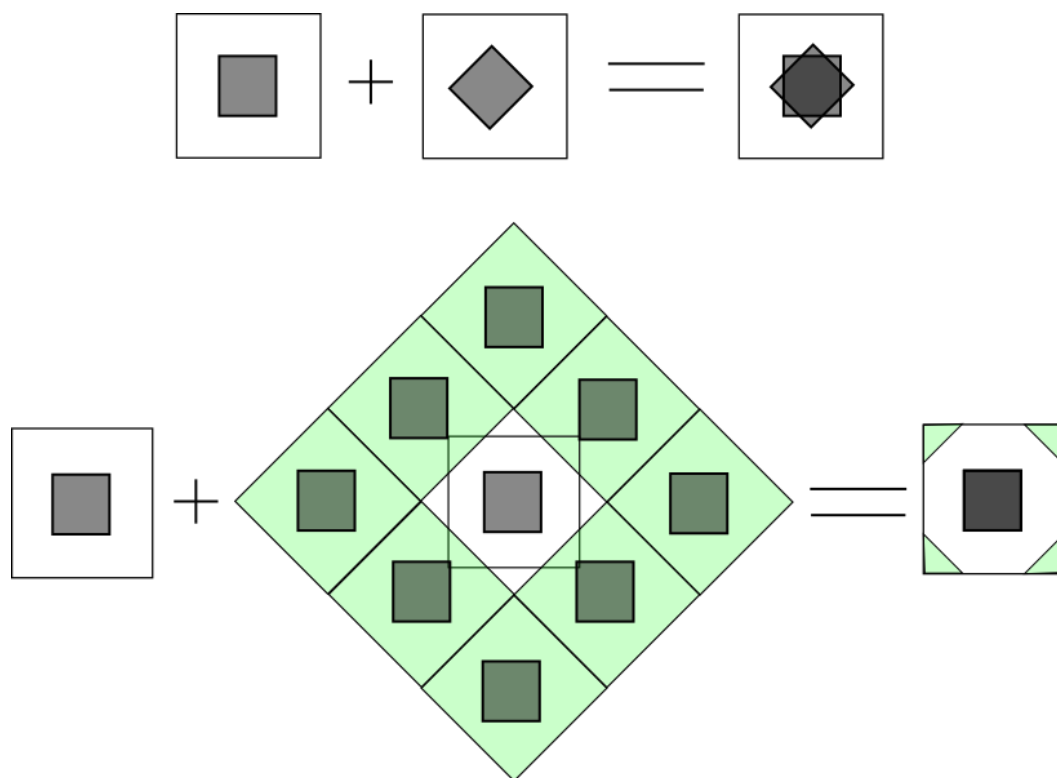


Рисунок 6 Демонстрация принципов работы алгоритма усреднения данных для распределений физических величин в двумерном случае. Сверху показан алгоритм без выравнивания расчетных ячеек по объекту внутри (серый квадрат). Снизу показан алгоритм с выравниванием по объекту. Описание алгоритма приведено в тексте. Зеленым цветом показаны реплики системы.

4 Результаты и обсуждение

4.1 Моделирование нуклеосомы

Моделирование масштабных систем методом молекулярной динамики проявляет очень высокие требования к вычислительным ресурсам. С ростом размера систем появляется необходимость в использовании высоко параллельных расчетов. Тем не менее, с ростом числа используемых вычислительных узлов, скорость расчета растет нелинейно, основной причиной этого являются ограничения по времени отклика и пропускной способности интерфейсов передачи данных между узлами. Следует понимать, что с увеличением числа используемых узлов растет вероятность аппаратных отказов, такой сбой неизбежно приводит к потере части данных и остановке счета. Таким образом, расчет масштабных биологических систем – крайне ресурсоемкая задача.

На рисунке 7 видно, что система в целом мало изменяла свою форму, при этом подвижность ДНК сильно выше таковой у гистонов, что совпадает с экспериментальными данными. Набор конформаций нуклеосомы во время МД показан на рисунке 8.

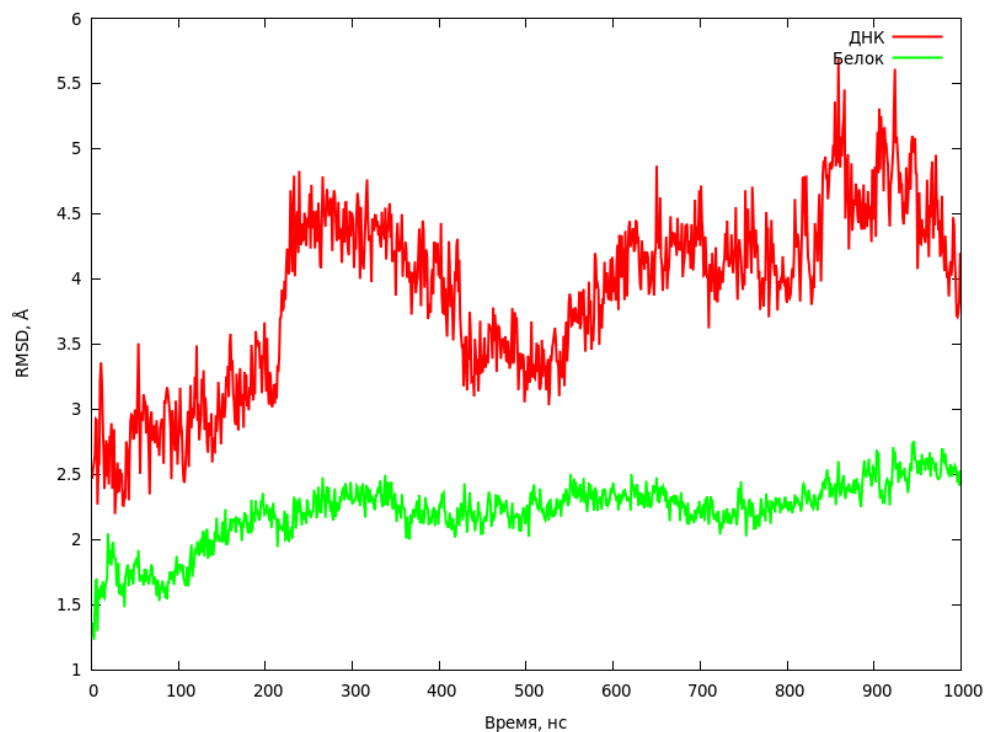


Рисунок 7 График зависимости RMSD от времени моделирования системы для остова гистонов (зеленый цвет) и остова ДНК (красный цвет).

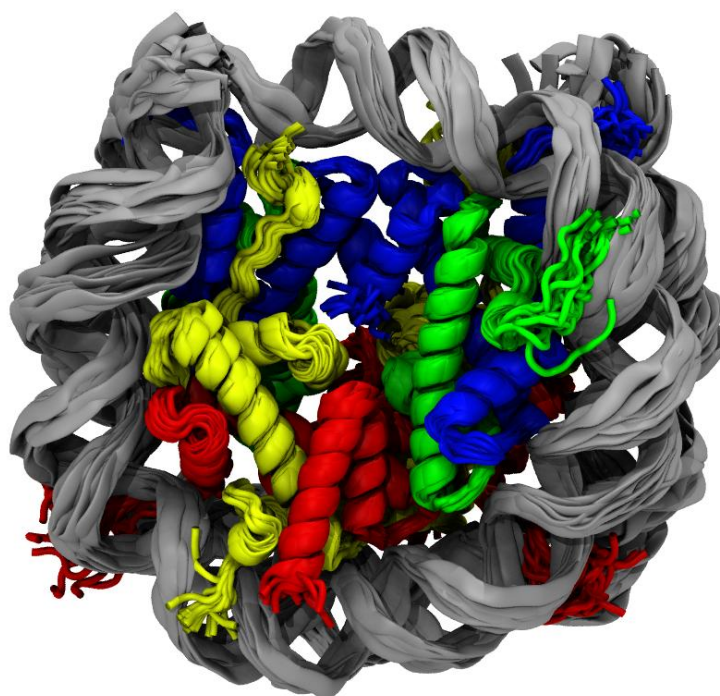
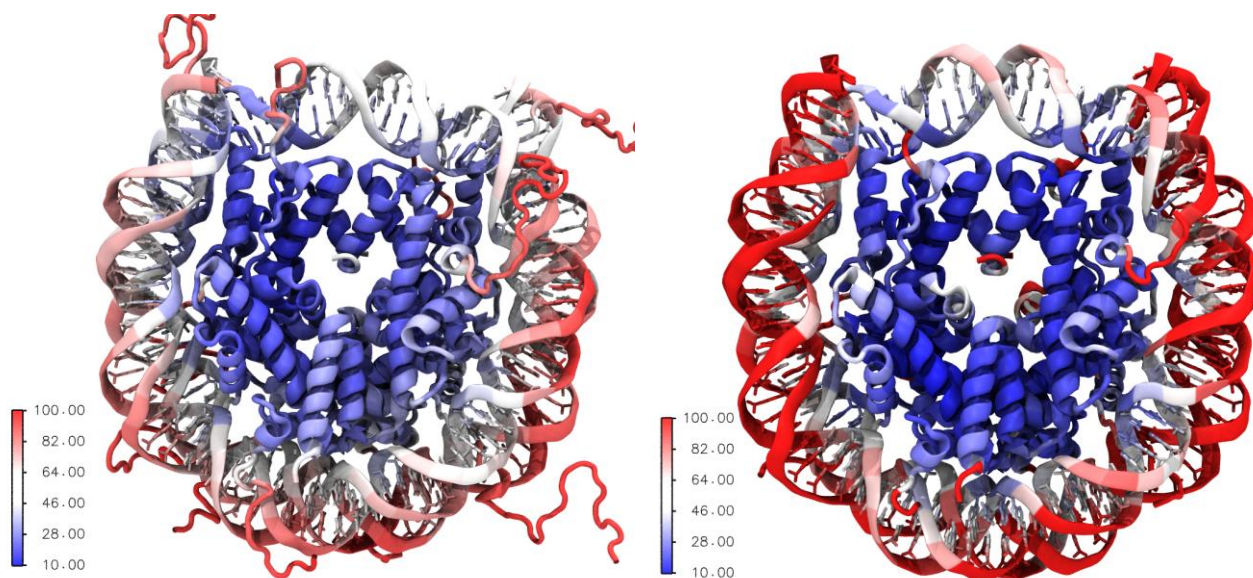


Рисунок 8 Визуализация 10, наложенных друг на друга, структур свободной динамики нуклеосомы, гистоны и ДНК отображены в виде вторичной структуры.

4.2 Подвижность ДНК в нуклеосоме.

Распределение рассчитанных В-факторов вдоль последовательности ДНК оказалось похоже на распределение в кристаллической структуре (рисунок 9 сверху), но подвижность ДНК в расчетной системе значительно выше, так как моделирование происходит при температуре 300 К, а кристалл находится в криогенном диапазоне температур (рисунок 9 снизу). Расчет В-факторов для атомов в системе производился по формуле $B = 8\pi^2 \langle u^2 \rangle$, где $\langle u^2 \rangle$ - среднеквадратичное отклонение координат атома. Дополнительно, показана неравномерность распределения В-факторов вдоль ДНК, что связано с большей мобильностью и расплетанием ДНК вблизи мест входа в нуклеосому.



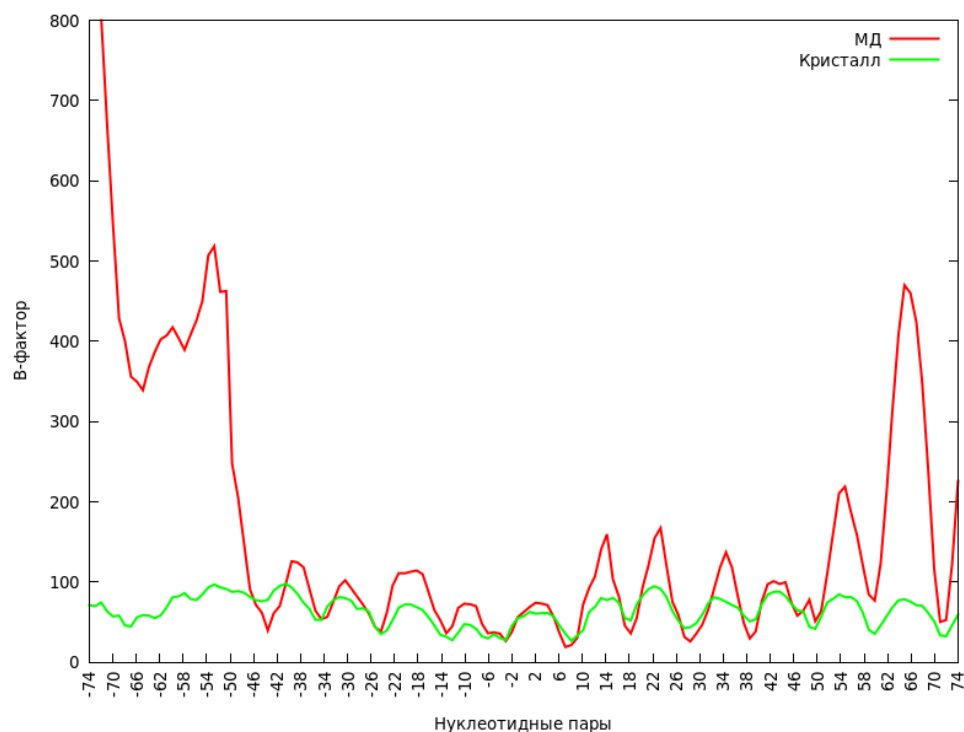


Рисунок 9 Сверху - визуализация распределения В-факторов (слева) для кристаллической структуры и (справа) для расчетной структуры. Снизу - график зависимости В-факторов атомов фосфора от положения в ДНК для одной из цепей.

Из-за высокой подвижности ДНК, количество контактов, образуемой ДНК с гистонами постоянно изменяется и в среднем отличается от контактов в кристаллической структуре (рисунок 10). Для расчета контактных карт считали число атомов гистонов (без водородов), находящихся на расстоянии 5 Å от нуклеотида. Из анализа контактных карт видно, что усредненная ориентация ДНК на гистонах отличается от кристаллической структуры. Одна из цепей ДНК кристаллической структуры не участвует в образовании контактов с гистонами H2A. Наиболее заметные отличия наблюдаются в позиции +15-+35 от входа в нуклеосому, конформация ДНК в кристаллической структуре, по всей видимости, напряжена, и в ходе динамики релаксирует.

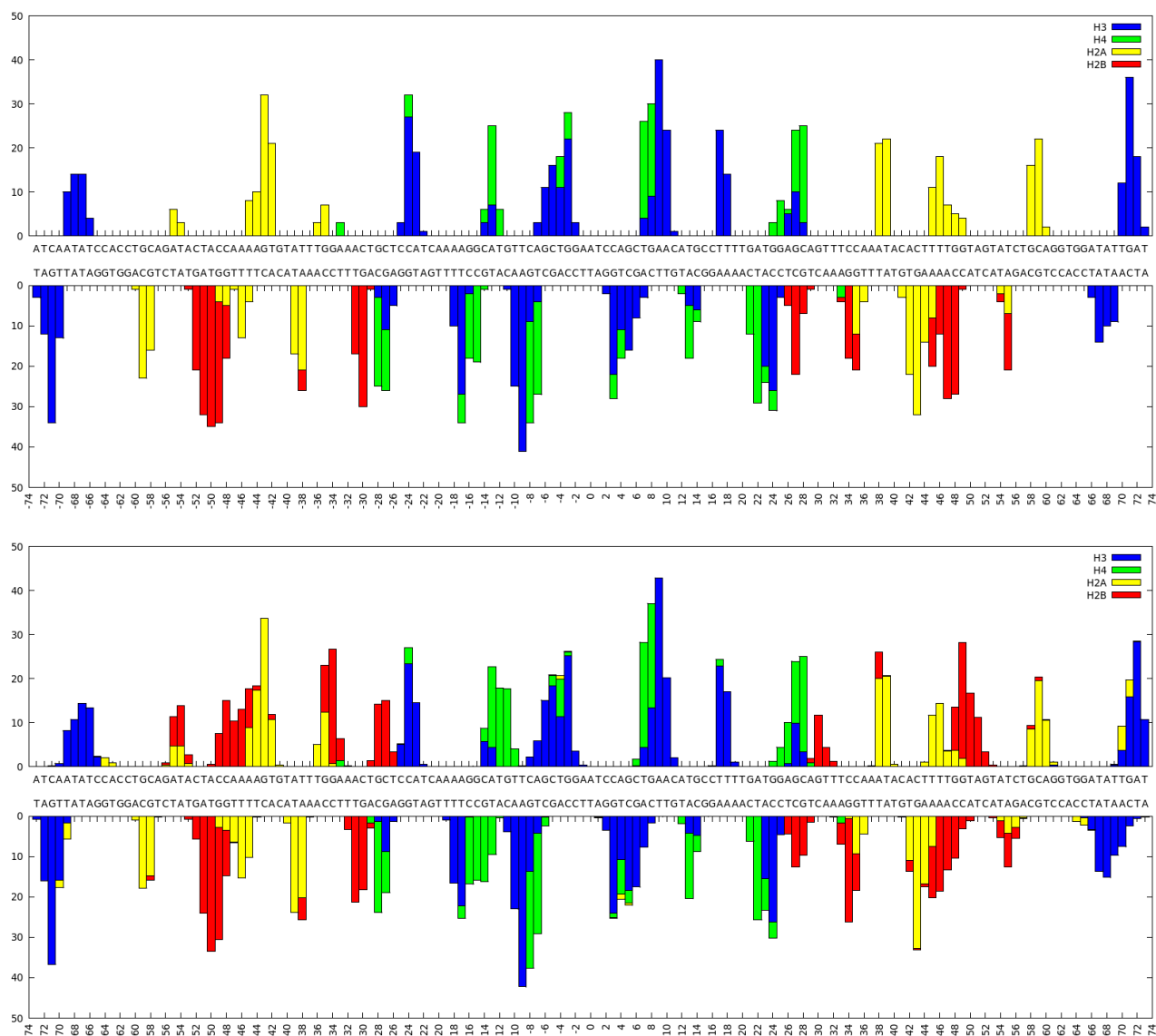


Рисунок 10 Гистограммы распределения контактов ДНК с гистонами, цветами показаны виды гистонов. Сверху – контакты в кристаллической структуре с кодом 1kx5 PDB. Снизу – усредненная по траектории МД гистограмма распределения контактов ДНК-гистоны.

Также, стоит отметить, что в кристаллической структуре между контактами имеются участки ДНК, не связанные с гистонами, количество таких участков в усредненной по траектории структуре меньше, а сами участки отличаются меньшей протяженностью. Таким образом, использование кристаллической структуры для построения модели связывания ДНК с гистонами некорректно воспроизводит вклад каждой пары нуклеотидов в формирование нуклеосомы, оценку энергии для одного сайта связывания ДНК не следует производить по кристаллической структуре.

Подвижность ДНК не симметрична относительно диадной оси, из рисунка 11 видно, что левая часть ДНК движется с большей амплитудой. Данные движения соответствуют частичному расплетанию ДНК с одного из концов. Как видно из рисунка 10 снизу, в местах входа ДНК в нуклеосому только одна из цепей ДНК формирует контакт с гистонами, вторая цепь свободна на протяжении 2-3 нуклеотидов, позволяя ДНК расплетаться.

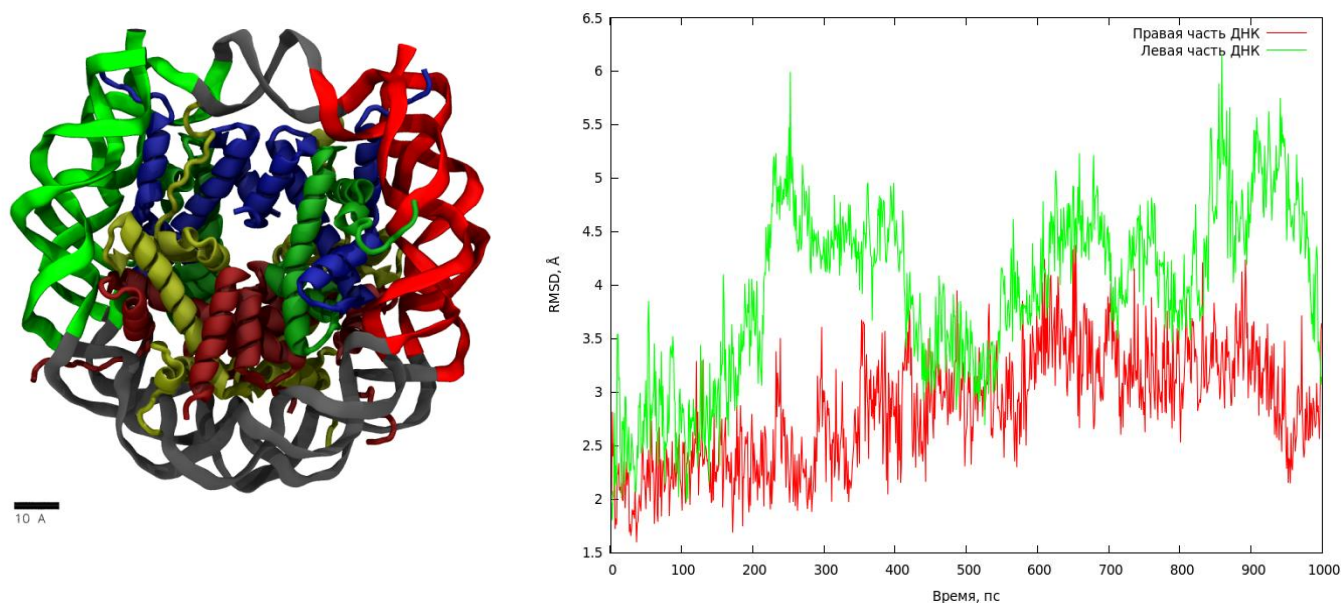


Рисунок 11 Демонстрация асимметрии в поведении ДНК при расчете. Слева – визуализация модели нуклеосомы, ДНК и белок показаны в виде вторичной структуры, цветом отображены участки ДНК, для которых производился анализ асимметричности поведения. Справа – график RMSD для частей ДНК, указанных на визуализации, от времени моделирования.

4.3 Ковариационный анализ

Ковариационный анализ движений атомов в МД, проведенный по белковому остову гистонов и остову ДНК выявил набор крупномасштабных движений в нуклеосоме. Наиболее амплитудный собственный вектор, полученный в результате ковариационного анализа можно классифицировать как движение раскрытия нуклеосомы (рисунок 12). В работе (Mozziconacci and Victor, 2003) состояние открытой нуклеосомы получили искусственно путем направленной молекулярной динамики, зафиксировав контакт гистонов Н3-Н3 в качестве «петли», при этом

стимулируя систему двигаться таким образом, чтобы петля раскрывалась. Исходя из оценки энергии, необходимой для того, чтобы раскрыть нуклеосому (30 ккал/моль), спонтанное раскрытие нуклеосомы маловероятно (учитывая, что вся ДНК связывается с энергией 15 ккал/моль), тем не менее, считается, что такое движение возможно при условии коллективного перехода целой цепи нуклеосом (Mozziconacci and Victor, 2003). Обнаружение данной моды движений в траектории свободной динамики свидетельствует о том, что движения, ведущие к раскрытию нуклеосомы, возможны, но, судя по их малой амплитуде, маловероятны.

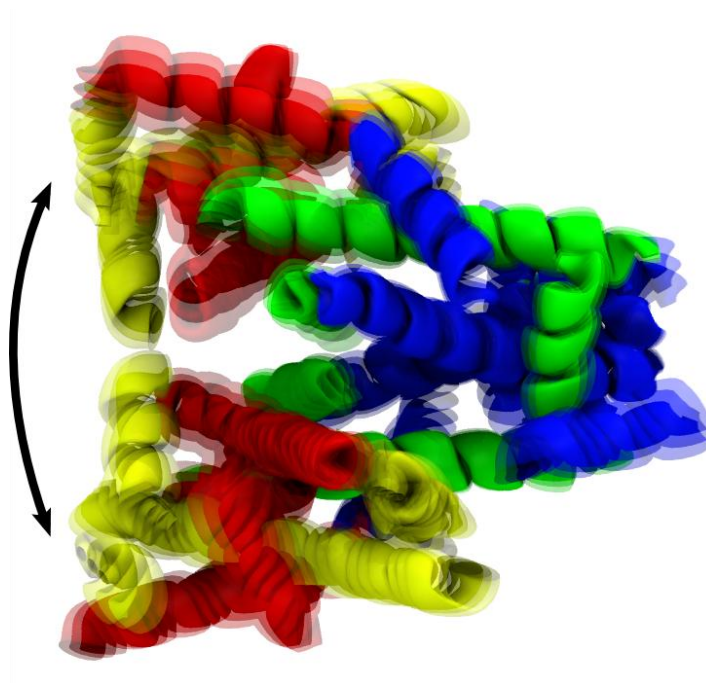


Рисунок 12 Визуализация движений вдоль наиболее амплитудного собственного вектора, полученного методом ковариационного анализа. Показаны 3 наложенные структуры для минимального, среднего и максимального значений собственного вектора.

Возможное функциональное значение движения раскрытия нуклеосом не известно однозначно, вероятно, оно может играть роль в процессе компактизации 30нм фибриллы и прохождении РНК полимераз сквозь нуклеосомы. Если представить ДНК в качестве модели червеобразной цепи, то раскрытие нуклеосомы увеличит плотность упаковки хроматина, без изменения угла между линкерами (рисунок 13 сверху), связывающими соседние нуклеосомы в цепи ДНК. Весьма вероятной видится возможность открывания нуклеосом при взаимодействии РНК полимеразы II со

второй петли ДНК (рисунок 13 снизу). 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 открывания, что может привести к снижению или росту паузы при прохождении РНК полимеразы.

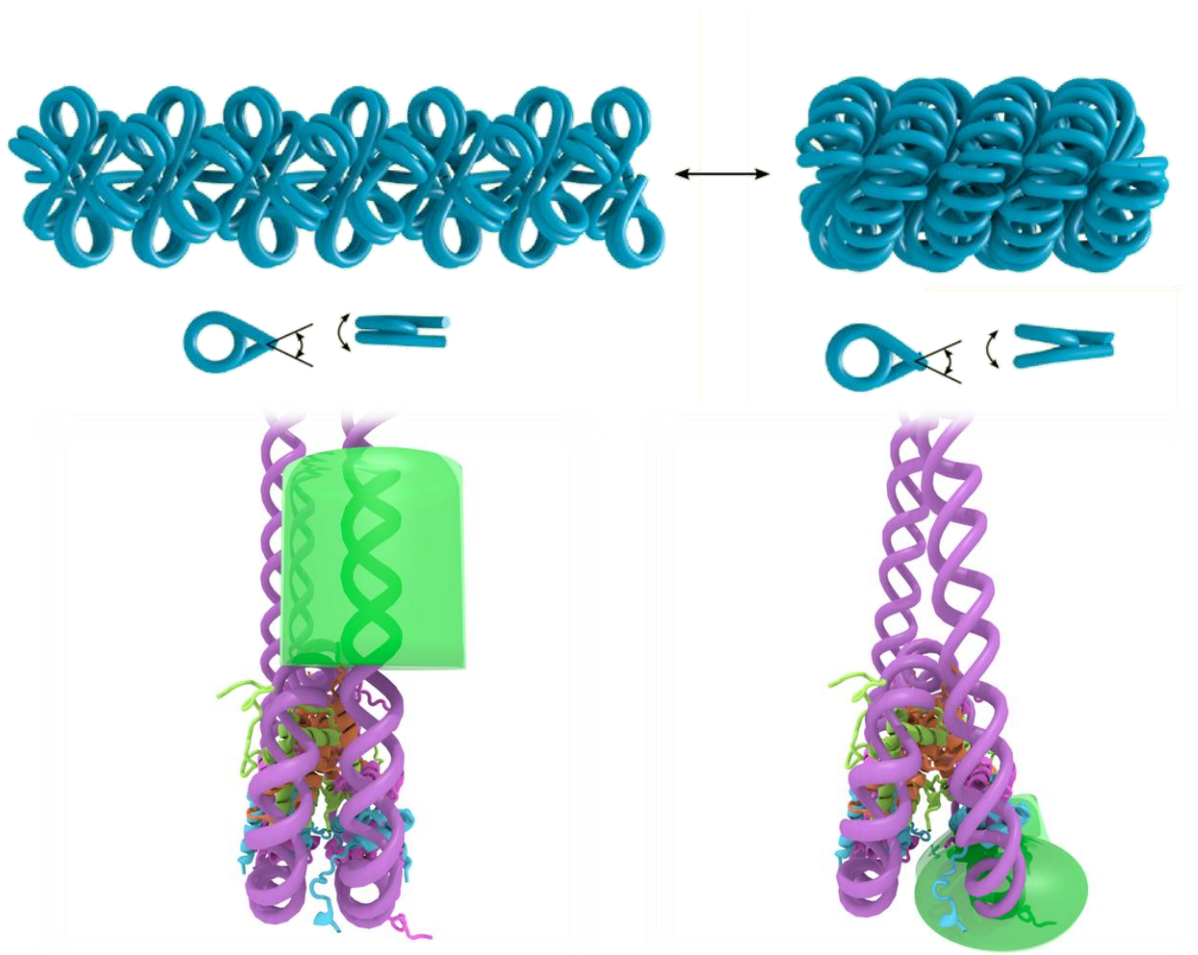


Рисунок 13 Сверху – модель компактизации 30нм фибриллы при раскрытии нуклеосомы. Снизу – модель прохождения полимеразы по ДНК и участие движения раскрывания нуклеосомы, полимеразы обозначена зеленым цилиндром не в масштабе, для упрощения демонстрации.

Из рисунка 14 видно, что выявленное движение происходит с довольно низкой для времен моделирования частотой, за одну микросекунду система претерпевает такие движения однократно. Таким образом, даже рекордный микросекундный расчет

не достаточен для обнаружения всех мод движений. Значительного увеличения времени моделирования не получится добиться путем увеличения числа вычислительных узлов текущей архитектуры. Как отмечалось выше, рост производительности системы сильно ограничен шиной обмена данными между узлами. Для увеличения времени моделирования можно использовать специализированные компьютеры, например, компьютер «Anton» (Shaw, et al., 2009), созданные специально для решения задач молекулярной динамики или прибегать к использованию огрубленных моделей растворителя или самих нуклеосом.

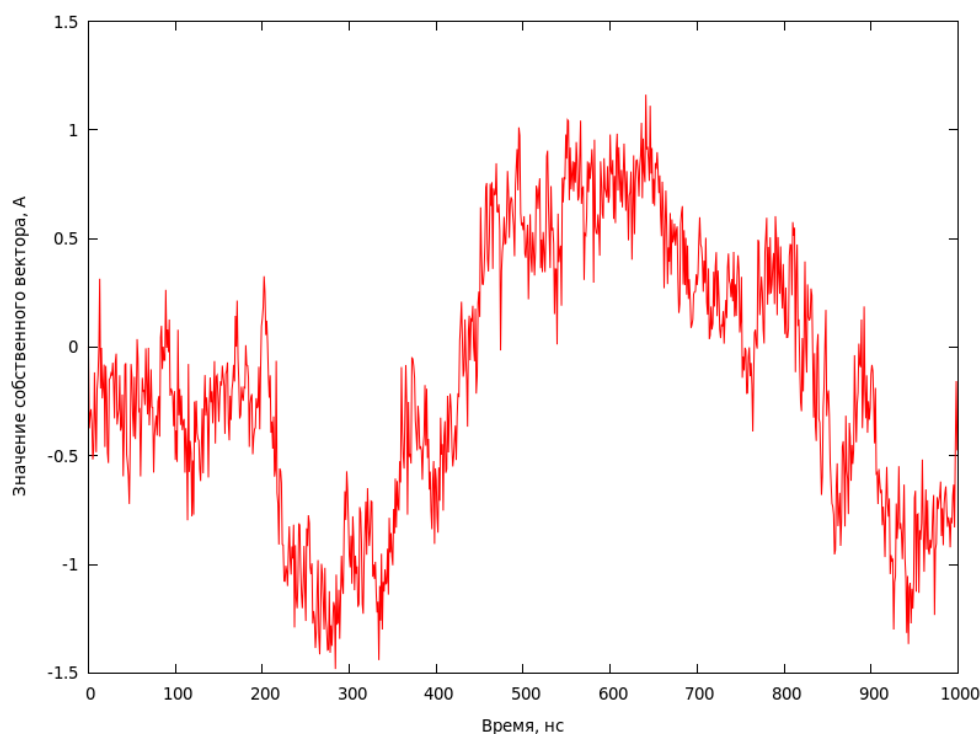


Рисунок 14 Значения первого собственного вектора ковариационного анализа от времени моделирования.

4.4 Вода в нуклеосоме.

Несмотря на стабильность, нуклеосом, и плотную упаковку гистонов в димеры, октамер гистонов упакован не плотно и содержит в себе большое количество молекул воды, которые формируют своеобразные водяные «мостики» в нуклеосоме (Рисунок 15)

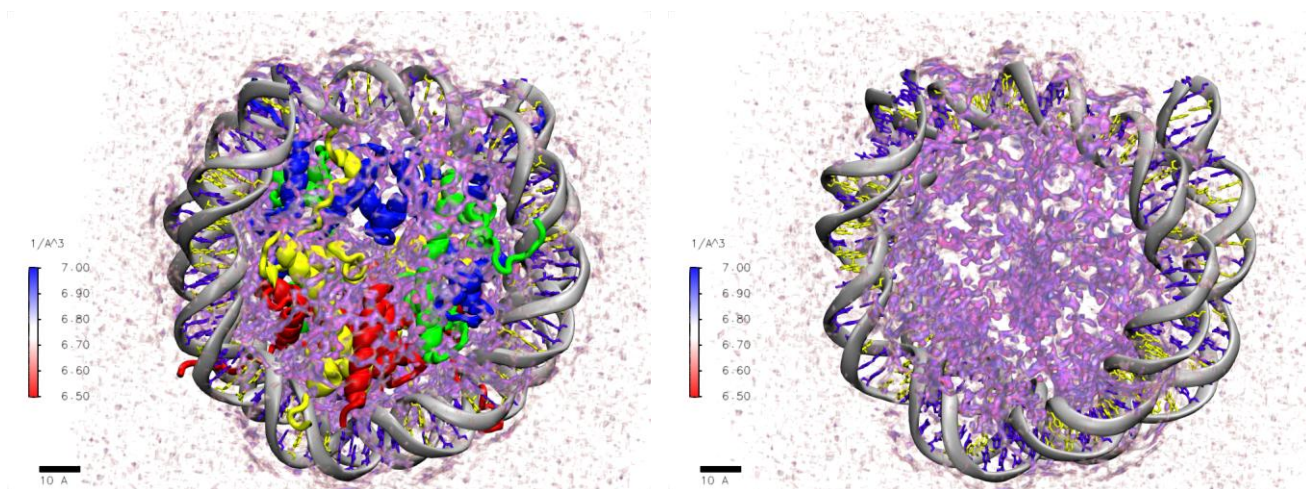


Рисунок 15 Визуализация распределения плотности воды в нуклеосоме по объему расчетной ячейки. Для наглядности справа гистоны не показаны.

Количество воды в составе нуклеосомы довольно значительно изменяется во время моделирования и превосходит количество воды в кристаллической структуре. Количество молекул воды, связанных с гистоновыми контактами рассчитывалось следующим образом: для каждого димера строился список молекул воды, находящихся на расстоянии 3 \AA от гистонов, затем определялись молекулы, принадлежащие одновременно к двум спискам, построенным для контактирующих гистонов. Как видно из рисунка 16, наибольшие изменения количества характерны для находящейся в нуклеосомной поре воды, в то время как количество молекул, находящихся вблизи контактов димеров гистонов сохраняется неизменным.

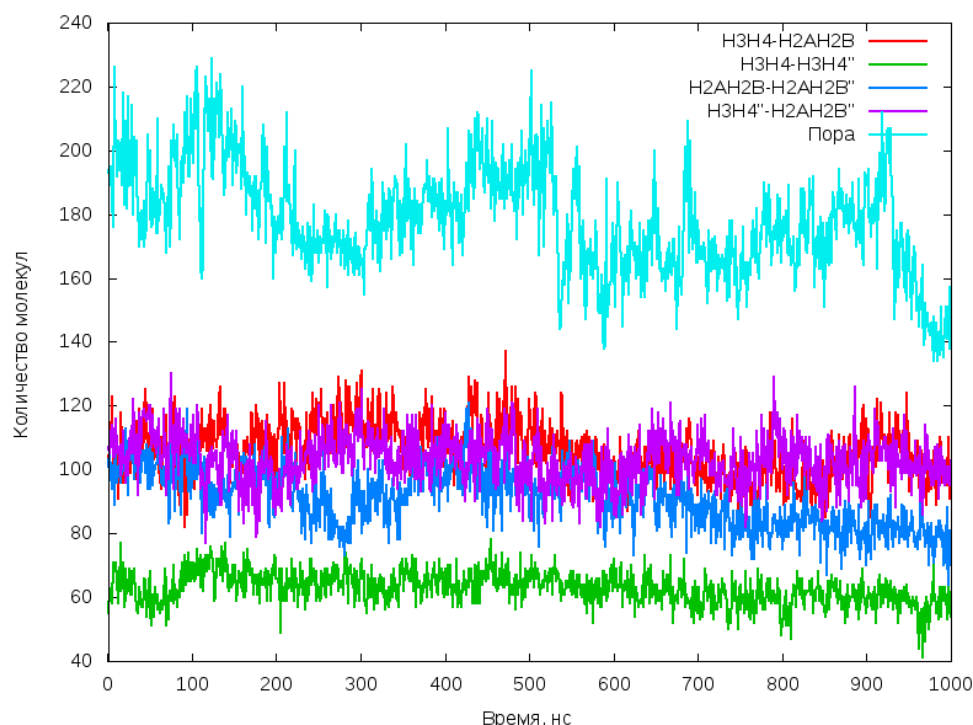


Рисунок 16 График зависимости числа молекул воды в нуклеосоме от времени моделирования. Гистоновые контакты показаны цветами, красным – контакт первой пары димеров H3-H4 и H2A-H2B, фиолетовым – контакт второй пары димеров H3-H4 и H2A-H2B, синим – контакт двух димеров H2A2B, зеленым – контакт димеров гистонов H3H4. Голубым цветом показано число молекул воды в нуклеосомной поре.

Наименьшее количество молекул воды (в среднем 63 молекулы) характерно для контакта димеров гистонов H3-H4, формирующих тетрамер – нуклеосомное ядро, в то время, как остальные контакты димеров содержат приблизительно одинаковое количество молекул воды (около 100 молекул). Большее число молекул воды на интерфейсе взаимодействия димеров гистонов свидетельствует о менее плотном контакте, что не противоречит экспериментальным данным, так как гистоны H2A-H2B удаляются из нуклеосомы легче всего.

Наличие в нуклеосоме большого числа молекул воды между гистонами делает ее проницаемой для одновалентных ионов, позволяя им эффективно экранировать заряженные группировки гистонов и ДНК.

Количество молекул воды в поре за 1 мкс изменяется в пределах 140-220 молекул, что вызвано общим изменением формы гистонов в нуклеосоме (рисунок 17).

Наиболее вероятным назначением воды в поре является снижение силы зарядовых взаимодействий между гистонами, несущими значительный положительный заряд. Вода в нуклеосомной поре позволяет ионам свободно проникать сквозь нуклеосому.

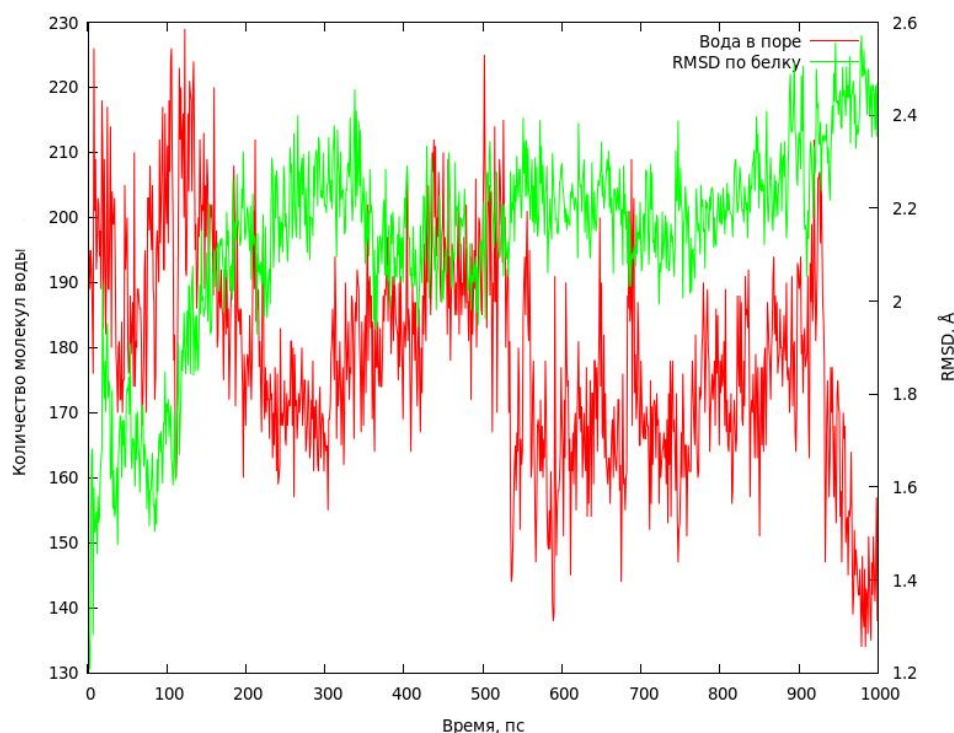


Рисунок 17 График зависимости количества молекул воды в нуклеосомальной поре и RMSD остова гистонов (атомов, не входящих в боковые цепи аминокислот) от времени моделирования.

4.5 Ионы в нуклеосоме.

Ионы распределены по нуклеосоме неравномерно, так 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 натрия заходят в нуклеосомную пору (рисунок 18). Высокая концентрация ионов хлора в нуклеосомной поре объясняется наличием на поверхности гистонов большого количества положительно заряженных аминокислот.

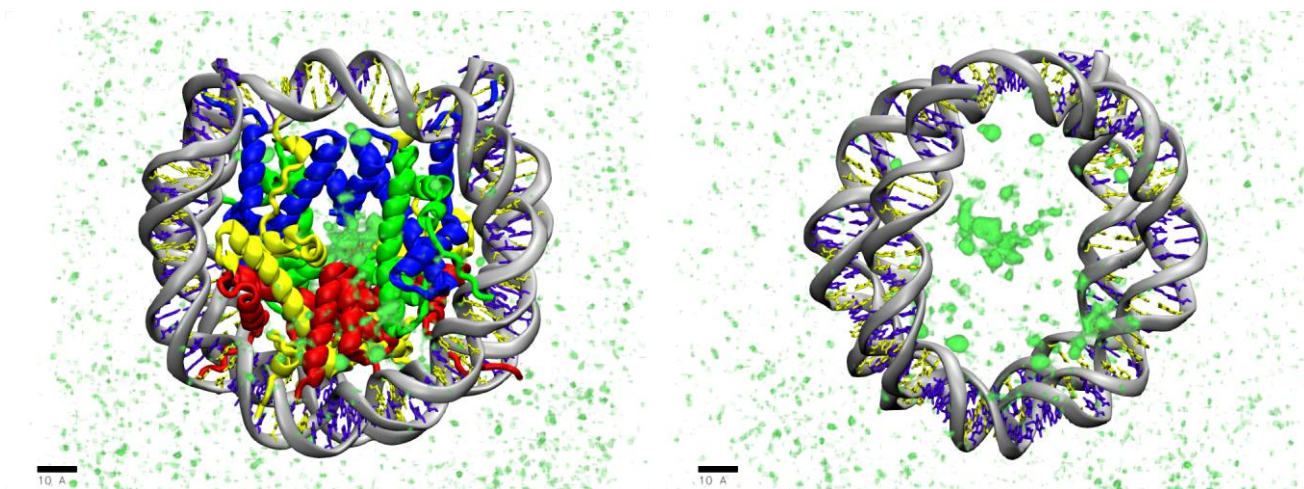


Рисунок 18 Визуализация распределения плотности ионов хлора в нуклеосоме по объему расчетной ячейки. Для наглядности справа гистоны не показаны. Распределение плотности ионов хлора в расчетной ячейке показано интенсивностью зеленого цвета от 0,01 атом/ \AA^2 до 0,02 атом/ \AA^2 .

Большое количество ионов натрия вокруг ДНК объясняется их взаимодействием с фосфатными группировками. Как видно из рисунка 19, натрий расположен преимущественно в малой бороздке ДНК. Аналогичные результаты были показаны в работе (Savelyev and Rapoian, 2006), 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 «acidic patch». В литературе предполагается, что этот участок является сайтом связывания для хвостов гистона H4 соседней нуклеосомы при формировании супрануклеосомных структур.

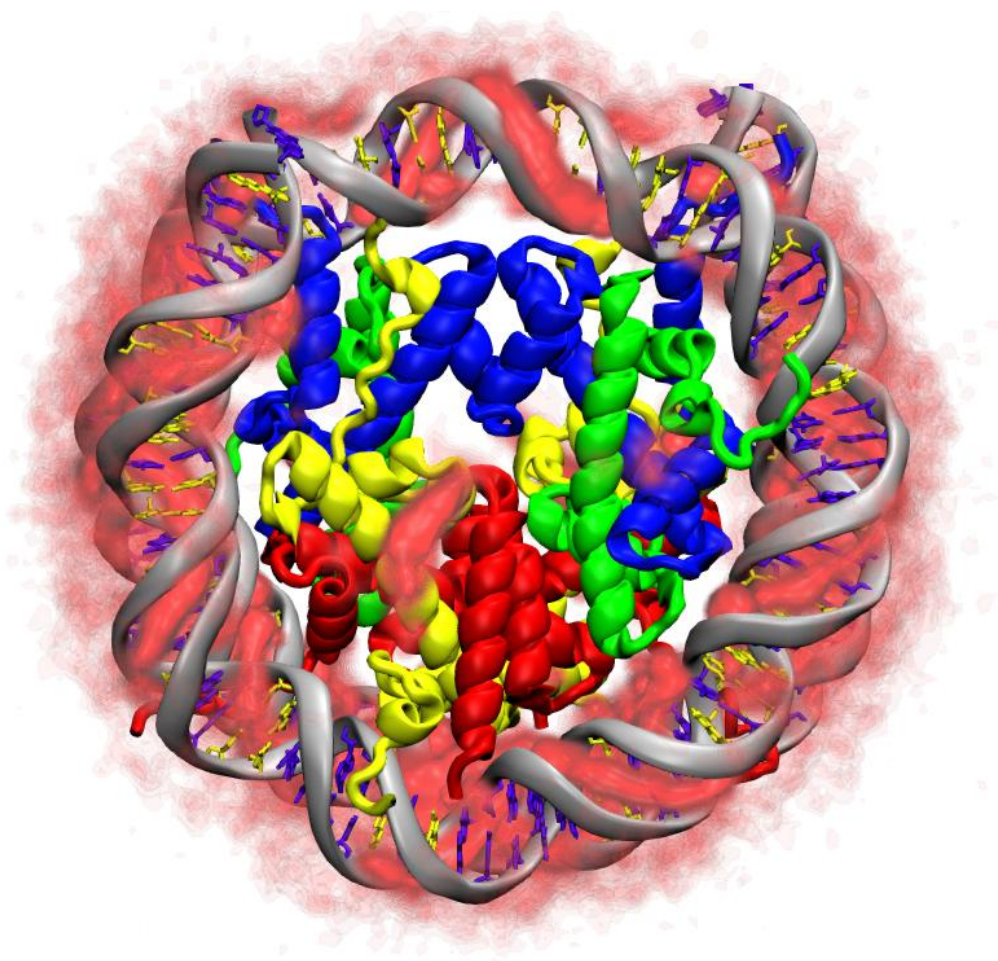


Рисунок 19 Визуализация распределения плотности ионов натрия в нуклеосоме по объему расчетной ячейки. Распределение плотности ионов натрия вокруг нуклеосомы показано интенсивностью розового цвета от $0,01 \text{ атом}/\text{\AA}^2$ до $0,05 \text{ атом}/\text{\AA}^2$.

Расположение ионов натрия вблизи нуклеосомальной ДНК позволяет эффективно экранировать заряженные фосфатные группировки. В среднем вокруг ДНК находится 18-22 иона натрия (рисунок 20). Такого рода экранирование позволяет снизить взаимодействия между соседними нуклеосомами, а также в местах примыкания соседних витков суперспирали ДНК. Уменьшение силы взаимодействий между витками ДНК может способствовать компактизации хроматина, так как нуклеосомы будут способны ближе подходить друг к другу.

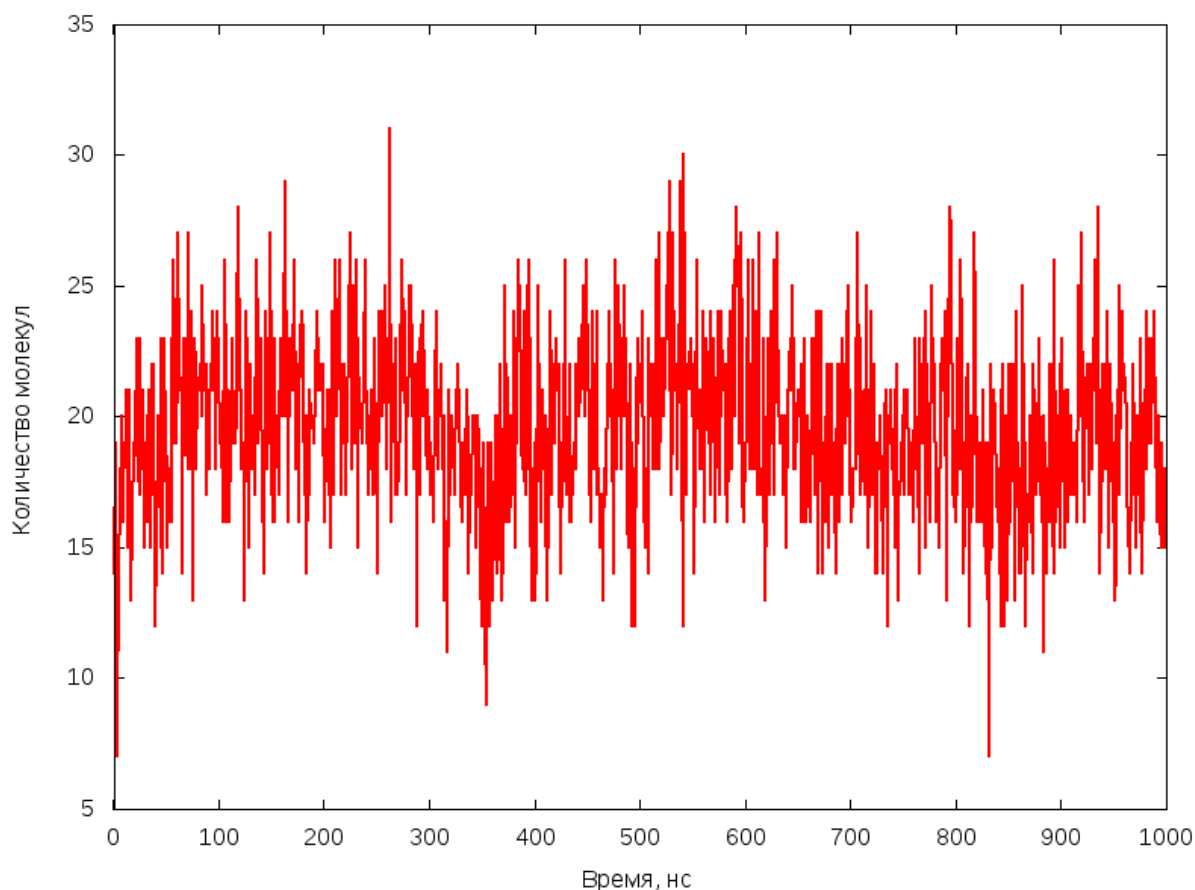


Рисунок 20 График зависимости числа ионов натрия вблизи ДНК (5 \AA) от времени моделирования.

4.6 Распределение электростатического потенциала.

Дополнение PMEPOТ (Aksimentiev and Schulten, 2005) к программе VMD создано для того, чтобы рассчитывать карту распределения электростатического потенциала. Так как электростатический потенциал вычисляется с точностью до константы, за нулевое значение электростатического потенциала выбирается значение потенциала в растворителе. Несмотря на то, что алгоритм работы дополнения способен усреднять значения электростатического потенциала по времени, отсутствие возможности производить усреднение с выравниванием карты по нуклеосоме приводит к значительному размытию карты и искажению теоретической карты распределения потенциала. Оригинальный метод, реализованный в данной работе, позволяет усреднять электростатический потенциал, используя при этом модуль PMEPOТ. Из рисунка 21 (справа) видно, что полученные карты лишены артефактов

связанных со смазыванием значений потенциала и несут больше информации для исследователя.

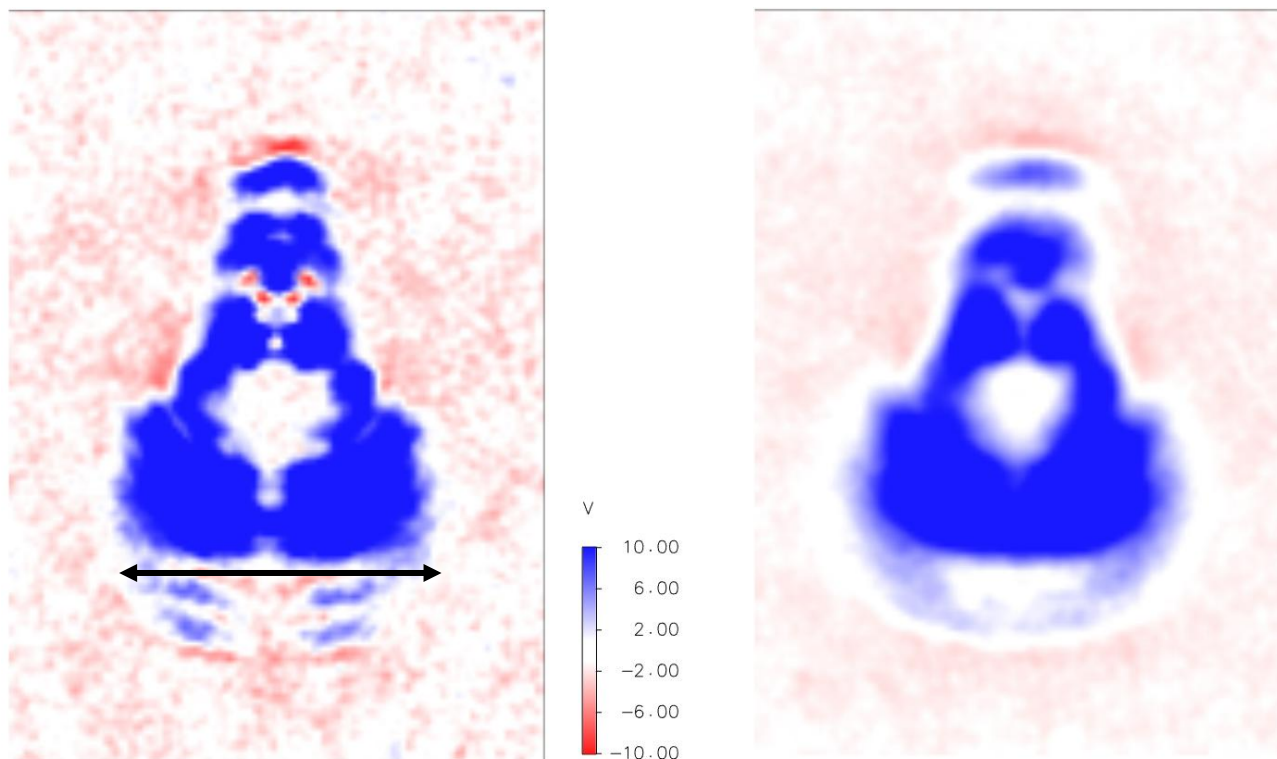


Рисунок 21 Сравнение методов расчета электростатического потенциала из траектории молекулярной динамики, шкала в вольтах. Сечения карт распределения электростатического потенциала построены по диадной оси перпендикулярно суперспирали ДНК: слева – метод PME без коррекции перемещений макромолекулы в объеме расчетной ячейки, стрелками показаны направления движений макромолекулы, справа – метод PME с коррекцией перемещений.

Электростатический потенциал вокруг нуклеосомы распределен относительно равномерно и практически везде в растворителе равен нулю (несмотря на то, что ДНК несет на себе большее число отрицательных зарядов, чем гистоны положительных), что свидетельствует о хорошей нейтрализации зарядов на нуклеосоме. В работе (Savelyev and Rapoian, 2006) отмечалось, что ДНК в нуклеосоме нейтрализована лучше, чем свободная. Внутринуклеосомный потенциал отличается неравномерным распределением (рисунок 22). Нуклеосомная пора содержит в себе область со значениями потенциала близкими к наружному. Потенциал снаружи от нуклеосомы определяются большим числом отрицательных зарядов на ДНК, катионов и анионов,

при этом между нуклеосомной порой и ДНК присутствуют лишь гистоны с относительно небольшим числом молекул воды и ионов. Значение потенциала в нуклеосомной поре указывает на то, что заряды на ДНК эффективно экранированы гистонами и ионами натрия на интерфейсе гистон-ДНК. Экранирование зарядов ДНК позволяет ее участкам, находящимся с противоположных сторон не испытывать взаимодействий, которые будут стремиться растолкнуть петли ДНК, приводя к ее диссоциации от гистонowego октамера.

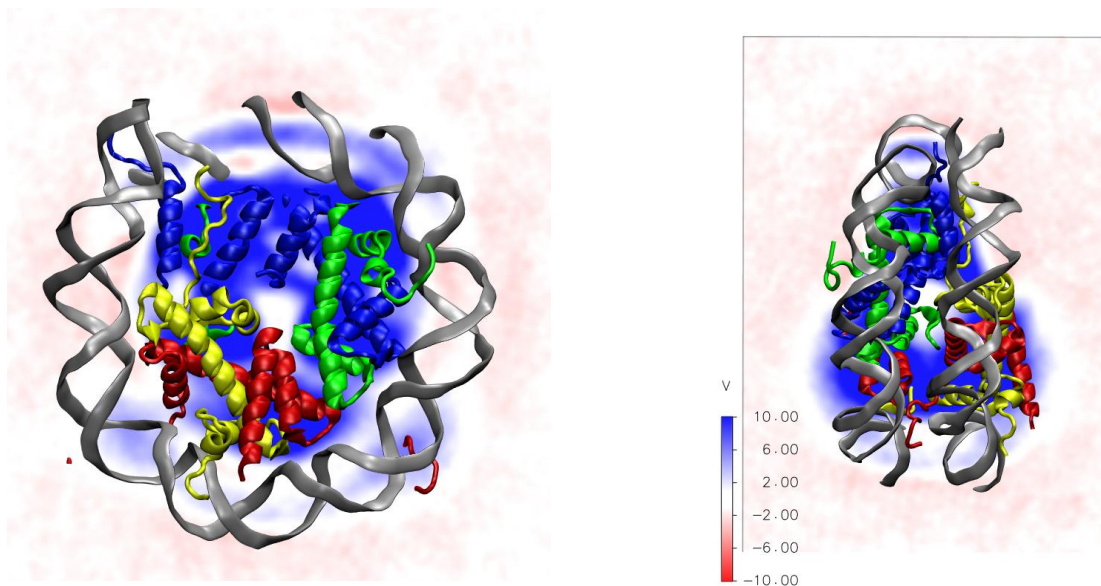


Рисунок 22 Сечение распределения электростатического потенциала в нуклеосоме вид спереди и сбоку, шкала в вольтах. Белки и ДНК показаны в виде вторичной структуры.

Для гистонов в целом характерны повышенные значения потенциала за исключением С-концевой α -спирали Н2В и докинг домена Н2А, формирующих область контакта с хвостами гистонов соседних нуклеосом (рисунок 23 слева, область показана розовым). Повышенные значения потенциала наблюдаются в областях контактов гистонов с ДНК, что объясняется высоким содержанием положительно заряженных аминокислотных остатков (рисунок 23 слева, области контактов выделены красными стрелками).

Интересным является характер распределения электростатического потенциала между спиралями ДНК (Рисунок 23 справа). В районах входа в нуклеосому между витками проникают хвосты гистона Н3, в нижней части нуклеосомы (около 20 н.п. от входов в нуклеосому) между витками располагаются хвосты гистонов Н2В. Судя по

распределению потенциала, эти хвосты являются своеобразными «защелками», в которых ДНК надежно закреплена (на рисунке 23 справа гистоновые хвосты, показаны красным и синим цветом). Электростатический потенциал между соседними участками ДНК, лежащими около входа в нуклеосому, сильно занижен, что свидетельствует о недостаточной экранировке зарядов на ДНК и приводит к их расталкиванию. Этот факт объясняет методику приготовления нуклеосом путем диализа из высокой ионной силы. Высокая концентрация соли позволяет экранировать цепи ДНК друг от друга большим числом ионов натрия, тем самым разрешая сборку нуклеосомы. Недостаточное экранирование и отталкивание цепей ДНК друг от друга поясняет эксперименты по силовому растягиванию нуклеосом, где было показано, что для снятия первого витка ДНК нужна меньшая сила, чем для снятия последующих участков.

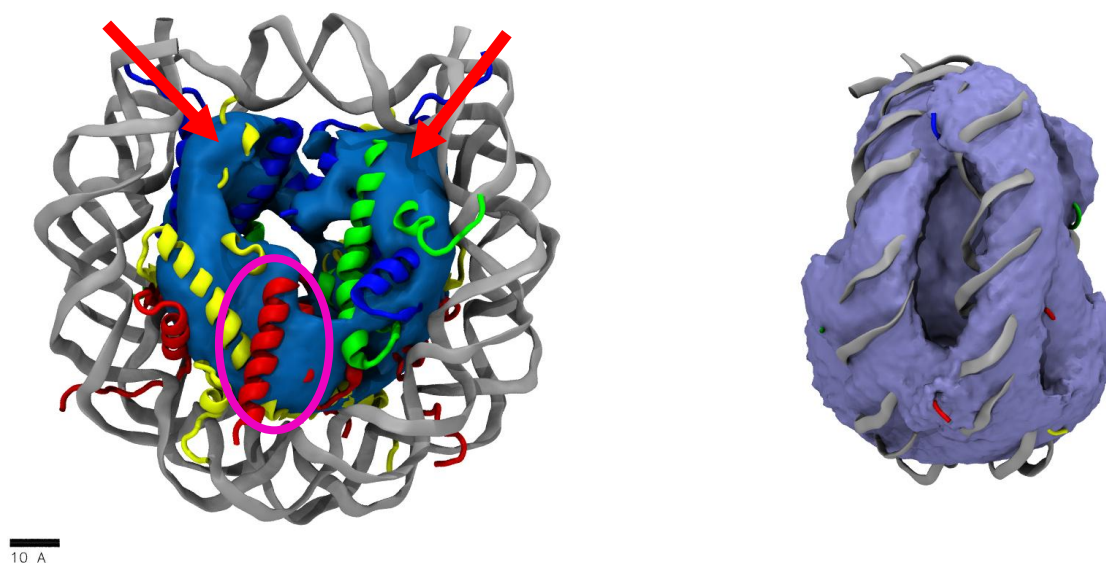


Рисунок 23 Изоповерхности электростатического потенциала в нуклеосоме, слева - 14,2 В, справа – 0,5 В. Красными стрелками показаны области контактов гистонов с ДНК, розовым выделена область контактов с хвостом гистона Н4 .

5 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате работы была построена и исследована полноатомная модель нуклеосомы в воде. Показана устойчивость системы на протяжении 1 мкс.

Обнаружены низкочастотные коллективные движения, потенциально связанные с процессом прохождения транскрипции и плотной компактизации хроматина.

Обнаружены места преимущественного расположения молекул воды в нуклеосоме, показана связь прочности контактов димеров гистонов и количества молекул воды на их интерфейсах. Определено распределение ионов в системе с нуклеосомой, обнаружены сайты преимущественной локализации ионов, проиллюстрирована роль ионов в процессе формирования нуклеосомы. Рассчитано распределение электростатического потенциала в системе, обсуждается его влияние на динамику ДНК. Разработан метод расчета электростатического потенциала в условиях молекулы, дрейфующей в расчетной ячейке.

Можно сделать также следующие научно значимые выводы.

1. Структура нуклеосомы в целом стабильна на временах порядка 1 микросекунды, а среди крупномасштабных коллективных движений, выделяется мода движений, при которой два супервитка ДНК (в месте пересечения с диадной осью нуклеосомы) и связанные с ними области гистонов приближаются и удаляются друг от друга.
2. Распределение электростатического потенциала в нуклеосоме имеет существенные положительные значения в области гистонного ядра, а в области расположения ДНК значения потенциала близки к значениям в области растворителя, что свидетельствует об эффективной экранировке зарядов фосфатного остова ДНК противоионами и водой.
3. Распределение электростатического потенциала в нуклеосоме неравномерно. Для гистонов в целом характерны положительные значения потенциала, за исключением участка связывания хвостов гистонов H4 (“acidic patch”). В областях гистонов, связывающих ДНК наблюдаются повышенные значения потенциала.
4. Величина электростатического потенциала в нуклеосомной поре соответствует величине потенциала в растворителе, окружающем нуклеосому. Данный факт свидетельствует о том, что несмотря на относительно малый размер нуклеосомной поры, центр нуклеосомы является областью с высокой

диэлектрической проницаемостью и данный факт необходимо учитывать при построение огрубленных физических моделей организации хроматина.

5. Нуклеосома содержит в своей структуре большое количество молекул воды, в нуклеосомальной поре в среднем содержится 178 молекул воды, количество молекул воды в контактах димеров гистонов варьирует от 62 до 105. Вокруг ДНК в среднем находится 20 ионов натрия, внутри нуклеосомной поры присутствует один 1 хлора.
6. В образовании контакта между двумя димерами гистонов H3-H4 участвует меньшее количество молекул воды (62), чем при образовании аналогичного контакта между димерами H3-H4 и H2A-H2B (102-105).

6 Приложение

Таблица 1 набор параметров, используемый на различных стадиях моделирования методом МД.

	Минимизация энергии	Термостатирование	Баростатирование	Свободная динамика.
Интегратор	SD	Leap-Frog	Leap-Frog	Leap-Frog
Шаг интегрирования	-	2 фс	2 фс	2 фс
Число шагов	-	200 000	200 000	100 000 000 - 500 000 000
Термостат	-	V-rescale $T_{\text{ref}}=300 \text{ K}$ $t_{\text{tau}}=0.1 \text{ пс}$	V-rescale $T_{\text{ref}}=300 \text{ K}$ $t_{\text{tau}}=0.1 \text{ пс}$	V-rescale $T_{\text{ref}}=300 \text{ K}$ $t_{\text{tau}}=0.1 \text{ пс}$
Баростат	-	-	Parrinello-Rahmann $P_{\text{ref}}=1 \text{ бар}$ $t_{\text{tau}}=2 \text{ пс}$	Parrinello-Rahmann $P_{\text{ref}}=1 \text{ бар}$ $t_{\text{tau}}=2 \text{ пс}$
Обновление списка соседних атомов	1 шаг	5 шагов	5 шагов	5 шагов
Радиусы обрезания взаимодействий	Электростатические взаимодействия в прямом пространстве- 1 нм Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия – 1 нм			

7 Список литературы

- 1 **A Aksimentiev and K Schulten** Imaging alpha-hemolysin with molecular dynamics: ionic conductance, osmotic permeability, and the electrostatic potential map [Journal] // Biophys J. - 2005. - 6: Vol. 88. - p. 3745-61.
- 2 **MP Allen and DJ Tildesley** Computer simulation of liquids [Book]: Clarendon Press, 1989.
- 3 **JD Anderson and J Widom** Sequence and position-dependence of the equilibrium accessibility of nucleosomal DNA target sites [Journal] // J Mol Biol. - 2000. - 4: Vol. 296. - p. 979-87.
- 4 **AJ Andrews and K Luger** A coupled equilibrium approach to study nucleosome thermodynamics [Journal] // Methods Enzymol. - 2011: Vol. 488. - p. 265-85.
- 5 **DD Banks and LM Gloss** Equilibrium folding of the core histones: the H3-H4 tetramer is less stable than the H2A-H2B dimer [Journal] // Biochemistry. - 2003. - 22: Vol. 42. - p. 6827-39.
- 6 **M Biswas [et al.]** Atomistic simulations of nucleosomes [Journal] // Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science. - 2013. - 4: Vol. 3. - p. 378-392.
- 7 **B Brower-Toland [et al.]** Specific contributions of histone tails and their acetylation to the mechanical stability of nucleosomes [Journal] // J Mol Biol. - 2005. - 1: Vol. 346. - p. 135-46.
- 8 **BD Brower-Toland [et al.]** Mechanical disruption of individual nucleosomes reveals a reversible multistage release of DNA [Journal] // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2002. - 4: Vol. 99. - p. 1960-5.
- 9 **RJ Burgess and Z Zhang** Histone chaperones in nucleosome assembly and human disease [Journal] // Nat Struct Mol Biol. - 2013. - 1: Vol. 20. - p. 14-22.
- 10 **G Bussi [et al.]** Canonical sampling through velocity rescaling [Journal] // Journal of Chemical Physics. - 2007. - 1: Vol. 126.
- 11 **C Claudet [et al.]** Histone octamer instability under single molecule experiment conditions [Journal] // J Biol Chem. - 2005. - 20: Vol. 280. - p. 19958-65.
- 12 **CA Davey and TJ Richmond** DNA-dependent divalent cation binding in the nucleosome core particle [Journal] // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2002. - 17: Vol. 99. - p. 11169-74.
- 13 **CA Davey [et al.]** Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution [Journal] // J Mol Biol. - 2002. - 5: Vol. 319. - p. 1097-113.
- 14 **RO Dror [et al.]** Biomolecular simulation: a computational microscope for molecular biology [Journal] // Annu Rev Biophys. - 2012: Vol. 41. - p. 429-52.
- 15 **U Essmann [et al.]** A Smooth Particle Mesh Ewald Method [Journal] // Journal of Chemical Physics. - 1995. - 19: Vol. 103. - p. 8577-8593.
- 16 **R Ettig [et al.]** Dissecting DNA-histone interactions in the nucleosome by molecular dynamics simulations of DNA unwrapping [Journal] // Biophys J. - 2011. - 8: Vol. 101. - p. 1999-2008.

- 17 **D Frenkel and B Smit** Understanding Molecular Simulation [Book]: Academic Press, Inc., 2001.
- 18 **AT Guy [et al.]** Single-stranded DNA within nanopores: conformational dynamics and implications for sequencing; a molecular dynamics simulation study [Journal] // Biophys J. - 2012. - 5: Vol. 103. - p. 1028-36.
- 19 **M Hondele and AG Ladurner** Catch me if you can: how the histone chaperone FACT capitalizes on nucleosome breathing [Journal] // Nucleus. - 2013. - 6: Vol. 4. - p. 443-9.
- 20 **W Humphrey [et al.]** VMD: Visual molecular dynamics [Journal] // Journal of Molecular Graphics & Modelling. - 1996. - 1: Vol. 14. - p. 33-38.
- 21 **OI Kulaeva [et al.]** Mechanism of chromatin remodeling and recovery during passage of RNA polymerase II [Journal] // Nature Structural & Molecular Biology. - 2009. - 12: Vol. 16. - p. 1272-U90.
- 22 **I Kulić and H Schiessel** DNA Spools under Tension [Journal] // Physical Review Letters. - 2004. - 22: Vol. 92.
- 23 **K Lindorff-Larsen [et al.]** Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field [Journal] // Proteins-Structure Function and Bioinformatics. - 2010. - 8: Vol. 78. - p. 1950-1958.
- 24 **PT Lowary and J Widom** New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning [Journal] // J Mol Biol. - 1998. - 1: Vol. 276. - p. 19-42.
- 25 **K Luger [et al.]** Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution [Journal] // Nature. - 1997. - 6648: Vol. 389. - p. 251-60.
- 26 **K Luger and TJ Richmond** DNA binding within the nucleosome core [Journal] // Curr Opin Struct Biol. - 1998. - 1: Vol. 8. - p. 33-40.
- 27 **AH Mack [et al.]** Kinetics and thermodynamics of phenotype: unwinding and rewinding the nucleosome [Journal] // J Mol Biol. - 2012. - 5: Vol. 423. - p. 687-701.
- 28 **L Marino-Ramirez [et al.]** Histone structure and nucleosome stability [Journal] // Expert Rev Proteomics. - 2005. - 5: Vol. 2. - p. 719-29.
- 29 **CK Materese [et al.]** Counterion atmosphere and hydration patterns near a nucleosome core particle [Journal] // J Am Chem Soc. - 2009. - 41: Vol. 131. - p. 15005-13.
- 30 **J Mozziconacci and JM Victor** Nucleosome gapping supports a functional structure for the 30nm chromatin fiber [Journal] // Journal of Structural Biology. - 2003. - 1: Vol. 143. - p. 72-76.
- 31 **S Nose and ML Klein** Constant Pressure Molecular-Dynamics for Molecular-Systems [Journal] // Molecular Physics. - 1983. - 5: Vol. 50. - p. 1055-1076.
- 32 **KJ Polach and J Widom** Mechanism of protein access to specific DNA sequences in chromatin: a dynamic equilibrium model for gene regulation [Journal] // J Mol Biol. - 1995. - 2: Vol. 254. - p. 130-49.

- 33 **S Pronk [et al.]** GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit [Journal] // Bioinformatics. - 2013. - 7: Vol. 29. - p. 845-854.
- 34 **A Savelyev and GA Papoian** Electrostatic, steric, and hydration interactions favor Na(+) condensation around DNA compared with K(+) [Journal] // J Am Chem Soc. - 2006. - 45: Vol. 128. - p. 14506-18.
- 35 **2065 DE Shaw [et al.]** Millisecond-scale molecular dynamics simulations on Anton [Book Section] // Proceedings of the Conference on High Performance Computing Networking, Storage and Analysis. - Portland, Oregon: ACM, 2009.
- 36 **TE Shrader and DM Crothers** Artificial nucleosome positioning sequences [Journal] // Proc Natl Acad Sci U S A. - 1989. - 19: Vol. 86. - p. 7418-22.
- 37 **VM Studitsky [et al.]** Overcoming a nucleosomal barrier to transcription [Journal] // Cell. - 1995. - 1: Vol. 83. - p. 19-27.
- 38 **VM Studitsky [et al.]** Mechanism of transcription through the nucleosome by eukaryotic RNA polymerase [Journal] // Science. - 1997. - 5345: Vol. 278. - p. 1960-3.
- 39 **VM Studitsky [et al.]** Chromatin remodeling by RNA polymerases [Journal] // Trends Biochem Sci. - 2004. - 3: Vol. 29. - p. 127-35.
- 40 **PB Talbert [et al.]** A unified phylogeny-based nomenclature for histone variants [Journal] // Epigenetics Chromatin. - 2012: Vol. 5. - p. 7.
- 41 **C Thiriet and JJ Hayes** Replication-independent core histone dynamics at transcriptionally active loci in vivo [Journal] // Genes & Development. - 2005. - 6: Vol. 19. - p. 677-682.
- 42 **M Tomschik [et al.]** Nucleosome Dynamics as Studied by Single-pair Fluorescence Resonance Energy Transfer: A Reevaluation [Journal] // Journal of Fluorescence. - 2009. - 1: Vol. 19. - p. 53-62.
- 43 **EN Trifonov** Cracking the chromatin code: precise rule of nucleosome positioning [Journal] // Physics of life reviews. - 2011. - 1: Vol. 8. - p. 39-50.
- 44 **AT V. Sadovnichy, VI. Voevodin, and V. Opanasenko** "Lomonosov": Supercomputing at Moscow State University. In Contemporary High Performance Computing: From Petascale toward Exascale [Journal] // Computational Science. - 2013. - 1: Vol. 1. - p. 283-307.
- 45 **VB Zhurkin** The first thirty years of nucleosome positioning: comment on "Cracking the chromatin code: precise rule of nucleosome positioning" by Trifonov [Journal] // Physics of life reviews. - 2011. - 1: Vol. 8. - p. 64-6; discussion 69-72.
- 46 **J Zlatanova [et al.]** The nucleosome family: dynamic and growing [Journal] // Structure. - 2009. - 2: Vol. 17. - p. 160-71.

47 **ГА Армеев [et al.]** "Моделирование нуклеосом методами атомистического суперкомпьютерного моделирования" [Journal] // International Journal of Qafqaz University (PHYSICA). - 2013. - 2: Vol. 1. - p. 91-99.