

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

ФЕДУЛОВА АНАСТАСИЯ СЕРГЕЕВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ДИНАМИКИ ДНК-ГИСТОНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ
МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ**

Специальность 1.5.8

Математическая биология, биоинформатика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
доктор физико-математических наук,
член-корреспондент РАН
Шайтан Алексей Константинович

Москва
2026

Оглавление

Введение.....	5
Глава 1. Современное состояние области исследования структуры и динамики ДНК-гистоновых комплексов.....	13
1.1. Строение хроматина и ДНК-гистоновых комплексов.....	13
1.1.1. Структура хроматина.....	13
1.1.2. Экспериментальные подходы исследования структуры и динамики ДНК-гистоновых комплексов.....	15
1.1.3. Структура нуклеосомной ДНК.....	17
1.1.4. Структура глобулярного домена гистонов и важность исследования его динамики.....	20
1.1.5. Структура и роль неупорядоченных хвостов гистонов.....	26
1.1.6. Структура и динамика нуклеосом с вариантными формами гистонов.....	27
1.1.7. Структура и динамика субнуклеосомных структур.....	29
1.2. Молекулярное моделирование как инструмент исследования структуры и динамики ДНК-гистоновых комплексов.....	33
1.2.1. Обзор методов моделирования.....	33
1.2.2. Основы метода атомистического МД моделирования.....	34
1.2.3. Направления развития протоколов атомистической МД.....	37
1.2.4. Молекулярное моделирование в применении к исследованию структуры и динамики нуклеосом.....	43
1.2.5. Функционально важные моды динамики нуклеосом.....	45
Глава 2. Материалы и методы.....	50
2.1. Протокол моделирования в задачах исследования динамики глобулярного домена гистонов и ДНК в составе нуклеосом и тетрасом.....	50
2.1.1. Построение стартовых систем.....	50
2.1.2. Подготовка систем к расчету МД и проведение расчетов.....	50
2.1.3. Описание молекулярных моделей и траекторий, анализируемых в исследовании внутренней динамики гистонов (Главы 3 и 4).....	52
2.1.4. Описание молекулярных моделей и траекторий, анализируемых в исследовании структуры и динамики вариантных гистонов (Глава 5).....	54
2.1.6. Описание молекулярных моделей и траекторий динамики тетрасом (Глава 6).....	57
2.2. Протокол моделирования в задачах исследования динамики неупорядоченных хвостов гистонов в составе нуклеосом (Глава 7).....	58
2.2.1. Построение стартовых систем.....	58
2.2.2. Подготовка систем к расчету МД и проведение расчетов.....	58
2.3. Обработка траекторий МД и анализ динамики нуклеосом.....	60

2.4. Анализ структур нуклеосом.....	63
Глава 3. Динамика нуклеосом на мульти-микросекундном масштабе времен... 66	
3.1. Результаты.....	66
3.1.1. Откручивание нуклеосомной ДНК.....	66
3.1.2. Скольжение нуклеосомной ДНК.....	68
3.1.3. Моделирование комплекса нуклеосомы с пептидом CENP-Смотив....	70
3.2. Обсуждение.....	73
Глава 4. Характеризация пластичности гистонов и ее связи с динамикой нуклеосомной ДНК..... 79	
4.1. Результаты.....	79
4.1.1. Общее описание пластичности гистонов в составе свободных димеров и нуклеосом.....	79
4.1.2. Изгиб $\alpha 2$ -спиралей гистонов.....	84
4.1.3. Связь пластичности димера гистонов H2A-H2B с последовательностью нуклеосомной ДНК и релаксацией дефекта кручения ДНК.....	91
4.1.4. Пластичность димера H2A-H2B при откручивании внешнего полувитка суперспирали ДНК.....	94
4.2. Обсуждение.....	96
Глава 5. Влияние последовательности гистона на динамику нуклеосомы на примере вариантных гистонов H2A.J и H2A.Z..... 100	
5.1. Результаты.....	100
5.1.1. Динамика димера H2A.Z-H2B и H2A.Z-содержащей нуклеосомы....	100
5.1.2. L1-L1 взаимодействие в динамике нуклеосом, содержащих вариантный гистон H2A.J.....	104
5.2. Обсуждение.....	108
Глава 6. Исследование динамики тетрамера гистонов (H3-H4)² и тетрасом. 112	
6.1. Результаты.....	112
6.1.1. Структура и динамика ДНК в тетрасоме.....	112
6.1.2. Внутренняя пластичность гистонов H3 и H4 и ее функциональная роль в динамике тетрасом.....	124
6.2. Обсуждение.....	127
Глава 7. Моделирование динамики неупорядоченных хвостов гистонов.....132	
7.1. Результаты.....	132
7.1.1. Взаимодействие хвостов гистонов с нуклеосомой.....	132
7.1.2. Анализ конформационного ансамбля хвостов.....	136
7.2. Обсуждение.....	138
Заключение..... 141	

Благодарности.....	146
Список сокращений.....	148
Список литературы.....	149

Введение

Генетический материал эукариот, представленный в виде последовательности нуклеотидов ДНК, упакован в ядрах клеток в форме хроматина. В основе структуры хроматин лежит взаимодействию ДНК с белками-гистонами, в результате которого формируются повторяющиеся единицы хроматина – нуклеосомы. Нуклеосомы были описаны как сферические частицы в составе хроматиновых нитей в работе 1974 года Ады и Дональда Олинсов. С момента их открытия потребовалось 23 года на расшифровку первой структуры нуклеосомы в атомистическом разрешении. С тех пор исследования структуры нуклеосом прошли долгий путь длиной почти 30 лет. Одновременно с появлением первой атомистической структуры появлялись первые работы по численному моделированию хроматина в грубом приближении. В течение десятилетий формировалось представление о важном значении структуры и динамики хроматина в функционировании генома эукариот и человека.

Согласно современному представлению, хроматин выполняет роль не только компактной упаковки ДНК в ядре, но и регулирует основные геномные процессы, такие как транскрипция, репликация, репарация ДНК. Ключевым фактором, определяющим возможность прохождения геномных процессов, является пространственная организация генома в ядре, а также доступность ДНК для связывания не гистоновыми белками. В частности, нуклеосомы являются физическим барьером для работы некоторых молекулярных машин. Например, для перемещения РНК-полимеразы вдоль ДНК при транскрипции требуется динамическая разборка и последующая сборки нуклеосом. Нуклеосомы опосредуют регуляцию генома на эпигенетическом уровне, являясь платформой для ведения широкого набора пост-трансляционных модификаций и вариаций аминокислотной последовательности белков-гистонов в составе. Нуклеосомы являются соединительным звеном между закодированной в виде последовательности нуклеотидов генетической информацией и физической природой межмолекулярных взаимодействий, определяющих доступ к этой информации.

Хроматин и нуклеосома являются динамичными структурами. Динамика ДНК в нуклеосоме влияют на доступность сайтов связывания ДНК, экранируемых белками-гистонами, и на плотность упаковки ДНК. Важнейшими модами динамики ДНК в нуклеосоме являются откручивание ДНК от поверхности нуклеосомы и скольжение ДНК внутри нуклеосом. В клетке существует ряд факторов, определяющих кинетику и направление динамики откручивания и скольжения ДНК. В частности, скольжение ДНК, определяющее позиционирование нуклеосом в геноме, осуществляется направленно благодаря работе АТФ-зависимых молекулярных ремоделирующих факторов. Из литературы также известны свидетельства спонтанной ненаправленной динамики скольжения и откручивания ДНК в рамках теплового движения. Эпигенетические модификации нуклеосом во многом влияют на их стабильность и характеристики их динамики, также как и изменение состава нуклеосом – замена канонических форм белков-гистонов на вариантыные формы, отличающиеся аминокислотной последовательностью. Таким образом, нуклеосомы являются регулируемым динамическими платформами, через динамику которых реализуется регуляция активности генов.

Однако исследование молекулярных механизмов динамики нуклеосом является трудной задачей. Классические методы структурной биологии дают либо статическую информацию с хорошим разрешением, либо динамическую информацию с низким разрешением. Другие экспериментальные методы, позволяющие исследовать динамику нуклеосом, дают в основном косвенные данные о структуре и применимы в рамках интегративного подхода (комбинации экспериментальных методов с методами компьютерного моделирования). Методы молекулярного моделирования, в частности молекулярной динамики (МД), позволяют в ходе вычислительных экспериментов получать уникальную информацию о физических механизмах и кинетических параметрах динамических изменениях ДНК-гистоновых комплексов. Современный уровень развития суперкомпьютерных технологий позволяет моделировать функционально значимые движения ДНК-гистоновых комплексов в мульти-микросекундном

масштабе времен, что открывает путь к пониманию молекулярных механизмов регуляции работы генома.

В диссертации представлена работа по изучению молекулярных механизмов динамических мод ДНК-гистоновых комплексов, имеющих функциональное значение в прохождении геномных процессов. Основным методом исследования является метод моделирования молекулярной динамики (МД) в атомистическом приближении, в том числе с применением суперкомпьютерных вычислений. Полученные в вычислительных экспериментах результаты интерпретированы в связке с результатами *in vitro* экспериментов, анализом баз данных структур и современными концепциями о динамике хроматина.

Целью диссертационной работы является раскрытие молекулярных механизмов динамики ДНК-гистоновых комплексов и их роли в регуляции функционирования хроматина на нуклеосомном уровне.

Для достижения цели работы были поставлены следующие **задачи**:

1. Выявление функционально важных мод динамики нуклеосом, возникающих на мульти-микросекундных масштабах времен в рамках тепловых колебаний.
2. Характеризация «пластичности» гистонов и ее роли в функционально важной подвижности нуклеосом.
3. Определение зависимости динамики нуклеосом от характера аминокислотной последовательности в структуре гистонов.
4. Определение параметров динамической подвижности (H3-H4)₂-тетрасом и ее роли в снижении транскрипционного барьера.

Положения, выносимые на защиту:

1. Атомистическое моделирование методом молекулярной динамики на микросекундных временах дает информацию о механизмах, лежащих в основе функционирования хроматина и его регуляции на уровне ДНК-гистоновых комплексов.

2. Функционирование хроматина неразрывно связано со спонтанной динамикой ДНК-гистоновых комплексов.
3. Функционально-важная динамика ДНК в составе ДНК-гистоновых комплексов опосредована структурной пластичностью димеров гистонов.

Научная новизна

В ходе вычислительных экспериментов по моделированию нуклеосом были определены молекулярные механизмы функционально важных движений ДНК – спонтанного откручивания и скольжения ДНК. Проявленность этих типов движений определяется динамичностью контактов между ДНК и гистонами, претерпевающими разрыв с последующим восстановлением старых или образованием новых контактов. Показана роль пластичности гистонов, которая заключается в том, что прохождение скольжения ДНК становится возможным в момент, когда спонтанный изгиб гистона происходит в сторону центра нуклеосомы.

Обнаруженная динамическая мода изгиба является характерной модой динамики димеров гистонов, образование которых происходит благодаря структурному мотиву «рукопожатие». Характер пластичности гистонов зависит от их аминокислотной последовательности. На примере вариантного гистона H2A.Z показано, что гистон может приобретать большую пластичность, что представляет собой молекулярно-динамический механизм эпигенетической регуляции хроматина при изменении состава нуклеосом. В работе предложен молекулярный механизм влияния аминокислотных замен в области L1-петли гистона H2A на эффективность взаимодействия между гистонами и, тем самым, на стабильность нуклеосом, определяющую эффективность прохождения РНК-полимеразы II через нуклеосомы в ходе транскрипции. Охарактеризованы динамические свойства (H3-H4)₂-тетрасом, обуславливающие возможность изменения суперспирализации ДНК и облегчение прохождения РНК-полимеразы II через тетрасомы.

Теоретическая и практическая значимость работы

В компьютерном моделировании реализованы моды динамики ДНК в ДНК-гистоновых комплексах, играющие важную роль в регуляции работы хроматина. Выявлена связь динамики белков-гистонов хроматина и динамики ДНК. Предложены молекулярные механизмы регуляции динамики ДНК при изменении аминокислотной последовательности в структуре гистонов. Обнаруженные моды динамики гистонов позволяют предположить механизм действия мутаций в гистонах в развитии онкологических заболеваний.

Практическая значимость результатов заключается в возможном использовании полученных результатов для рационального подхода к разработке методов регуляции активности генов путем направленного изменения аминокислотного состава и модификаций гистонов, а тем самым и динамических свойств ДНК-гистоновых комплексов в рамках разработки эпигенетической терапии наследственных и вирусных заболеваний.

Основные публикации Федуловой Анастасии Сергеевны по теме диссертационной работы в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базе ядра Российского индекса научного цитирования "eLibrary Science Index", рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.8 – Математическая биология, биоинформатика (физико-математические науки) (в скобках приведен импакт-фактор журнала, объём публикации в печатных листах/вклад автора в печатных листах):

1. Armeev G. A.* , **Kniazeva (Fedulova) A. S.***, Komarova G. A., Kirpichnikov M. P., Shaytan A. K. Histone dynamics mediate DNA unwrapping and sliding in nucleosomes // Nature communications. — 2021. — Vol. 12. — 2387. EDN: UTCTBX. (Импакт-фактор 15,7 (JIF), 1,73/0,60 п.л., * – равный вклад).
2. **Kniazeva (Fedulova) A. S.**, Armeev G. A., Shaytan A. K. H2A-H2B Histone Dimer Plasticity and Its Functional Implications // Cells. — 2022. — Vol. 11. — № 18. — 2837. EDN: TVNIYF. (Импакт-фактор 5,2 (JIF), 2,31/1,38 п.л.).
3. 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: 20 // International Journal of Molecular Sciences. — 2023. — Vol. 24. — № 20. — 15194. EDN: QYXSUQ. (Импакт-фактор 4,9 (JIF), 3,23/0,96 п.л., * – равный вклад).
4. **Fedulova A. S.**, Armeev G. A., Romanova T. A., Singh-Palchevskaia L., Kosarim N. A., Motorin N. A., Komarova G. A., Shaytan A. K. Molecular dynamics simulations of nucleosomes are coming of age // Wiley interdisciplinary reviews. Computational molecular science. — 2024. — Vol. 14. — № 4. — e1728. EDN: GXCUYD. (Импакт-фактор 3,08 (JCI), 3,93/1,96 п.л.).
 5. Kosarim N. A., **Fedulova A. S.**, Shariafetdinova A. S., Armeev G. A., Shaytan A. K. Molecular Dynamics Simulations of Nucleosomes Containing Histone Variant H2A.J // International Journal of Molecular Sciences. — 2024. — Vol. 25. — № 22. — 12136. EDN: AMFEDQ. (Импакт-фактор 4,9 (JIF), 2,19/0,43 п.л.).
 6. Shi X.*, **Fedulova A. S.***, Kotova E. Y., Maluchenko N. V., Armeev G. A., Chen Q., Prasanna C., Sivkina A. L., Feofanov A. V., Kirpichnikov M. P., Nordensköld L., Shaytan A. K., Studitsky V. M. Histone tetrasome dynamics affects chromatin transcription // Nucleic Acids Research — 2025. — Vol. 53. — № 8. — gkaf356. DOI: 10.1093/nar/gkaf356. (Импакт-фактор 13,1 (JIF), 1,73/0,69 п.л., * – равный вклад).

Степень достоверности и апробация результатов

Изложенные в диссертации результаты вошли в ряд публикаций в высокорейтинговых журналах. Полученные результаты согласуются с результатами других научных групп. Основные результаты работы и материалы диссертации были представлены и обсуждались на конференциях:

1. 5th RUSSIAN INTERNATIONAL CONFERENCE ON CRYOELECTRON MICROSCOPY 2025, г. Москва, Россия, 8-11 июня 2025.

2. XXXII Международная конференция Математика. Компьютер. Образование МКО-2025, г. Москва, Россия, 27-31 января 2025..
3. 14-я Международная Мультиконференция «Биоинформатика регуляции и структуры геномов / системная биология» (Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology, BGRS/SB-2024), г. Новосибирск, Россия, 5-10 августа 2024.
4. XXXI Международная конференция Математика. Компьютер. Образование МКО-2024, г. Дубна, Россия, 22-27 января 2024.
5. 4th RUSSIAN INTERNATIONAL CONFERENCE ON CRYOELECTRON MICROSCOPY 2023, г. Москва, Россия, 4-7 июня 2023.
6. VII Съезд биофизиков России, г. Краснодар, Россия, 17-23 апреля 2023.
7. XXX Международная конференция Математика. Компьютер. Образование МКО-2023, г. Москва, Россия, 23-27 января 2023.
8. Biophysical Society 66th Annual Meeting, on-line, США, 19-23 февраля 2022.
9. XXIX Международная конференция Математика. Компьютер. Образование МКО-2022, on-line, Россия, 24-28 января 2022.
10. Ломоносовские чтения 2021, МГУ им.М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия, 21 апреля 2021.

Личный вклад автора

Подготовка атомистических моделей и выполнение расчетов молекулярной динамики осуществлялись автором самостоятельно в главах 3, 4, 6, 7 и в разделе 5.1.1.

Результаты, представленные в разделе 3.1.3, были получены в ходе комплексного исследования с использованием методов молекулярного моделирования, биоинформатики и ФРЕТ-микроскопии (Oleinikov, Fedulova и др., IJMS, 2023). Расчеты и анализ в области молекулярного моделирования были выполнены автором диссертации.

Часть расчетов, относящихся к разделу 5.1.2 (траектории молекулярной динамики нуклеосом с вариантным гистоном H2A.J), проводились Н.А. Косаримом; дополнительные расчеты и результаты анализа, представленные в

разделе диссертации, были получены автором диссертации. Результаты раздела 5.1.2 соответствуют разделу статьи Kosarim, Fedulova и др., IJMS, 2024 («Влияние замены Ser40Ala на конформацию L1-Loop и на взаимодействия внутри и между димерами в нуклеосоме»).

Результаты главы 6 являются частью совместного исследования с использованием методов *in vitro* и ЯМР-спектроскопии (статья Shi, Fedulova и др., NAR, 2025); результаты, касающиеся моделирования, были получены автором и представлены в диссертации.

Результаты, изложенные в диссертации, и их обсуждение входят в обзор по молекулярному моделированию нуклеосом (Fedulova et al., 2024, разделы 2 «Выявление механизмов внутренней динамики нуклеосом с помощью молекулярного моделирования» и раздел 6 «Молекулярное моделирование нуклеосом: проблемы и перспективы»).

Автор работал над созданием текстов статей и тезисов, представлял результаты работы на конференциях.

Глава 1. Современное состояние области исследования структуры и динамики ДНК-гистоновых комплексов

1.1. Строение хроматина и ДНК-гистоновых комплексов

1.1.1. Структура хроматина

Геном эукариот упакован в ядрах клеток в структуру, называемую хроматином [1]. Хроматин представляет собой комплекс ДНК, РНК и белков и имеет сложную иерархическую структуру [2]. Согласно принятой в настоящее время теории, хромосомы в ядре занимают определенные хромосомные территории, разделенные в свою очередь на А- и В-компарменты (с высоким и низким уровнем экспрессии, соответственно). Методом Hi-C и родственными ему методами было показано существование топологически-ассоциированных доменов (ТАДов), обеспечивающих пространственное взаимодействие далеких по геному участков хроматина. На нижнем уровне иерархии расположены повторяющиеся единицы хроматина – нуклеосомы, представляющие собой ~10 нм «бусинки на нити» ДНК (Рисунок 1 А) [3,4]. Статическое представление функционирования нуклеосом как формы укладки ДНК в последние десятилетия сместилось на представление о нуклеосомах как о динамических платформах, на уровне которых реализуется эпигенетическая регуляция структуры хроматина, ремоделирование хроматина, транскрипция, репарация ДНК, репликация и другие геномные процессы [5].

Нуклеосомная коровая частица (НКЧ) состоит из фрагмента правозакрученной двойной спирали ДНК (длина варьируется от 145 до 147 п.н.), образующего два неполных витка левозакрученной суперспирали вокруг белкового диска. Белковый диск образован октамером белков-гистонов: H3, H4, H2A и H2B. Каждый гистон представлен в двух копиях (Рисунок 1 Б) [6]. НКЧ вместе с линкерной ДНК образует нуклеосому.

Первая атомистическая структура НКЧ была получена 28 лет назад [6], и на сегодняшний день число структур нуклеосом и их комплексов в базе данных

белковых структур PDB достигает более 500 [7]. Изучение динамики нуклеосом и их взаимодействий с белками хроматина продвинуло понимание функционирования генома с биофизической точки зрения [5,8].

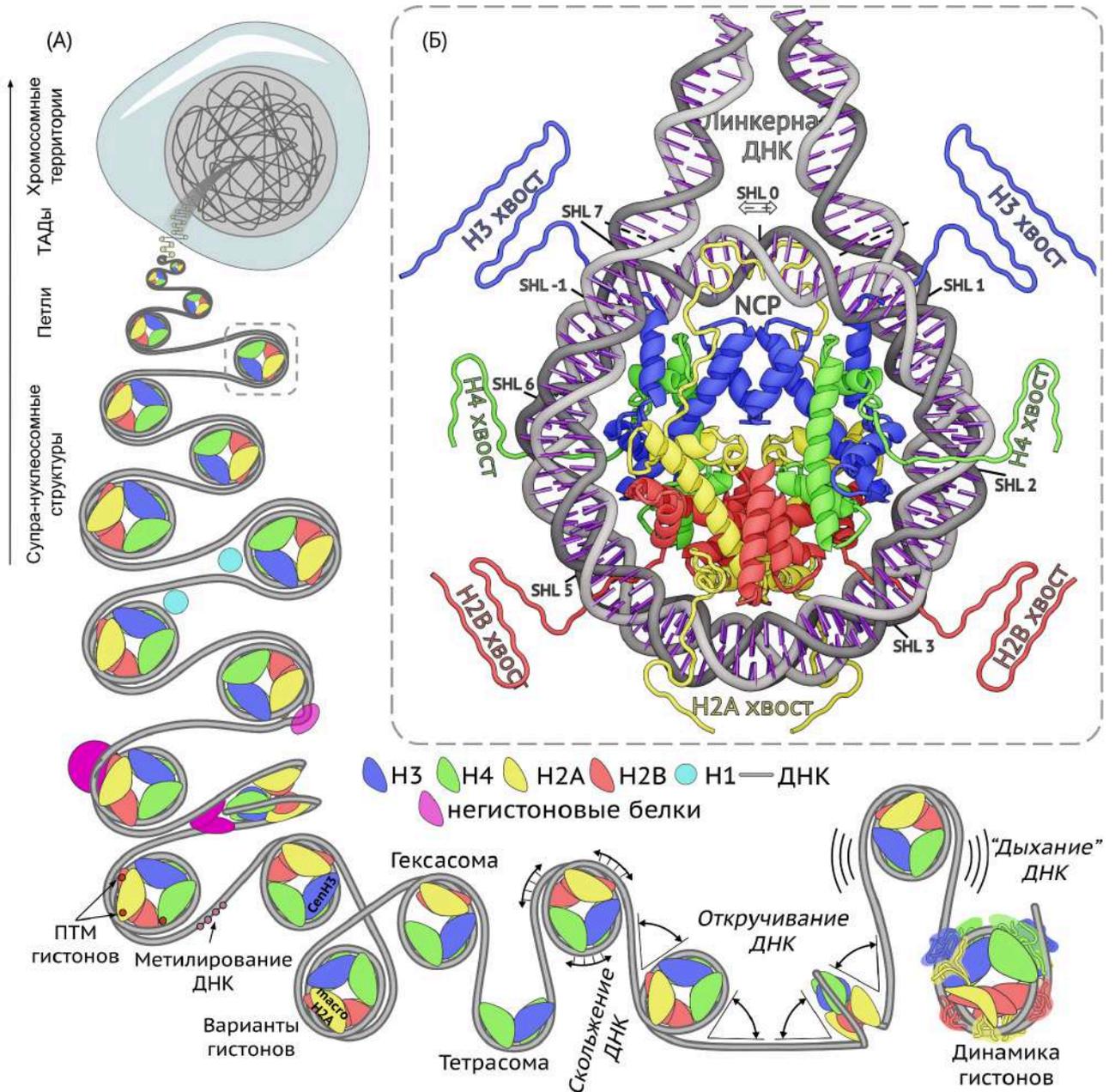


Рисунок 1. Структура и динамика нуклеосом. (А) Схематическое изображение организации хроматина из нуклеосом. Вариации в структуре, динамике и составе нуклеосом в контексте структуры хроматина. (Б) Детали структурной организации нуклеосомы.

Нуклеосома является носителем для эпигенетических меток. Гистоны несут большое количество сайтов пост-трансляционных модификаций (ПТМ), а

также может варьироваться аминокислотная последовательность гистонов. Так, существуют канонические гистоны H3, H4, H2A и H2B (также известные как кластерные гистоны, так как гены, кодирующие их, расположены в геноме в виде кластеров), транскрипция которых происходит в S-фазу клеточного цикла, и вариантыные формы гистонов (некластерные), транскрипция которых происходит в течение интерфазы [9]. ПТМ гистонов [10] и включение вариантовных форм гистонов в состав нуклеосом наравне с метилированием ДНК создают эпигенетический ландшафт, тонко регулирующий активность генов. Эпигенетические изменения имеют важную роль в старении и синесценции [11,12], различных заболеваниях человека, включая психические расстройства [13,14] и онкологические заболевания [15–17].

Для прохождения большинства геномных процессов требуется обеспечение доступа к ДНК, и нуклеосома представляет собой барьер для многих ДНК-связывающих белков. Исключение составляют пионерные транскрипционные факторы, способные взаимодействовать со связанной гистонами ДНК. Таким образом, динамика нуклеосом важна для функционирования генома [18]. Динамика нуклеосом реализуется в виде следующих процессов: откручивание/дыхание ДНК, АТФ-зависимое или независимое скольжение нуклеосом [19,20], образование субнуклеосомных и олигонуклеосомных частиц [21,22], взаимодействие нуклеосом с эффекторными белками хроматина [23], формирование наднуклеосомных структур хроматина с помощью других белков хроматина (Рисунок 1 А).

1.1.2. Экспериментальные подходы исследования структуры и динамики ДНК-гистоновых комплексов

Исследование структуры и динамики нуклеосом имеет ряд трудностей, как связанных со значительным размером (диаметр нуклеосомы – 10 нм), так и с содержанием структурных элементов разной природы: ДНК, глобулярные домены гистонов и внутренне неупорядоченные хвостовые участки гистонов (хвосты гистонов). Как уже было отмечено, известно довольно большое количество

структур нуклеосом и комплексов с ними, полученные методами рентгеноструктурного анализа (РСА) и крио-электронной микроскопии (криоЭМ) [7]. Оба источника структурной информации обладают рядом ограничений, основным из которых является статическое представление структур и не нативные условия (кристалл или низкие температуры). К тому же, хвосты гистонов не доступны для изучения этими методами и отсутствуют в большинстве известных экспериментальных структур. Стоит отметить, что нуклеосома является очень вариативной структурой (вариации последовательностей ДНК, последовательностей гистонов, посттрансляционных модификаций), при этом известные экспериментальные структуры содержат очень ограниченное число вариаций [24]. Другим источником трудностей исследования нуклеосом является широкий временной диапазон функционально значимых движений от отдельных участков гистонов или динамики вращения отдельных аминокислот в составе хвостов в наносекундном масштабе времен до сборки/разборки нуклеосом, происходящие в течение от нескольких секунд до нескольких минут [25,26].

Изучение динамики нуклеосом в физиологически релевантных условиях требует сочетания структурных, биофизических, биохимических методов и методов молекулярного моделирования, которые могут исследовать динамику нуклеосом на различных пространственно-временных масштабах (Рисунок 2). Знания о структуре и динамике нуклеосом в нативных условиях (в растворе) были получены такими экспериментальными методами, как ЯМР (ЯМР в растворе для исследования динамики гистоновых хвостов и твердотельный ЯМР для исследования динамики глобулярного домена гистонов) [25,27], микроскопия с применением флуоресцентных меток и измерение эффективности Фёрстеровского переноса энергии (FRET) для исследования структурных перестроек в диапазоне нескольких нанометров [28–30], малоугловое рассеяние рентгеновского излучения для определения гидродинамического радиуса нуклеосомы и общей геометрии нуклеосом [31,32], гидроксил-радикальный футпринтинг для определения позиционирования ДНК в нуклеосоме [33,34], эксперименты с оптическими/магнитными пинцетами в исследованиях процессов откручивания

нуклеосомной ДНК и измерение величины суперспирализации ДНК [35–37], атомно-силовая микроскопия (АСМ) для описания структурных перестроек нуклеосом в крупном масштабе, в том числе в динамике (высокоскоростная АСМ) [38,39,26].

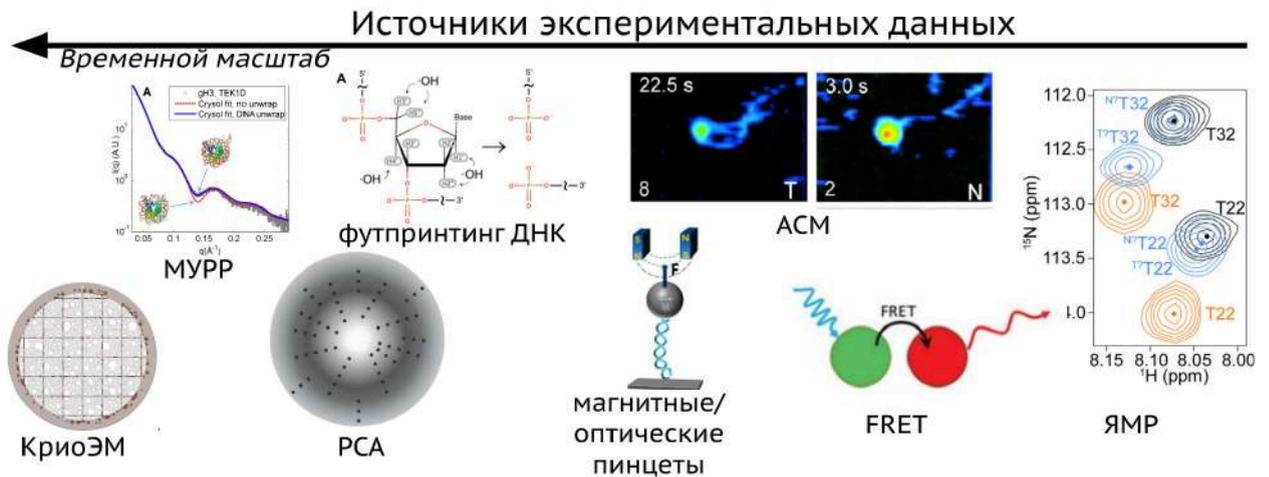


Рисунок 2. Экспериментальные методы исследования структуры и динамики нуклеосом.

1.1.3. Структура нуклеосомной ДНК

Нуклеосома имеет ось псевдосимметрии второго порядка – диадную ось, через которую проходит диадная пара нуклеотидов ДНК. Для обозначения сайтов на нуклеосоме используют параметр SHL , который в диаде равен 0, и изменение SHL на +1 или на -1 соответствует шагу двойной спирали вдоль октамера гистонов (что составляет примерно 10 п.н.) в сторону дистального или проксимального конца ДНК, соответственно (Рисунок 1 Б) [33]. Дистальный и проксимальный концы НКЧ также называют выходом из нуклеосомы и входом в нуклеосому и соответствуют значениям $SHL +7$ и -7 . Связывание ДНК гистонами происходит преимущественно за счет электростатических взаимодействий (ДНК имеет отрицательный заряд сахара-фосфатного остова, гистоны несут большое количество положительно-заряженных а.о. – лизинов и аргининов). Стабильность комплекса обеспечивается 14 сайтами ДНК-гистоновых контактов (по 7 с каждой стороны нуклеосомы), которые реализуются в местах нуклеосомы, где малая

бороздка ДНК ориентирована в сторону гистонового октамера. Области контактов расположены в сайтах с полуцелым значением SHL. H2A-H2B димер связывает нынешние полвитка суперспирали ДНК (SHL от ± 3 до ± 6), в то время как H3-H4 димер связывает внутренний участок нуклеосомной ДНК (SHL от ± 0 до ± 3).

Известно, что нуклеосома может связывать разные последовательности ДНК. Из структур нуклеосом, полученных методом РСА, показано, что в состав НКЧ может входить разное число пар нуклеотидов в зависимости от последовательности ДНК (145–147 п.н.), которые проходят один и тот же путь вдоль супервитка ДНК. Это происходит из-за способности нуклеосом «растягивать» фрагмент ДНК на одну пару нуклеотидов в пространствах между ДНК-гистоновыми контактами, который в свою очередь приобретает дополнительное скручивание двойной спирали для обеспечения правильной ориентации ДНК в соседних сайтах связывания гистонов. Такие «перекручивания» (также называемые дефектами кручения) встречаются в сайтах нуклеосомы SHL ± 2 и ± 5 . В состав НКЧ может входить 145 [40], 146 [6] и 147 [41] п.н. Путь ДНК по супервитку и ориентация ДНК относительно октамера гистонов могут быть описаны путем измерения угла кручения пары нуклеотидов относительно плоскости нуклеосомы, которое было названо в ранних работах относительным кручением (relative twist) [42] (Рисунок 3). В работе Армеев и др. [43] было смоделировано движение релаксации такого дефекта кручения из сайта SHL -5 при моделировании кристаллической структуры PDB ID 3LZ0 (145 п.н.).

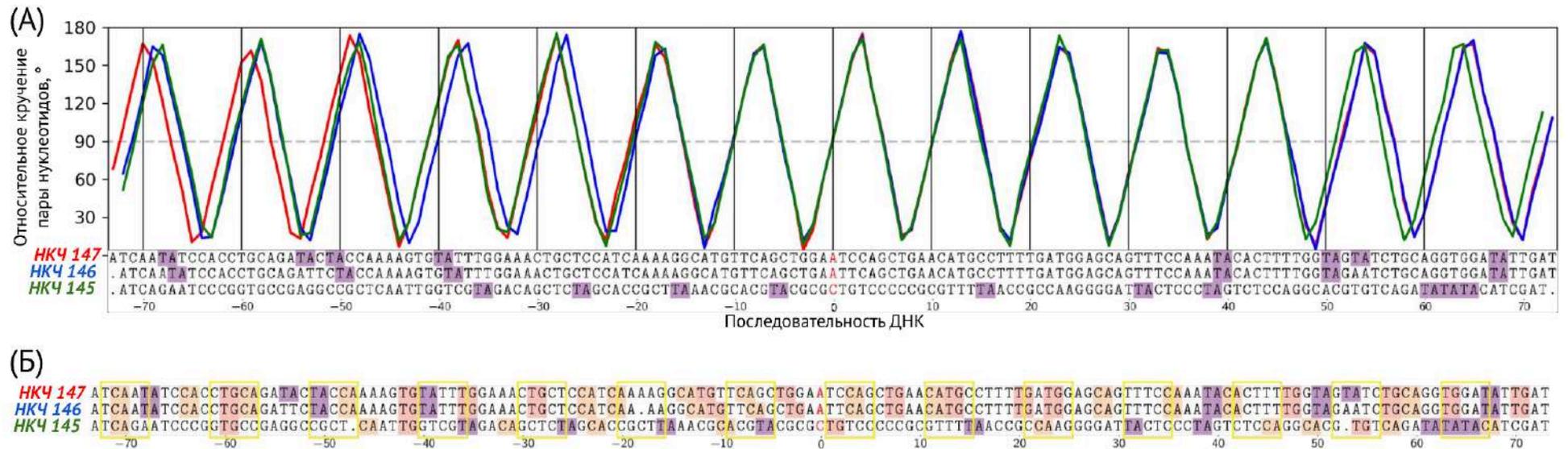


Рисунок 3. Сравнение последовательностей нуклеосомных ДНК (НКЧ 145 – Widom 601 позиционирующая последовательность (PDB ID 3LZ0), НКЧ 146 – палиндромная α -сателлитная ДНК (PDB ID 1AOI), НКЧ 147 – псевдо палиндромная α -сателлитная ДНК (PDB ID 1KX5)). (А) Выравнивание последовательностей ДНК относительно положения диады и профили относительного кручения их пар нуклеотидов. Диадная пара нуклеотидов отмечена красным. гибкие ТА динуклеотиды отмечены фиолетовым. (Б) Выравнивание последовательностей, полученное путем структурного выравнивания соответствующих структур нуклеосом. Дефекты кручения отмечены на выравнивании в виде делеций. Желтые рамки выделяют фрагменты, ориентированные в сторону малой бороздки ДНК, Пиримидин-пуриновые пары отмечены цветом (ТА - фиолетовый, СА - оранжевый, ТГ - розовый).

Связь между конформацией нуклеосомной ДНК и ее последовательностью обуславливается ее механистическими свойствами. Показано, что определенные динуклеотидные пары увеличивают стабильность нуклеосомы в определенных позициях на нуклеосоме [44], что справедливо для генома в целом, как было показано на данных MNase-seq экспериментов [45]. А именно, динуклеотиды АА, ТТ и ТА стабилизируют нуклеосому, находясь в полуцелых SHL (0,5, 1,5 и т.д.), в которых малая бороздка ДНК сужена относительно В-формы и ориентирована в сторону октамера гистонов. Динуклеотиды GC стабилизируют нуклеосому в целых SHL, в которых малая бороздка ДНК расширена и ориентирована от октамера [46]. Интересно, что N-хвосты гистонов H2A и H4 также важны для позиционирования нуклеосом в геноме и узнавании АТ-богатых и GC-богатых участков ДНК [47], однако молекулярный механизм такого узнавания требует дальнейшего исследования.

1.1.4. Структура глобулярного домена гистонов и важность исследования его динамики

Белковое ядро нуклеосомы состоит из тетрамера гистонов (H3-H4)₂, связывающего центральные 60 п.н. нуклеосомной ДНК, и двух димеров гистонов H2A-H2B, удерживающих внешние полувитки суперспирали по обе стороны от тетрамера (по 30 п.н. на каждый димер). Тетрамер гистонов (H3-H4)₂ состоит из двух димеров H3-H4, имеющих сходное строение с димером гистонов H2A-H2B (Рисунок 4 А, Б). Все 4 типа гистонов имеют схожие элементы вторичной структуры, к которым относятся три α-спирали (α1, α2 и α3), соединенные петлями L1 и L2; Эти элементы вместе образуют так называемый гистоновый фолд. Самыми длинными спиралями гистонов являются α2-спирали. Помимо элементов гистонового фолда, у разных гистонов имеются дополнительные элементы в глобулярном домене, такие как αN-спираль гистона H3, α1-ext спирали гистонов H4 и H2A (продолжение α1-спиралей), а также αC-спирали гистонов H2A и H2B (Рисунок 5). Гистоны образуют димеры в виде структурного элемента «рукопожатие» («handshake motif»), который образуется через перекрещивание

антипараллельно направленных $\alpha 2$ -спиралей гистонов пары. Такой мотив димеров создает внутреннюю псевдосимметрию димера (Рисунок 4 Б). Относительно оси псевдосимметрии элементы гистонового фолда одного гистона пары переходят в те же элементы гистонового фолда второго гистона пары (например, L2-петля H2A переходит в L2-петлю H2B).

В формировании сайтов связывания нуклеосомной ДНК участвуют группы ДНК-гистоновых контактов; основным контактом является взаимодействие так называемых якорных аргининов, которые встраиваются в малую бороздку и взаимодействуют с фосфатами обеих цепей ДНК (такие аргинины также называются ключевыми или якорными) (Рисунок 4 А), [6]. Каждый димер гистонов H2A-H2B несет по 3 якорных аргинина, формирующие два L1-L2 сайта связывания (фланкирующие) и центральный $\alpha 1$ - $\alpha 1$ сайт. Якорными аргининами L1-L2 сайтов димера H2A-H2B являются R77 H2A (удерживает SHL 5,5) и R42 H2A (удерживает SHL 3,5). Якорный аргинин в сайте $\alpha 1$ - $\alpha 1$ димера H2A-H2B является R33 гистона H2B (удерживает SHL 4,5). Димеры гистонов H3-H4 также несут по 3 якорных аргинина, формирующих сайты связывания во внутреннем витке ДНК, а также H3 несет дополнительный якорный аргинин R49, взаимодействующий с малой бороздкой внешнего витка ДНК (в сайте входа/выхода из нуклеосомы, показан серым на Рисунке 3 А). Внутренний виток ДНК удерживается следующими якорными аргининами гистонов H3 и H4: R83 H3 в L1-L2 сайте в области SHL 0,5, R45 H4 в L1-L2 сайте в области SHL 2,5 и R63 H3 в $\alpha 1$ - $\alpha 1$ сайте в области SHL ,5. Взаимодействие димеров друг с другом образуется путем формирования четырех-спирального контакта («four-helix bundle»): тетрамер (H3-H4)₂ имеет четырех-спиральный контакт H3-H3 (в контакте участвуют спирали $\alpha 2$ и $\alpha 3$), а взаимодействие между тетрамером (H3-H4)₂ и димером H2A-H2B формируется путем четырех-спирального взаимодействия H4 и H2B ($\alpha 2$ и $\alpha 3$ спирали) [6]. Кроме четырех-спирального контакта H4 и H2B, во взаимодействии димеров H2A-H2B с тетрамером H3-H4 участвует докинг-домен H2A гистона (Рисунок 4). В недавних работах показана возможность четырех-спиральных контактов между гистонами H4-H4, в

результате чего из двух тетрамеров $(H3-H4)_2$ может сформироваться частица, подобная нуклеосоме – H3-H4 дитетрасома [48,49].

Роль пластичности и динамики глобулярного домена гистонов в функционировании хроматина не так ясна, как, например, откручивание нуклеосомной ДНК, приводящее к открытию сайтов связывания и разрыхлению хроматиновых нитей. Существует ряд экспериментальных свидетельств важности динамики гистонов для функционирования нуклеосом. К ним относится изменение структуры и динамики нуклеосом с вариантными формами гистонов [50]. Далее, ряд экспериментов по введению межмолекулярных сшивок в димерах гистонов, влияющих на процессы скольжения [51] и ремоделирования [52] хроматина, на организацию хроматина на более высоком уровне [53]. Сшивки в димере H2A-H2B в работе Viločarić et al. приводили к формированию гексасом, но не стабильных нуклеосом, что свидетельствует о важности пластичности димера в процессе сборки нуклеосом [54]. Исследование внутренней динамики глобулярного ядра нуклеосомы также проводится методами твердотельного ЯМР [27]. Результаты таких экспериментов позволили авторам исследования выделить динамические пути в белковой части нуклеосомы, координирующие динамику отдельных частей нуклеосомы [55]. Также известен феномен аллостерии динамических процессов в нуклеосоме (изменение свойств в некоторой части нуклеосомы при изменениях на противоположной стороне нуклеосомы). Одним из примеров такой аллостерии является описанный выше эффект стабилизации связывания конца ДНК при откручивании противоположного конца [55]; можно предположить, что аллостерическая регуляция происходит благодаря пластичности гистонового ядра нуклеосомы.

Динамика глобулярного домена гистонов изучается в контексте влияния мутаций гистонов, ассоциированных с онкологиями, на структуру хроматина, так как многие из таких мутаций находятся в глобулярном домене гистонов и, предположительно, влияют на стабильность нуклеосом [16]. В исследовании ряда онкомутаций гистонов с использованием расчетов программой AlloSigma, проведенном научной группой А. Панченко, были построены карты

аллостерического влияния мутаций на динамику гистонов, несущих мутации [56]. Наибольший эффект был показан для следующих онкомутаций глобулярного домена гистонов: H2A G46V (N-концевой а.о. α 2-спирали H2A), H2B S55L (N-концевой а.о. α 2-спирали H2B), H2B S64Y/F (а.о. внутри α 2-спирали). Оказалось, что мутация H2B S55L заметно влияет и на динамику глобулярного домена H2A гистона: дестабилизирует α 1-спираль и N-конец α 2-спирали, но стабилизирует C-конец α 2-спирали и α C-спираль. Авторы детально исследовали эту мутацию и показали, что она вызывает значительные дефекты роста культуры дрожжей и значительно повышает скорость накопления мутаций при делении клеток. В работе Onyema et al. методом МД исследовалась пара онкомутаций в позициях, формирующих контакт в области четырех-спирального контакта H2B и H4, – H2B E76K и H4 R92T [57]. Авторы подтвердили (в расчетах и в экспериментах по измерению температуры плавления нуклеосомы) гипотезу о нарушении взаимодействий между димером H2A-H2B и тетрамером (H3-H4)₂ при внесении таких мутаций. Также авторы отметили значительное усиление динамики H2B гистона в области L1- и L2-петель при замене E76K, находящейся в составе α 2-спирали. Эти свидетельства обращают внимание исследований на динамику глобулярной части гистонов.

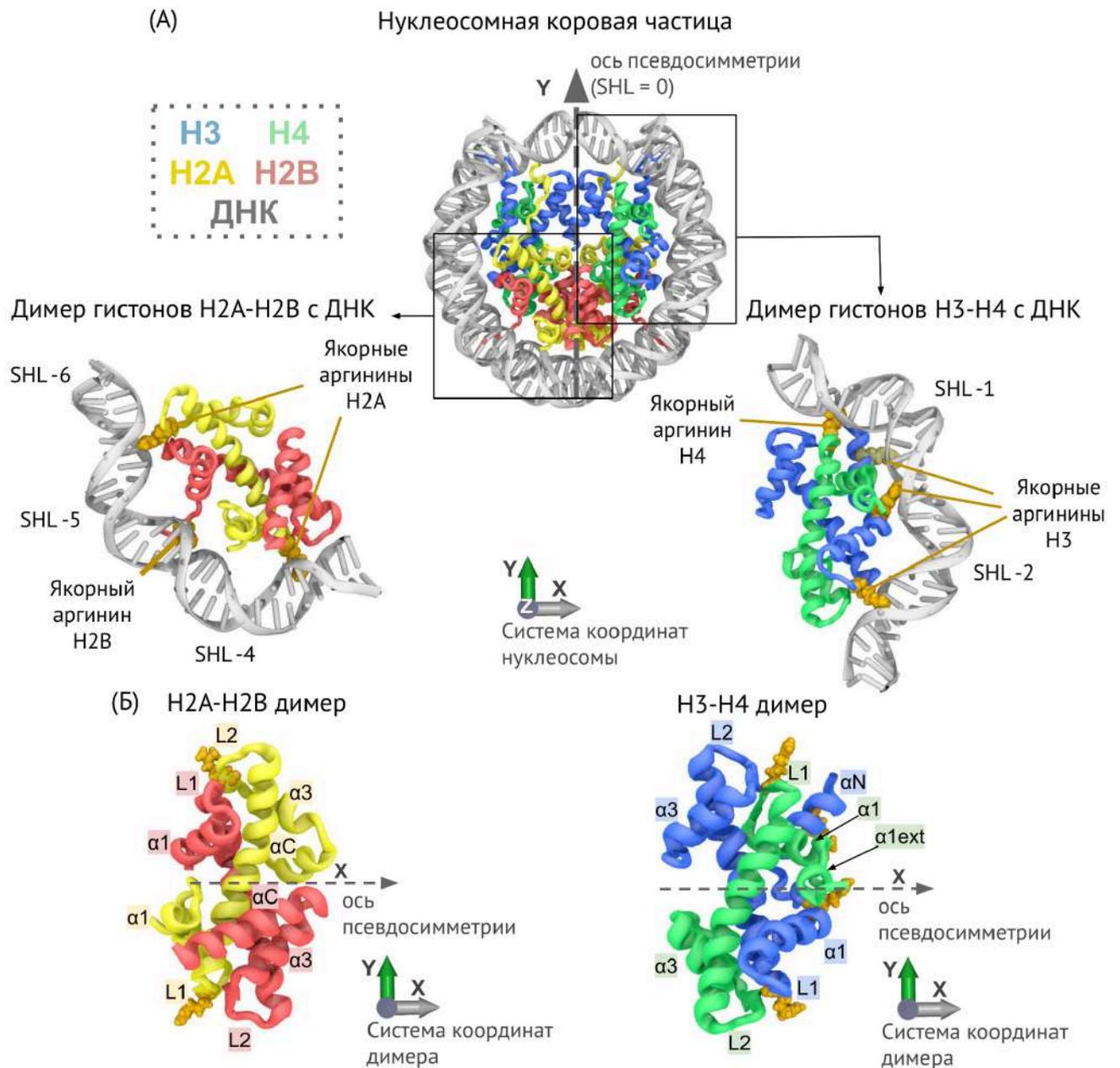


Рисунок 4. Структура НКЧ и гистонов. (А) Общий вид НКЧ и димеров гистонов H2A-H2B и H3-H4 в контексте нуклеосомы. Гистоновые хвосты в структуре не показаны. Оранжевым показаны якорные аргинины гистонов, формирующие стабильные контакты с ДНК путем встраивания в малую бороздку. Якорный аргинин H3 R49 показан серым, так как взаимодействует с малой бороздкой ДНК в сайте входа/выхода из нуклеосомы (этот фрагмент ДНК не показан на панели справа). (Б) Детали строения димеров гистонов H2A-H2B и H3-H4. Гистоновые хвосты в структуре не показаны. Указаны оси псевдосимметрии второго порядка, а также элементы вторичной структуры гистонов, соответствующие надписям на панели В.

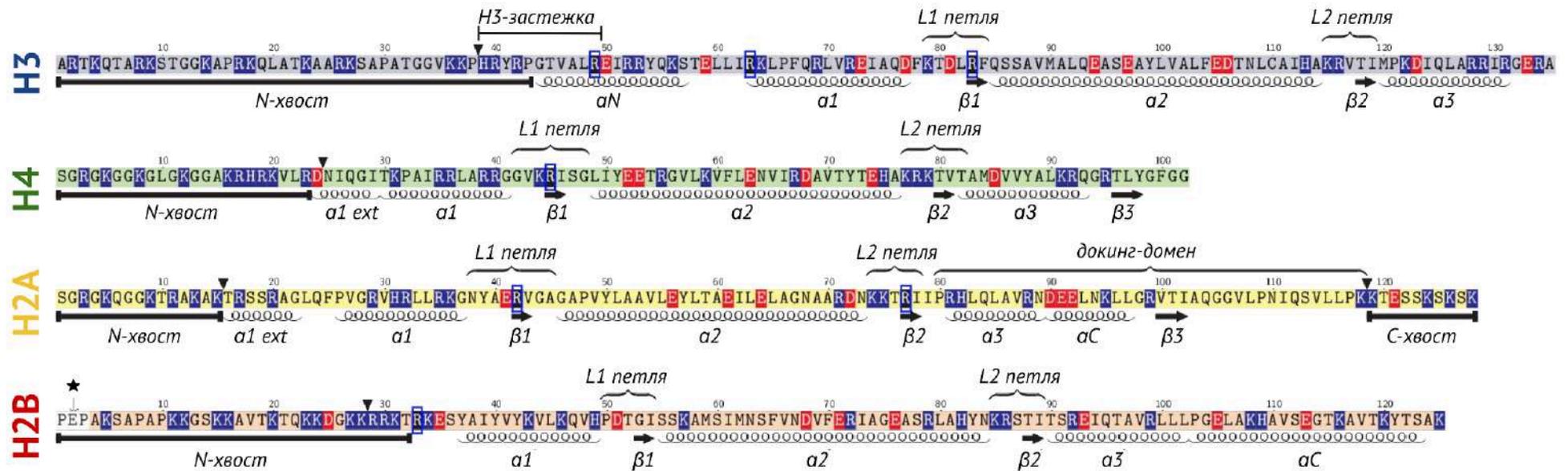


Рисунок 5. Аминокислотные последовательности гистонов с аннотацией элементов вторичной структуры. Синие рамки обозначают якорные аргинины. Отрицательно- и положительно-заряженные аминокислоты показаны красным и синим цветами, соответственно. Черные треугольники обозначают сайты обрезки гистоновых хвостов, используемые в МД расчетах с укороченными хвостами. Звезда обозначает аминокислоты гистона H2B, отсутствующие в рекомбинантных формах гистона.

1.1.5. Структура и роль неупорядоченных хвостов гистонов

Помимо нуклеосомной ДНК и глобулярной части гистонов нуклеосома содержит и внутренне неупорядоченные участки – хвосты гистонов –, играющие важнейшую роль в биологии хроматина. Всего в нуклеосоме присутствует 10 хвостов гистонов (по 5 с каждой стороны, расположенные псевдосимметрично относительно диады). N-концевые фрагменты есть у всех типов гистонов (H3, H4, H2A и H2B), а также у H2A есть C-концевой неупорядоченный фрагмент (Рисунок 5). Самый короткий хвост имеет длину 10 а.о. (С-хвост H2A), а самый длинный состоит из 43 а.о. (N-хвост H3).

Гистоновые хвосты несут большинство сайтов ПТМ гистонов, являющихся эпигенетическими метками хроматина. Описано порядка 30 типов модификаций, встречающихся в гистонах [10,58]. Для некоторых меток хорошо изучена из функциональная роль и молекулярный механизм выполнения эпигенетической функции. Например, метка H3K9me_{2/3} (метилование лизина в положении 9 гистона H3) связывается хромодоменом белков группы HP1 (heterochromatin proteins 1), участвуя в формировании гетерохроматина. Метка H3K27me₃ (метилование лизина в положении 27 гистона H3) связывается хромодоменом белков репрессивного комплекса поликомб (PRC, polycomb repressive complex), участвуя в репрессии транскрипции. Ацетилирование лизинов, напротив, обычно присутствует множественно (одновременно по ряду позиций в разных гистонах), активируя транскрипцию генов через ослабление взаимодействия хвостов с ДНК, усиление откручивания ДНК и декомпактизацию хроматина [59–62]. В *in vitro* экспериментах показано, что множественное ацетилирование влияет на физическое состояние хроматина, оказывая дестабилизирующее влияние на способность хроматина к жидко-жидкостному фазовому разделению [63]. Согласно концепции цветов хроматина, большинство ПТМ гистонов работают не как «включатели» и «выключатели» генов, но состояния хроматина определяются комбинацией числа ПТМ гистонов и белков ассоциированных хроматина [64,65]

В работах последнего десятилетия описаны новые модификации гистонов, для которых предполагается функция связывания метаболического состояния

клеток с активностью транскрипции. К таким модификациям относится лактинилование гистонов, способное активировать транскрипцию генов, необходимых для проведения гликолиза, в ответ на увеличение содержания лактата во внутриклеточном пространстве [66]. Другим примером является моноаминилирование (присоединение дофамина, серотонина и гистамина) гистонов по положению H3Q5, которое активирует транскрипцию генов в нейронах [67]. Авторы предполагают, что этот механизм лежит в основе связи между локальным содержанием моноаминов в клетке и нейронной пластичностью.

Известен ряд мутаций гистонов, ассоциированных с развитием опухолей, часть из которых пересекается с сайтами ПТМ и, по-видимому, нарушают нормальную работу генома через нарушение эпигенетических путей регуляции [16].

Приведенные свидетельства делают исследование структуры и динамики гистоновых хвостов крайне важным вопросом. В то же время, в связи с их неупорядоченной структурой, в таких исследованиях применяется ограниченный набор методов. Данные о динамике хвостов получены методами спектроскопии ЯМР [25], микроскопии FRET [68,69] и химического сшивания (cross-linking) [69,70]. Молекулярное моделирование дает важнейшую информацию о функционировании гистоновых хвостов в атомистическом приближении.

1.1.6. Структура и динамика нуклеосом с вариантными формами гистонов

После прохождения репликации, большинство нуклеосом имеют в составе канонические гистоны, экспрессия генов которых происходит в S-фазу клеточного цикла. В течение клеточного цикла канонические гистоны заменяются вариантными формами гистонов, отличающимися в большей или меньшей степени по последовательности [71]. Вариантные гистоны в составе нуклеосом могут влиять на структуру и динамику нуклеосом и играть важную роль в регуляции работы генома и патогенезе [50]. В последние годы эффекты

встраивания гистоновых вариантов на структуру нуклеосом исследовали методами криоЭМ [50], МД [72] и другими.

Нуклеосомы с вариантными формами гистонов могут отличаться разной термостабильностью (температурой выхода H2A-H2B димеров из состава нуклеосомы с образованием гексасомы и тетрасомы), что было показано для вариантных гистонов H2A.X, H2A.Z.1 [50]. Вариантные нуклеосомы могут отличаться и разной силой ДНК-гистоновых контактов в области входа/выхода из нуклеосомы, что выражается в разной подвижности концов нуклеосомной ДНК (H2A.B, H2A.L, CENP-A) и устойчивости нуклеосом к повышению концентрации ионной силы раствора (H2A.Z.1 и H2A.Z.2). Например, в криоЭМ структурах нуклеосом с вариантом H2A.B длина нуклеосомной ДНК составляет 120-130 п.н. вместо примерно 150 [73]. В работах методом МД, в согласии с экспериментальными данными, подтверждается ослабление контактов H2A L2-петли с ДНК (второй барьер откручивания), связанное с изменениями С-конца гистона [74,75]. Для CENPA показано стабильное состояние с откручиванием 16-20 п.н., связанное с укороченной α -спиралью (первый барьер откручивания) по сравнению с каноническим гистоном H3 [76]. Кроме механизма влияния вариантов на стабильность нуклеосом, у вариантных гистонов могут быть дополнительные домены, например, макродомен гистона макроH2A (дополнительный домен составляет 30 кДа) [77].

С точки зрения структуры и динамики вариантных нуклеосом, часто рассматривается влияние вариантов на взаимодействия гистонов с ДНК и динамику откручивания нуклеосомной ДНК, а также на стабильность контактов между гистонами внутри октамера. Так, для вариантных гистонов макроH2A, H2A.Z.1 и H2A.Z.2 было показано изменение конформации L1 петли и L1-L1 взаимодействия между копиями гистонов в составе нуклеосом (сравнение структур петель приведено в обзоре [50]). L1-L1 взаимодействие формирует интерфейс взаимодействия двух димеров H2A-H2B в составе нуклеосомы, играя важную роль в стабильности нуклеосом. Так, для гистонов H2A.Z.1 показана меньшая термостабильность по сравнению с каноническими нуклеосомами [78], а

гистон макроH2A дает повышение стабильности нуклеосомы, особенно высокое при асимметричном внесении (одна копия является вариантной) [79]. Далее приведено описание двух вариантных форм гистона H2A: H2A.Z и H2A.J.

Вариант H2A.Z является общим для всех эукариот вариантом, играющим роль в таких процессах, как транскрипция, репарация ДНК и другие [80]. H2A.Z часто встречается в составе т.н. +1 нуклеосомы (хорошо позиционированная нуклеосома, расположенная сразу после точки начала транскрипции). Предполагается, что нуклеосомы с вариантными гистонами способствуют прохождению транскрипции благодаря уменьшению нуклеосомного барьера транскрипции [81]. Нуклеосомы с вариантом H2A.Z имеют структурные отличия от канонических нуклеосом в виде повышения подвижности концевой фрагмента ДНК и измененной конформации L1-петли [50]. Эти отличия, как предполагалось ранее, делают ремоделер SWR1, выполняющий встраивание гистона H2A.Z в состав нуклеосом, способным отличать каноническую нуклеосому от вариантной. Однако выяснилось, что активность ремоделера падает в два раза при внесении всего двух замен в последовательность канонического H2A, расположенных во внутреннем сайте нуклеосомы – N-конце $\alpha 2$ -спирали – и недоступных для узнавания через прямое взаимодействие [82].

Вариант H2A.J имеет малое число замен относительно канонических гистонов у человека [83], однако играет роль в процессах синесценции клеток и в развитии некоторых видов опухолей. Интригующими являются результаты по измерению термостабильности нуклеосом с вариантом H2A.J, показавшие большую стабильность вариантных нуклеосом по сравнению с каноническими [84]. В то же время, исследование структуры вариантной нуклеосомы методом криоЭМ показало полное совпадение структур вариантной и канонической нуклеосом.

1.1.7. Структура и динамика субнуклеосомных структур

Динамическая сборка и разборка нуклеосом играет важнейшую роль в сохранении эпигенетического контекста после прохождения транскрипции и

репликации [85]. В частности, активация генов, транскрибируемых РНК-полимеразой II (Pol II), часто сопровождается вытеснением гистонов с промоторов и формированием более открытой структуры хроматина в транскрибируемых областях [86]. Транскрипция тел генов сопровождается преимущественной потерей димеров H2A-H2B по сравнению с тетрамером H3-H4 [87]; отличия в потере димеров коррелируют с плотностью Pol II и появлением субнуклеосом. В высокотранскрибируемых генах теряется более 50% гистона H2B, в то время как обнаруживается лишь незначительная потеря H4. Более того, недавние исследования с высоким разрешением выявили высокую структурную гетерогенность нативного хроматина, содержащего большое количество неканонических структур и субнуклеосомных частиц [88].

Сборка нуклеосом происходит следующим образом: тетрамер гистонов (H3-H4)₂ связывается с фрагментом ДНК, после чего происходит поэтапное присоединение димеров гистонов H2A-H2B с двух сторон от тетрамера. Частица, образованная на первом этапе, называется тетрасомой; переходное состояние с одним димером H2A-H2B называется гексасомой (Рисунок 6). В процессе сборки нуклеосом *in vivo* участвуют белки-шапероны [89–91]. Разборка нуклеосом является динамическим процессом и может происходить как спонтанно [26], так и в результате транскрипции, репликации и ремоделирования хроматина [92–94]. Кроме гистонов H3, H4, H2A и H2B (называемых коровыми гистонами), с ДНК может связываться пятый вид гистонов – линкерный гистон H1. Линкерный гистон связывается с линкерной частью ДНК нуклеосомы рядом с входом/выходом из нуклеосомы, в результате чего образуется хроматосома [95]. H1 гистон стабилизирует нуклеосому и участвует в формировании структур более высокого уровня иерархии.

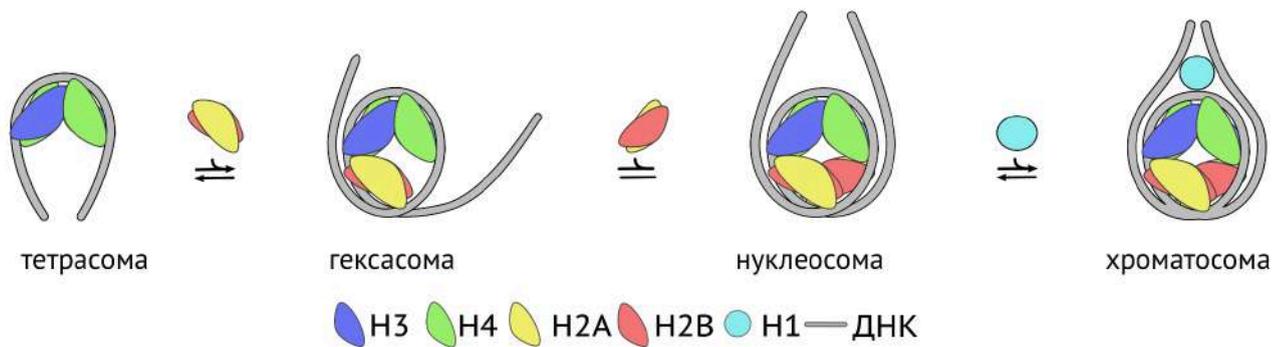


Рисунок 6. Схематическое изображение процесса сборки и разборки нуклеосом и хроматосом.

Нуклеосома представляет собой физический барьер для транскрипции с помощью Pol II и репликативного аппарата [96,97]. Поскольку гексасомы и тетрасомы содержат меньше гистонов, связанных с ДНК, вполне вероятно, что их образование может способствовать транскрипции через хроматин, как было показано для гексасом *in vitro* [98,99]. Ожидается, что тетрасомы являются более динамичными структурами, чем нуклеосомы. Известно, что тетрасомы, в отличие от нуклеосом, могут совершать переходы между левосторонней и правосторонней суперспиральной конформацией ДНК с сохранением положения гистонов на ДНК [100,101]. Биофизические свойства тетрасом и гексасом были охарактеризованы в ранних работах начала 2000-х. Ранние исследования показали, что тетрамер (H3-H4)₂ экранирует участок ДНК длиной около 70 п.н. от расщепления нуклеазой, из которых 10 п.н. относительно слабо защищены [102,103]. Тетрамер (H3-H4)₂ менее стабилен по сравнению с полной нуклеосомой, что дает высокую степень свободы, которая может определять его уникальную способность совершать переходы между положительной и отрицательной суперспирализацией [104]. Центральная область (H3-H4)₂ имеет схожую структуру в тетрамере и октамере, но другие области демонстрируют гораздо более высокую структурную гетерогенность в тетрамере [105]. Хотя расположение контактов присутствующих в структурах гексасом и тетрасом гистонов с ДНК аналогично наблюдаемому в нуклеосомах, потеря димеров гистонов H2A-H2B приводит к масштабным флуктуациям фрагментов ДНК, которые в нуклеосомах были бы связаны с димерами H2A-H2B при их присутствии [106]. Переход от нуклеосомы к

гексасоме, вероятно, вызывается асимметричным разворачиванием ДНК [31]. Недавние исследования частично собранных нуклеосом показали, что для хвостов Н3 характерно усиление динамики и доступности для связывания. Также показана асимметрия поведения хвостов в гексасомах [107].

1.2. Молекулярное моделирование как инструмент исследования структуры и динамики ДНК-гистоновых комплексов

Молекулярное моделирование, в частности моделирование МД, становится незаменимым инструментом изучения динамики нуклеосом, применяемым как для интерпретации экспериментальных данных (в рамках интегративного подхода к исследованию), так и как источник уникальной информации о структуре и динамике молекул. Суть метода МД заключается в проведении вычислительных экспериментов (часто требующих суперкомпьютерных мощностей), в процессе которых происходит имитирование взаимных движений атомов молекулярной системы и молекулярных взаимодействий в соответствии с физически обоснованными моделями. Результатом МД расчета является траектория МД – развитие молекулярной модели во времени.

1.2.1. Обзор методов моделирования

Молекулярное моделирование нуклеосом может проводиться с использованием физических моделей с различным временным масштабом и уровнем детализации (Рисунок 7), [108]. Моделирование МД в атомистическом представлении обеспечивают самый точный уровень детализации, доступный для исследования нуклеосом, но требует больших затрат вычислительных ресурсов. В настоящее время атомистическая МД доступна для изучения динамики нуклеосом на временных масштабах до нескольких десятков микросекунд. Самой большой моделью с нуклеосомами в составе, которая была смоделирована методом атомистической МД, являются целый ген, динамика которого смоделирована в течение времени 10 пс (такие времена далеки от характерных времен функционально значимых движений молекул) [109]. Наибольшая система из нуклеосом, на основе моделирования которой в атомистическом приближении уже были получены функционально значимые наблюдения, является комплекс из восьми нуклеосом, соединенных линкерной ДНК [110]. Расширение пространственно-временного масштаба возможно при применении методов крупнозернистого моделирования. Они используют представление групп атомов в

виде «шариков», и обеспечивают меньшую детализацию и точность при моделировании межмолекулярных взаимодействий. Примерами процессов, продемонстрированных методами крупнозернистой динамики, но не атомистической МД, являются моделирование сборки/разборки нуклеосом [111] и скольжения нуклеосом [112]. Мезомасштабное моделирование направлено на исследование хроматина в еще более крупном масштабе. Часто в мезомасштабном представлении нуклеосомы представляются как отдельные частицы со сложными потенциалами взаимодействия и геометрическими характеристиками, параметризация которых опирается на результаты атомистического моделирования [113].

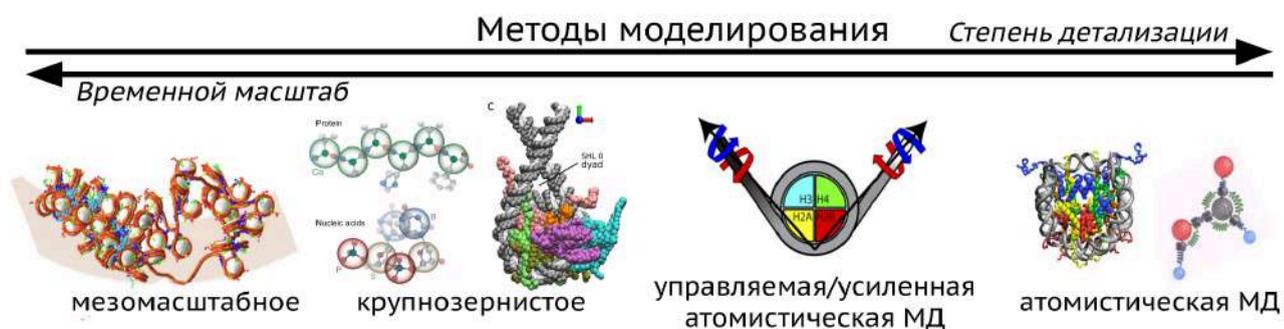


Рисунок 7. Методы моделирования в изучении структуры и динамики хроматина.

1.2.2. Основы метода атомистического МД моделирования

В основе метода МД моделирования лежит представление молекулярной системы в виде взаимодействующих материальных точек в соответствии с классической механикой [114]. Моделирование МД в атомистическом приближении, соответственно, представляет в виде материальных точек отдельные атомы молекул. Для постановки задачи расчета межатомных взаимодействий и кинетических параметров атомов необходимо знать начальные координаты атомов. Координаты стартовой структуры могут происходить как из известных структур молекул, полученных экспериментально, так и из заданных искусственно положений атомов (могут быть получены методами предсказания структур с применением искусственного интеллекта, моделирования по

гомологии, молекулярного докинга или же могут быть построены в ручном режиме с использованием программ для молекулярной визуализации). Для нуклеосом исследователями часто применяется гибридный подход к построению исходных моделей. В частности, гистоновые белки имеют концевые участки с внутренней неупорядоченностью (гистоновые хвосты), не разрешенные в большинстве экспериментальных структур (исключение составляет модель нуклеосом PDB ID 1KX5 [41]). Так как внутренняя неупорядоченность предполагает широкий конформационный ансамбль состояний, то построение исходной модели хвостов гистонов искусственно не приводит к внесению артефактов в структуре нуклеосомы, но демонстрирует широкий набор результирующих конформаций.

В МД моделировании взаимодействия между атомами описываются функцией потенциальных взаимодействий, зависящей от координат атомов. Компоненты потенциальной функции разделяются на две группы: невалентные (парные атом-атомные взаимодействия) и валентные (взаимодействия между атомами, соединенными ковалентными связями). Валентные взаимодействия включают в себя энергии изменения длин связей, углов между группами из трех атомов, двугранных углов между группами из четырех атомов и плоских групп (таких как пептидная связь). К парным взаимодействиям относятся кулоновские (электростатические) и Ван-дер-Ваальсовы (диполь-дипольные) взаимодействия:

$$U = U_{\text{валентных связей}} + U_{\text{валентных углов}} + U_{\text{торсионных углов}} + \quad (1)$$

$$+ U_{\text{плоских групп}} + U_{\text{Ван-дер-Ваальс}} + U_{\text{кулоновские взаимодействия}}$$

Наличие описанных компонент потенциальной функции взаимодействия является общим звеном вычисления межатомных взаимодействий в разных протоколах моделирования, но представление отдельных компонент может отличаться. Форма потенциалов и набор констант для их вычисления задается в так называемых силовых полях. В настоящее время наиболее активно развивающимися группами силовых полей для моделирования макромолекулярных объектов (таких как белки и ДНК) являются силовые поля

группы Amber [115] и CHARMM [116]. Нередко применяются гибридные силовые поля; например, при моделировании нуклеосом применяется базовое силовое поле, разработанное для описания динамики белков, в комбинации с силовыми полями и коррекциями к ним для ДНК. Подробно о развитии силовых полей и об исследовании их применимости к моделированию нуклеосом описано в разделе 1.2.3.

Взаимодействия каждого атома со всеми другими атомами модели определяют потенциальную энергию этого атома в определенный момент времени. Градиент потенциальной энергии определяет силу, оказываемую на атом всеми другими атомами.

$$F_i = - \frac{\partial U(r_1, \dots, r_N)}{\partial r_i} \quad (2)$$

Переход от описания энергий взаимодействия атомов к кинетическим параметрам осуществляется через численное решение уравнений классической механики (второго закона Ньютона), которое определяет направление и величину ускорения движения частицы:

$$m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} = F_i, i = 1, \dots, N \quad (3)$$

Так как такая постановка задачи требует решения уравнений с производными второго порядка (является задачей Коши второго порядка), то для нахождения решения необходимо знание исходных координат атомов и исходных скоростей. Скорости задаются в соответствии с распределением Максвелла. Для численного решения уравнений движения (расчет новых координат и скоростей атомов на основе текущих координат и скоростей) могут использоваться разные схемы (схема Верле, алгоритм LeapFrog и др.). Шаг интегрирования выбирается достаточно маленьким, чтобы не возникало артефактов моделирования, связанных с численным решением уравнений движения и допущением, что действие сил на заданном промежутке времени меняется незначительно. Обычно шаг интегрирования задается равным 2 фс. Допустимо использование большего шага

интегрирования (4 фс) при применении подхода Hydrogen mass repartitioning (HMR), в основе которого перераспределение масс между «тяжелыми» атомами (все, кроме водорода) и атомами водорода, что позволяет избежать быстрого накопления ошибки расчета в высокочастотных колебаниях связей.

Важно отметить, что в простейшем случае возможно моделирование МД единичной молекулы в вакууме, однако данный подход дает не нативное поведение моделей. Для воспроизведения свойств окружающей среды используются периодические граничные условия, применение термостата/баростата и моделирование растворителя и ионов. Периодические граничные условия представляют собой имитирование образов расчетной ячейки в пространстве, которые позволяют избегать артефактов, связанных с краевыми условиями (устраняется граница раствор-вакуум). Это позволяет производить расчет динамики компонентов ячейки ограниченного размера, которая является частью непрерывного пространства, заполненного периодическими образами ячейки. Использование термостата и баростата имитирует обмен температурой и энергией между расчетной ячейкой и средой (как правило, моделирование происходит в NVT или NPT канонических ансамблях). Для моделирования растворителя используются как неявные модели (представляющие растворитель в виде непрерывной диэлектрической среды), так и явные модели растворителя (например, трехточечные (TIP3P, SPC/E), четырехточечные (OPC, TIP4P-D) и пятиточечные (TIP5P, ST2) модели воды).

1.2.3. Направления развития протоколов атомистической МД

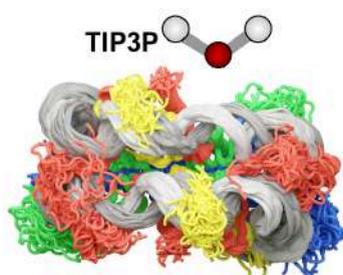
Моделирование МД нуклеосом имеет ряд трудностей, заложенных в используемых протоколах моделирования. Нуклеосома представляет собой комплексную систему достаточно большого размера (для моделирования полной нуклеосомы нужны вычислительные ячейки с линейным размером до 30 нм; число атомов в ячейке может варьироваться от 200 000 до 1 000 000), требующую корректного описания белков, ДНК и взаимодействий между ними и с растворителем. К тому же, предмет изучения динамики хвостов гистонов тесно

связан с развитием методов моделирования МД внутренне неупорядоченных участков (IDR – intrinsically disordered regions) белков и/или внутренне неупорядоченных белков (IDP – intrinsically disordered proteins) [117].

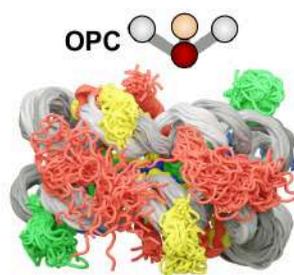
Исторически, первые силовые поля (способы параметризации атом-атомных взаимодействий) для проведения расчетов МД создавались для описания динамики глобулярных белков [118,119], но такие силовые поля некорректно воспроизводили динамику IDP и IDR, накладывая значительные ограничения на исследование в динамике естественного конформационного ансамбля и создавая артефактные компактные состояния таких белков. Для хвостов гистонов было показано, что применение стандартных протоколов (например, силовое поле Amber ff14SB и модель воды TIP3P) переоценивает силу ДНК-гистоновых взаимодействий и значительно «замедляет» динамику хвостов [120]. В настоящее время идет разработка силовых полей и протоколов моделирования, направленных на решение этой задачи. Одно из направлений – корректировка параметров потенциалов, связанных с двугранными углами основной цепи полипептидов (в том числе углов Рамачандрана); представители этих направлений – силовые поля Amber ff19SB [121], CHARMM36m [122], Amber ff14IDSPFF [123]. Второй подход – корректировка параметров взаимодействий белков и ДНК с водой; этот подход достигается путем изменения параметров молекул воды (модели воды TIP4P-D [124], OPC [125] и др.) или изменения параметров заряженных боковых групп белков и фосфатов ДНК (коррекции CUFIX [126]). Комбинация этих двух подходов дает хорошие результаты (см. сравнение динамики хвостов в разных моделях воды, Рисунок 8 А). В работе Лебеденко и др. исследовали конформационный ансамбль и трансляционную диффузию N-хвостового пептида гистона H4 в МД расчетах и их соответствие данным ЯМР-спектроскопии [127]. Авторы выяснили, что комбинации силовых полей и моделей воды ff14SB+TIP4P-D и ff19SB+OPC дают сопоставимо хорошие результаты, значительно улучшающие воспроизведение динамики неупорядоченного пептида в МД траекториях по сравнению с классическими подходами. Важным вопросом является корректность работы силовых полей и моделей воды в описании

взаимодействий между белками, ДНК и РНК, поэтому тестирование разных протоколов моделирования проводится также и на комплексах IDR с ДНК или РНК. Моделирование нуклеосом в силовом поле ff14SB и моделью воды TIP4P-D дает хорошее согласие расчетных скоростей релаксации R1 и R2 в сравнении с измеренными в ЯМР-эксперименте скоростями для хвоста гистона H4 [120]. В работе Sun et al. приводилось сравнение траекторий МД нуклеосом с экспериментом по измерению эффекта парамагнитного усиления релаксации хвоста гистона H4, что показало примерно одинаковую эффективность комбинаций силовых полей и моделей воды ff14SB+TIP4P-D и ff19SB+OPC [128]. Исследование конформационного пространства неупорядоченными белками также может быть усилено моделированием в силовом поле adisp и aastra (относятся к группе силовых полей Amber) в комбинации с моделью воды TIP4P-D, что было показано в работе Sarthak et al. [129]. Авторы использовали в качестве модельного объекта белок FUS в комплексе с фрагментом РНК, сравнивая данные МД с данными экспериментов по динамическому светорассеянию. Но несмотря на значительные улучшения протоколов моделирования МД, задача моделирования IDR и IDP и подбора наилучших параметров затруднена из-за высокой вычислительной сложности расчетов, которая вытекает из широкого конформационного ансамбля неупорядоченных белков.

(A) Гистоновые хвосты и эффекты моделей воды



Армеев и др., NatCom, 2021



Peng et.al., NatCom, 2021

(Б) Моделирование ДНК

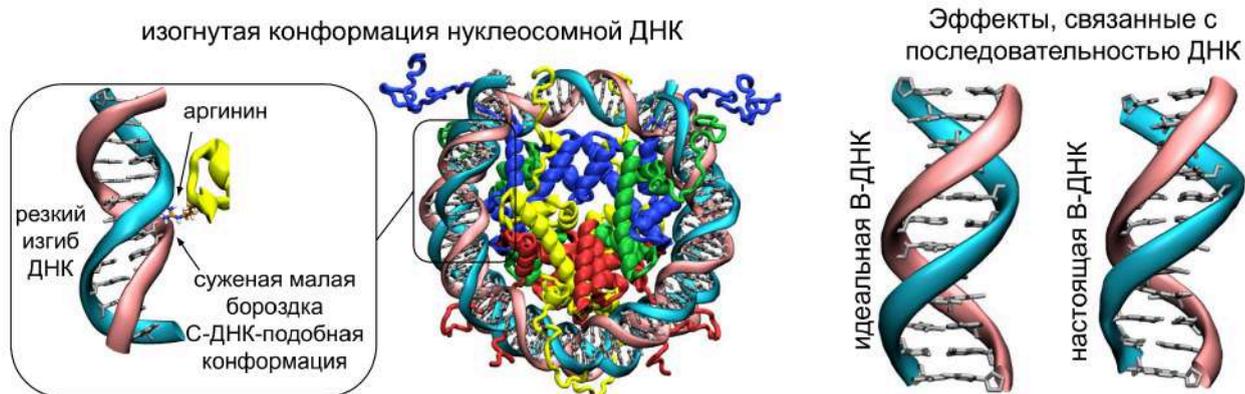


Рисунок 8. Направления развития методов атомистического моделирования, важные для исследования динамики нуклеосом. (А) Переоцененная стабильность взаимодействий хвостов с ДНК при моделировании протоколами старого поколения (модель воды TIP3P) и усиление динамики хвостов гистонов при моделировании протоколами нового поколения (модель воды OPC). Адаптировано из работ [43,60] (Б) Важные аспекты моделирования нуклеосомной ДНК: изогнутая конформация ДНК, отличная от В-формы ДНК, и возможность воспроизведения силовым полем свойств, связанных с последовательностью ДНК. На правой панели изображена кристаллическая структура додекамера Дрю-Дикерсона (PDB ID 1BNA).

Параллельно происходило развитие коррекций силовых полей для описания динамики ДНК, большой вклад в которое внесло сообщество авторов пакета программ Amber [119,130]. Первый этап развития коррекций получил свое развитие в 2000-х годах, когда молекулярное моделирование вышло на времена 50-100 нс, и разработанные в 1990-х годах силовые поля начали давать

систематические ошибки в описании ансамбля конформаций сахаро-фосфатного остова ДНК и РНК. С применением квантово-механических расчетов, были предложены первые коррекции, решающие эти проблемы – parmbsc0 [131]. На данный момент времена моделирования выросли еще на два порядка (для больших систем, таких как нуклеосомы), и коррекции для ДНК также развиваются. В последние годы авторы используют две альтернативные ветки коррекций параметров двугранных углов сахаро-фосфатного остова: parmbsc1 [132] и OL15/OL21 [133]. Более поздняя версия коррекций OL15 – OL21 улучшает параметры для моделирования альтернативных форм ДНК, таких как Z-ДНК [134]. Более кардинальные изменения привносит третья ветка развития коррекций – tunc1 [135] –, авторы которой поставили перед собой цель полностью перепараметризовать силовое поле для нуклеиновых кислот, изменяя и параметры валентных взаимодействий атомов, и парциальные заряды. Последние коррекции, как и OL21, хорошо справляются с альтернативными формами ДНК. Корректность моделирования альтернативных форм ДНК важна в контексте исследования динамики нуклеосом, так как нуклеосомная ДНК имеет сильный изгиб, особенно в области малой бороздки, ориентированной к октамеру гистонов (Рисунок 8 Б). В этих сайтах малая бороздка имеет меньшую ширину, чем малая бороздка В-ДНК [44], принимая С-ДНК-подобную конформацию [136].

Другой важный момент в выборе силового поля – корректность воспроизведения свойств ДНК, заданных последовательностью, так как известно, что стабильность нуклеосомы сильно зависит от положения определенных динуклеотидных пар в сайтах нуклеосомы (см. пункт 1.1.3, «Структура нуклеосомной ДНК»). Коррекции parmbsc1 показали хорошие результаты в масштабном исследовании динамики всех возможных тетрануклеотидов, выполненном ABC-консорциумом [137]. Тетрануклеотиды с разной последовательностью демонстрировали разные распределения геометрических параметров ДНК, часть из которых давали бимодальное распределение (предпосылки к формированию альтернативных форм ДНК для определенных

последовательностей). Для коррекций OL21 и tumuc1 таких масштабных исследований еще не проводилось.

Так как в нуклеосоме присутствуют одновременно и IDR, и ДНК, то нужно учитывать взаимное влияние решений для обоих типов молекул. Большую роль в моделировании IDR имеет модель воды, поэтому важно учитывать, для какой модели воды проводилась разработка коррекций ДНК: OL21 и tumuc1 разрабатывались с использованием модели воды OPC (лучше подходящей для моделирования IDR), в то время как более ранние коррекции parmbsc1 исходно разрабатывались для воды TIP3P. В исследовании динамики коротких фрагментов ДНК с использованием разных коррекций и моделей воды (OPC и TIP3P) показали, что parmbsc1 с разной водой дает схожие результаты [130], из чего можно сделать вывод, что использование его с моделью OPC является корректным.

Исходя из приведенных выше соображений, в настоящей диссертации использовались следующие параметры. В Главах 3-6 моделирование проводилось в силовом поле Amber ff14SB с использованием коррекций параметров ДНК parmbsc1 и модели воды TIP3P; для корректного описания взаимодействий белка, ДНК и растворителя использовались ионные коррекции CUFIX (см. раздел 2.1). Эти главы фокусируются на исследовании динамики глобулярной части гистонов в составе нуклеосом и тетрасом (комплексов тетрамера гистонов (H3-H4)₂ с ДНК). В Главе 7, посвященной исследованию динамики хвостов гистонов, используется протокол моделирования силовом поле Amber ff19SB с использованием коррекций параметров ДНК parmbsc1 и модели воды OPC (см. раздел 2.2).

1.2.4. Молекулярное моделирование в применении к исследованию структуры и динамики нуклеосом

Ранние работы по моделированию динамики хроматина проводились с конца 90-х годов [138], в которых нуклеосомы представлялись в виде сферических частиц. Работы 2000-х годов продолжали тему вычислительных экспериментов в исследовании хроматина, развивая крупнозернистые модели. К работам того времени относятся исследования, проведенные группами Т. Шлик [139,140], Н.В. Дохоляна [141], Л. Норденскольда [142,143], П.-Й. Ванг [144], Дж. Ланговски [145,146]. Авторы изучали динамические свойства нуклеосомной ДНК, важность динамики хвостов гистонов и влияние динамики нуклеосом на структуру хроматина. Моделирование МД нуклеосом в атомистическом приближении появилось с 2005 года с работ Т. Бишопа и др. (траектории в явном растворителе до 10 нс, 2005 г. [147], и 50 нс, 2009 г. [148]) и Рускио и Онуфриева [149] (траектории до 1 нс в неявном растворителе, 2006 г.), Роккатано и др. [150] (траектории до 20 нс в явном растворителе, 2007 г.), и Матерезе и др. [151] (200 нс в явном растворителе, 2009 г.). В течение последующих двух десятилетий вычислительные возможности значительно улучшились (в основном благодаря развитию графических процессоров и их эффективному использованию в развивающемся программном обеспечении), и развивались методы моделирования и силовые поля, используемые в расчетах (см. раздел 1.2.3). Последние работы по моделированию нуклеосом методом атомистической МД достигают мульти-микросекундных времен моделирования. На таких масштабах времени становится доступно исследование функционально значимой динамики нуклеосом в атомистическом приближении [152]. Крупнозернистое моделирование нуклеосом, однако, не стало только частью истории, а продолжает свое развитие. Эта группа методов сталкивается с теми же проблемами, что и атомистическая динамика: сочетание в нуклеосоме структур разной природы (ДНК, белки), корректность воспроизведения свойств, зависящих от последовательности ДНК, и корректный учет влияния неупорядоченных хвостов на динамику нуклеосом. Для моделирования гистонов в крупнозернистом

моделировании используются Gō-подобные модели, AICG, AICG2+ и AWSEM/AWSEM-IDP силовые поля. Для моделирования ДНК используются силовые поля 3SPN2./3SPN.2C или MADna (разработанное для задач, где важна последовательность ДНК). Как правило, авторы сочетают пару вышеперечисленных полей для белковой части и ДНК в своих исследованиях [112,153–155]. Отдельными группами силовых полей, которые включают в себя и белковую часть, и ДНК, являются SIRAH и Martini; они также используются в исследовании динамики нуклеосом [156,157].

Вместе с развитием вычислительных ресурсов, увеличивается размер моделируемых систем. Этот рост идет параллельно развитию метода криоЭМ, позволяющей исследовать структуры большого числа вариаций нуклеосом и комплексов с нуклеосомами [7]. Эти достижения открывают возможности для применения моделирования МД в изучении хроматина на уровне нуклеосом, работая в качестве вычислительного микроскопа для изучения хроматина [158,159]. За период 2019-2024 года было опубликовано более 50 работ в области моделирования атомистической МД нуклеосом [72], выполненные в более чем 20 мировых научных группах. В этих работах развивается область функционирования хроматина; исследуются такие задачи как процесс сборки/разборки нуклеосом, перемещение нуклеосом по ДНК, транскрипция через нуклеосомы, организация и динамику наднуклеосомных структур, механизмы связывания транскрипционных факторов, регуляция доступности ДНК через посттрансляционные модификации (ПТМ) гистонов и варианты гистонов и т.д.

Переход к моделированию динамики нуклеосом на временах до нескольких десятков микросекунд сделал возможным моделирование функционально значимых движений нуклеосомной ДНК, оказывающих большое влияние на структуру хроматиновой нити, в состав которой они входят. Основными модами динамики ДНК в составе нуклеосом являются откручивание ДНК (частичное разрушение с возможностью обратного восстановления

ДНК-гистоновых контактов) и скольжение ДНК вдоль белкового ядра нуклеосомы. Далее приводятся основные результаты таких исследований.

1.2.5. Функционально важные моды динамики нуклеосом

Для нуклеосом характерно обратимое нарушение части контактов ДНК и гистонов в равновесной динамике, что определяется как динамические моды дыхания и откручивания нуклеосомной ДНК [160–162]. Динамика откручивания нуклеосомной ДНК определяет компактность хроматиновой нити и доступность сайтов связывания различных молекулярных факторов на ДНК. Согласно данным экспериментов, спонтанное откручивание нуклеосомной ДНК происходит в микро- и миллисекундном масштабе времени [161,163]. До недавнего времени такие временные масштабы были недоступны для моделирования методом атомистической МД, и механизмы динамики откручивания преимущественно исследовались методами крупнозернистой МД (детально описано в обзоре [164]).

Ранние работы по моделированию откручивания нуклеосомной ДНК в атомистическом приближении проводились с использованием методов усиленной МД и с укорачиванием гистоновых хвостов для усиления динамики (Рисунок 9 А). В работе Kono et al. [165] авторы использовали методы адаптивно-смещенной (adaptively biased) МД и зонтичного семплирования (umbrella sampling) для увеличения расстояния между концами ДНК, имитируя управляемое откручивание ДНК в экспериментах с оптическим/магнитным пинцетом [166]. Позднее авторами был проведен вычислительный эксперимент по приложению торсионного стресса на внешнюю половину супервитка ДНК у входа и выхода в нуклеосому, которое, как оказалось, вызывало откручивание нуклеосомной ДНК [167]. Важными результатами этой работы стали описанные движения откручивания ДНК (до 30 п.н.), их связь с торсионным стрессом и разделение процесса откручивания на две стадии (на первой стадии откручивается участок ДНК длиной 10-12 п.н., затем происходит откручивание ~25 п.н.). Согласно предложенной авторами модели, позитивный стресс усиливает динамику ДНК, а негативный снижает.

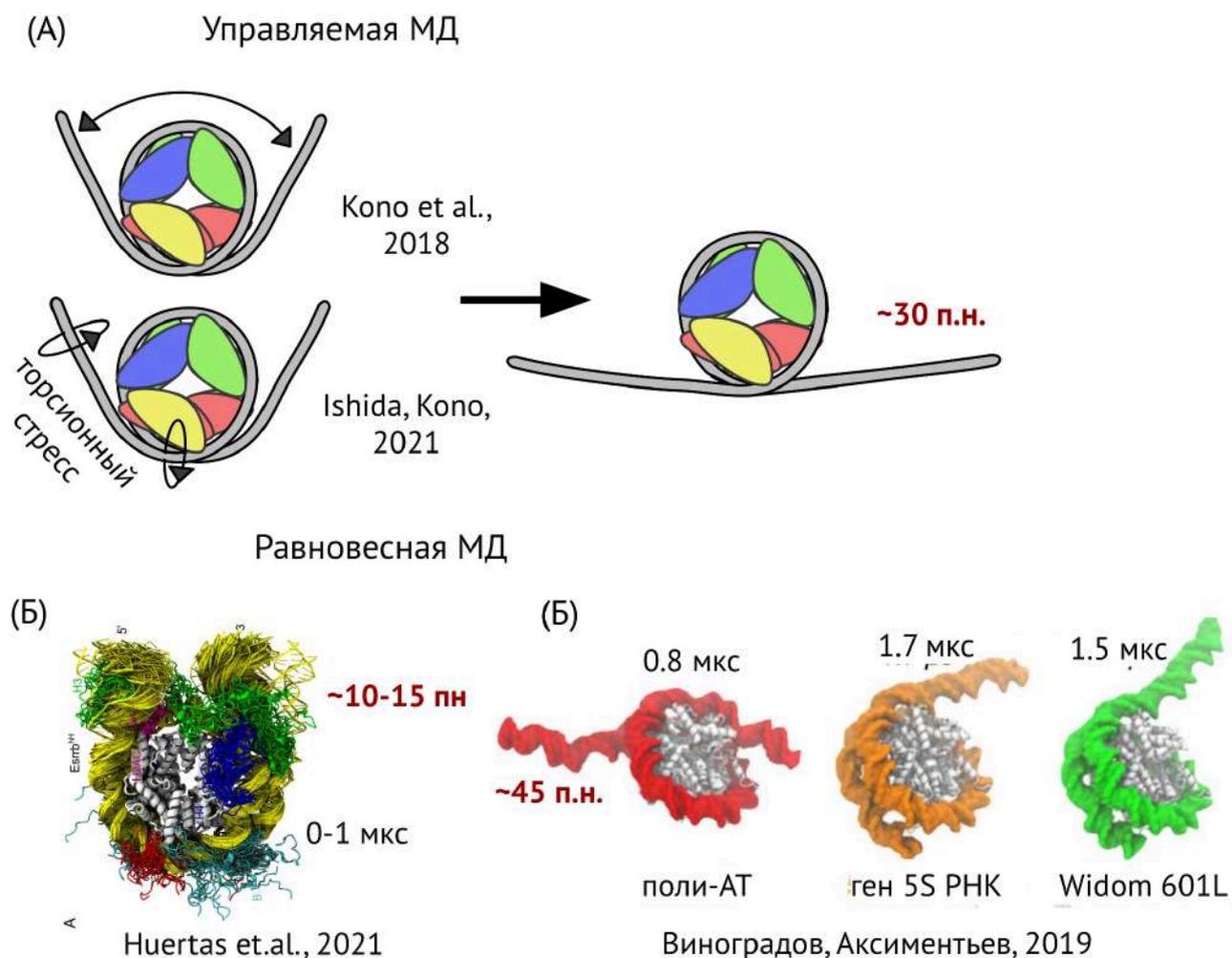


Рисунок 9. Результаты в области молекулярного моделирования дыхания и откручивания нуклеосомной ДНК. (А) Откручивание ДНК, смоделированное методом управляемой атомистической МД [165,167]. (Б-В) Спонтанное дыхание и откручивание ДНК в работах с применением равновесной атомистической МД [168,169].

Спонтанное откручивание ДНК в последствии удалось наблюдать в равновесной МД при переходе к мульти-микросекундному масштабу времен. В работе Huertas et al. удалось смоделировать дыхание ДНК (откручивание фрагмента ДНК длиной 10-12 п.н.) при физиологических условиях (полноразмерные гистоны, ионная сила раствора 150 мМ, Рисунок 9 Б) [168]. Важно отметить, что авторы работы для исследования дыхания ДНК использовали замену позиционирующей последовательности ДНК Widom 601 в исходной кристаллической структуре нуклеосомы на геномную последовательность и

отметили повышение интенсивности дыхания в таком случае. В работе Виноградова и Аксиментьева [169] варьировались и последовательность ДНК, и ионная сила: показано наибольшее спонтанное откручивание (до 45 п.н.) при использовании последовательности ДНК поли(АТ), повышении ионной силы (2 М $MgCl_2$) и укорочении гистоновых хвостов (Рисунок 9 В). Интересно, что метилирование цитозина в пятом положении (5mC) ДНК является еще одним фактором регуляции динамики откручивания ДНК: в работе Li et al. [170] предложена модель, согласно которой метилирование ДНК стабилизирует конформацию суперспирали ДНК и стабилизирует нуклеосому. Роль в регуляции динамики откручивания ДНК также демонстрируют и для изменения последовательности гистонов и ПТМ гистонов.

Другой важнейшей динамической модой нуклеосом является скольжение нуклеосомной ДНК, благодаря которому возможно перемещение нуклеосом в геноме клеток [171,172]. Важнейшую роль в позиционировании нуклеосом в геноме играют макромолекулярные комплексы ремоделирования хроматина – ремоделеры, способные направлять перемещение нуклеосом с затратой АТФ [173]. Однако также известно и явление спонтанного ненаправленного скольжения нуклеосом вдоль ДНК в экспериментах *in vitro* [174]. Порядка 20 лет в литературе существует дискуссия на предмет молекулярного механизма скольжения нуклеосомной ДНК (Рисунок 10 А) [19]. Согласно модели диффузии дефекта кручения («twist diffusion»), во внутреннем сайте нуклеосомы происходит возникновение дефекта кручения ДНК (избыточное локальное скручивание двойной спирали ДНК), перемещение которого по супервитку нуклеосомной ДНК сопряжено с кручением двойной спирали ДНК (штопорообразное движение, «screw-like motion», Рисунок 10 Б) [175]. Эта модель является наиболее убедительной на данный момент, сильным аргументом в пользу которой стала череда экспериментов по исследованию механизма работы ремоделеров. А именно, принимается во внимание факт строгой стехиометрии ремоделирующего цикла (шаг в 1 п.н. : 1 молекула АТФ), а также известные структуры промежуточных состояний нуклеосомы при ремоделировании, полученные

методом криоЭМ, содержащие дефект кручения в $SHL \pm 2$ [176]. Альтернативная модель предполагает появление петель ДНК («loop propagation model», Рисунок 10 Б), формированию которых должно предшествовать откручивание ДНК. Такие петли, согласно модели, перемещаются вдоль нуклеосомного ядра по червеобразному («inchworm-like») механизму [171,177]. Обе модели предполагают перемещение дефекта кручения или петли вдоль октамера гистонов, что требует масштабной перестройки ДНК-гистоновых контактов (разрушения старых и образование новых контактов), что значительно затрудняет моделирование скольжения ДНК.

Исследования скольжения ДНК проводились методами крупнозернистой МД [112,153,178,179]. Авторы использовали несколько подходов для усиления движения скольжения, прикладывая дополнительные потенциалы как к координате вращения пары нуклеотидов вдоль оси двойной спирали ДНК (ротационная компонента), так и к координате перемещения пар нуклеотидов по поверхности нуклеосомы (трансляционная компонента). В таком моделировании скольжения нуклеосомной ДНК была показана реализация обеих моделей, зависящая от последовательности ДНК (Рисунок 10 В). Так, «слабые» последовательности (такие как поли(GC)) были способны к скольжению путем перемещения дефектов кручения, а позиционирующие последовательности (Widom 601) были склонны к формированию петель.

В работе группы Ш.М. Ловерде [180] было показано формирование небольшой петли в сайте $SHL \pm 5,5$ нуклеосомы в равновесной атомистической динамике (Рисунок 10 Г). Авторы проводили моделирование нуклеосомы в окружении 2 М NaCl, время моделирования составило 5 мкс, с α -сателлитной последовательностью ДНК (Рисунок 10 Г).. Петля оказалась стабильна во времени, и в этом способствовал N-хвост гистона H2B, который встроился между гистоновым ядром и петлей ДНК. Интересно, что подобное встраивание между гистонами и ДНК показали для N-хвоста H4 при возникновении дефекта в $SHL 2$ в моделировании скольжения крупнозернистой МД [112]. Несмотря на описанное в работе формирование петли ДНК во внутреннем сайте нуклеосомы, остаются

нерешенными вопросы как происходит скольжение ДНК при физиологических концентрациях соли, как происходит полный цикл скольжения ДНК и какую роль в процессе скольжения играет гистоновое ядро нуклеосомы.

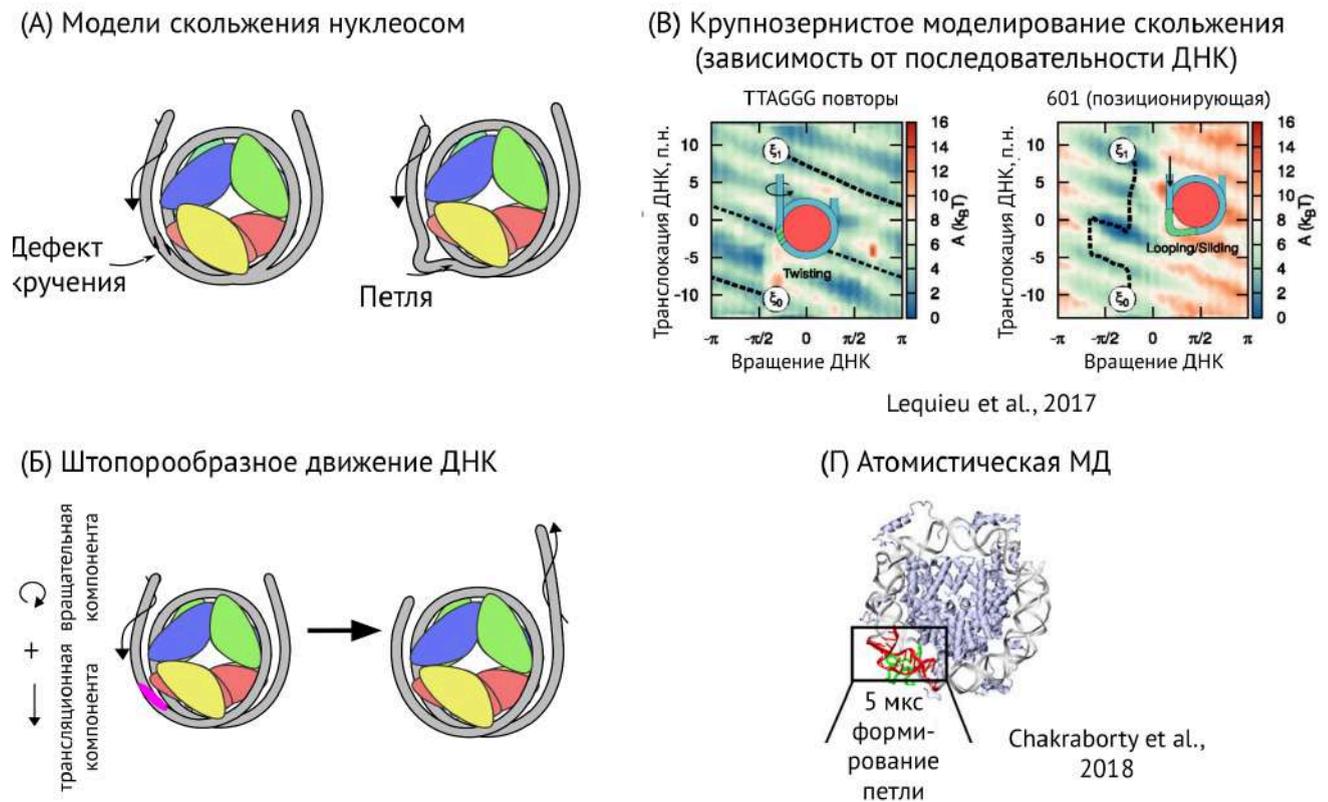


Рисунок 10. Скольжение нуклеосомной ДНК. (А) Альтернативные модели механизма скольжения ДНК вдоль октамера гистонов: диффузия дефекта кручения и формирование петель ДНК. (Б) Модель штопорообразного движения скольжения ДНК. (В) Примеры траекторий и соответствующих гипотетических поверхностей потенциальной энергии процесса скольжения в нуклеосомах с разной последовательностью ДНК [112]. (У) Свидетельство формирования петли ДНК в сайте нуклеосомы SHL 5,5 в равновесном атомистическом моделировании [180].

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Протокол моделирования в задачах исследования динамики глобулярного домена гистонов и ДНК в составе нуклеосом и тетрасом

Данный протокол использовался в Главах 3-6.

2.1.1. Построение стартовых систем

Исходные координаты нуклеосом были получены из базы данных белковых структур RCSB PDB [181]. Недостающие фрагменты гистонов были восстановлены с помощью программы Modeller [182]. В моделировании систем с укороченными хвостами гистонов использовались сайты обрезки, отмеченные на Рисунке 5. На С- и N-концах гистонов при их укорочении были присоединены незаряженные N-метильные (NME) и ацетильные (ACE) группы. Сайты обрезки были выбраны таким образом, чтобы удалить подвижные части хвостов гистонов, сохранив при этом некоторые части хвостов, примыкающие к глобулярному домену, образующие стабильные контакты с ДНК и гистонами (в частности, N-концевые фрагменты гистонов H3 и H2B, выступающие между цепями ДНК, или докинг-домен гистона H2A, взаимодействующий с гистонами H3 и H4).

2.1.2. Подготовка систем к расчету МД и проведение расчетов

Расчеты МД проводились в программе GROMACS разных версий (2018.1, 2020.2, 2020.3) [183]. В стандартном протоколе использовалось силовое поле AMBER ff14SB [184], дополненное коррекциями параметров ДНК parmbsc1 [132] и коррекцией параметров заряженных групп CUFIX [126]. Так как в прошлых расчетах наблюдалось артефактное расплетание концов ДНК, в наших расчетах расстояние между атомами азота гликозидной связи (N1 для тимина или цитозина и N9 для аденина или гуанина) концевых пар оснований ограничивалось с помощью гармонического потенциала с силовой константой $1000 \text{ кДж/моль/нм}^2$. Модели были помещены в расчетную ячейку (изотропный усеченный октаэдр). Размер ячейки варьировался в зависимости от системы. Линейный размер ячейки

выбирался таким образом, чтобы минимальное расстояние от атомов нуклеосомы до стенки ячейки составляло 2 нм. В моделировании использовались периодические граничные условия. Модели были окружены водой (модель TIP3P [185]) и ионами Na^+ и Cl^- (модель Янга-Читама [186]) в концентрации 150 мМ и с нейтральным суммарным зарядом расчетной ячейки.

Подготовленные системы были минимизированы (методом градиента наискорейшего спуска за 10000 шагов с позиционными ограничениями на тяжелых атомах 500 кДж/моль/нм²). Далее проводилось уравнивание систем в 5 шагов (каждый длительностью 200 пс) с уменьшающимися позиционными ограничениями (500, 50, 5, 0,5 кДж/моль/нм² на этапах 1-4 и этап 5 без позиционных ограничений). Моделирование проводилось в ансамбле NPT; температура поддерживалась на уровне 300 К с использованием схемы перемасштабирования скорости [187] со временем релаксации 1 пс, а давление – на уровне 1 бар с использованием баростата Парринелло-Рахмана [188] со временем релаксации 1 пс. К связям «тяжелых» атомов с водородами применялся алгоритм LINKS. Радиус обрезки для невалентных взаимодействий был установлен 8 Å. Для расчета дальних взаимодействий использовался алгоритм PME (particle-mesh Ewald) с параметрами решетки по умолчанию. Шаг интегрирования был установлен 2 фс, частота записи кадров траекторий – 1 нс.

Расчеты проводились на суперкомпьютере «Ломоносов-2» [189] с использованием 1-8 узлов раздела compute (на каждом узле 14 CPU процессоров и NVidia Tesla K40 GPU); расчеты проводились в параллель (методом доменной декомпозиции) с помощью MPI-задач. Также расчеты проводились на высокопроизводительном вычислительном кластере Ньютон (кафедра биоинженерии) с использованием 20 CPU процессоров и NVidia GeForce RTX 2080 Ti GPU. Использовалось ускорение расчета путем переноса расчетов невалентных взаимодействий на графические ускорители (видеокарты).

2.1.3. Описание молекулярных моделей и траекторий, анализируемых в исследовании внутренней динамики гистонов (Главы 3 и 4)

Атомистические модели были построены на основе структур НКЧ, полученных методом PCA (идентификаторы PDB: 1KX5, 1AOI, 3LZ0, см. Таблицу 1). Структуры димеров H2A-H2B и H3-H4 были построены путем извлечения из структуры 1KX5 цепей C и D (H2A-H2B) и A и B (H3-H4).

Модель НКЧ с открученным внешним полувитком ДНК (НКЧ₁₄₅, открученная) была построена с использованием референсной структуры PDB ID 3LZ0 (аналогично модели НКЧ₁₄₅), для которой фрагмент ДНК длиной 25 п.н. был вырезан и заменен на идентичный по последовательности фрагмент в конформации В-ДНК. Построение участка ДНК с заданной конформацией проводилось с помощью программы 3DNA [190]. Искусственное откручивание было проведено только для проксимального конца нуклеосомной ДНК.

Модель комплекса нуклеосомы с пептидом CENP-C_{мотив} (НКЧ_{CENP-C}) была получена на основе структуры комплекса, полученного методом PCA [191]. Для лучшего соответствия модели с пептидом и референсной траектории нуклеосомы без пептида (НКЧ₁₄₅), произведено выравнивание моделей и замена гистонов *D. melanogaster* в экспериментальной структуре на гистоны *X. laevis* референсной структуры. Недостающие в экспериментальной структуре аминокислотные остатки пептида были достроены вручную. в программе PyMOL [192]. В соответствии с экспериментальной структурой, в комплекс с нуклеосомой входили два пептида: с проксимальной и дистальной стороны нуклеосомы.

Таблица 1. Описание моделируемых систем (Главы 3-4).

Название системы	Описание	Гистоны	ДНК	Исходная структура (PDB ID)	Время моделирования, нс
Н3-Н4	Димер гистонов Н3-Н4	гистоны <i>Xenopus laevis</i> , укороченные хвосты гистонов	Нет	1KX5	2 900
Н2А-Н2В	Димер гистонов Н2А-Н2В	гистоны <i>Xenopus laevis</i> , укороченные хвосты гистонов	Нет	1KX5	3 100
НКЧ ₁₄₇	Нуклеосомная коровая частица с ДНК длиной 147 п.н.	Гистоны <i>Xenopus laevis</i> , укороченные хвосты гистонов	147 п.н., α -сателлитная последовательность	1KX5	10
НКЧ ₁₄₆	Нуклеосомная коровая частица с ДНК длиной 146 п.н.	Гистоны <i>Xenopus laevis</i> , укороченные хвосты гистонов	146 п.н., α -сателлитная последовательность	1AOI	8
НКЧ ₁₄₅	Нуклеосомная коровая частица с ДНК длиной 145 п.н.	Гистоны <i>Xenopus laevis</i> , укороченные хвосты гистонов	145 п.н., 601 Widom позиционирующая последовательность	3LZ0	15
НКЧ ₁₄₅ , открученная	Нуклеосомная коровая частица гистонов и асимметрично открученным фрагментом ДНК длиной 25 п.н.	Гистоны <i>Xenopus laevis</i> , укороченные хвосты гистонов	145 п.н., 601 Widom позиционирующая последовательность	3LZ0	1,8
НКЧ _{CENP-C}	Нуклеосомная коровая частица в комплексе с пептидом CENP-C _{мотив}	Гистоны <i>Xenopus laevis</i> (из структуры 3LZ0), укороченные хвосты гистонов; CENP-C _{мотив В} в двух копиях из структуры 4X23	145 п.н., 601 Widom позиционирующая последовательность	4X23/3LZ0	1*2

2.1.4. Описание молекулярных моделей и траекторий, анализируемых в исследовании структуры и динамики вариантных гистонов (Глава 5)

Моделирование димеров и нуклеосом с вариантным гистонем H2A.Z

Модель НКЧ, содержащая вариантный гистон H2A.Z, была построена на основе соответствующей кристаллической структуры (PDB ID 1F66) [82]. У некоторых гистонов отсутствовали терминальные остатки, которые были реконструированы с помощью Modeller [182]. С помощью Chimera [193] исходная последовательность ДНК в структуре 1F66 (146 п.н. α -сателлитная) была изменена на позиционирующую последовательность Widom 601, чтобы избежать специфичных эффектов, зависящих от последовательности ДНК. Для сравнения с канонической НКЧ использовалась траектория МД НКЧ₁₄₅, построенной на основе структуры PDB ID 3LZ0.

Из структур НКЧ были выделены структуры димеров гистонов H2A-H2B и H2A.Z-H2B (цепи C и D для гистонов H2A/H2A.Z и H2B). Время моделирования и описание систем приведено в Таблице 2.

Таблица 2. Описание моделей и МД расчетов, используемых в анализе раздела 5.1.1 (в части исследования гистона H2A.Z)

Название системы	Описание	Гистоны	ДНК	Идентификатор исходной структуры (PDB ID)	Время моделирования, мкс
H2A-H2B	Димер гистонов H2A-H2B	Гистоны <i>Xenopus laevis</i> , укороченные хвосты гистонов	Нет	3LZ0	3,1
H2A.Z-H2B	Димер гистонов H2A.Z-H2B	Гистоны <i>Homo sapiens</i> / <i>Xenopus laevis</i> , укороченные хвосты гистонов	Нет	1F66	3
НКЧ _{H2A.Z, 145}	Нуклеосомная коровая частица с каноническими гистонами H3, H4, H2B и вариантным H2A.Z	Гистоны <i>Xenopus laevis</i> , <i>Mus musculus</i> , <i>Homo sapiens</i> (PDB ID 1F66), укороченные хвосты гистонов	145 п.н., 601 Widom позиционирующая последовательность (PDB ID 3LZ0)	1F66/ 3LZ0	5
НКЧ ₁₄₅	Нуклеосомная коровая частица с каноническими гистонами	Гистоны <i>Xenopus laevis</i> , укороченные хвосты гистонов	145 п.н., 601 Widom позиционирующая последовательность	3LZ0	15

Моделирование димеров и нуклеосом с вариантным гистоном H2A.J

Построение моделей нуклеосом с H2A.J и проведение МД расчетов было выполнено Н.А. Косаримом. Проведение расчетов МД димеров было выполнено Федуловой А.С. Список моделей представлен в Таблице 3.

Таблица 3. Описание моделей и МД расчетов, используемых в анализе раздела 5.1.2 (в части исследования гистона H2A.J)

Название системы	Описание	Гистоны	ДНК	Идентификатор исходной структуры (PDB ID)	Время моделирования, мкс
H2A-H2B	Димер гистонов H2A-H2B	Гистоны <i>Homo sapiens</i> , укороченные хвосты гистонов	Нет	5AV9	1,5
H2A.J-H2B	Димер гистонов H2A.J-H2B (с заменами в гистоне H2A, соответствующими гистону H2A.J)	Гистоны <i>Homo sapiens</i> , укороченные хвосты гистонов	Нет	5AV9	1,5
Нукл. ¹⁸⁷	Нуклеосома с каноническими гистонами	Гистоны <i>Homo sapiens</i> , полные хвосты гистонов	Общая длина ДНК – 187 п.н.; длина нуклеосомной ДНК 147 п.н., α -сателлитная последовательность + 20 п.н. линкеры ДНК	5AV9	1,5*3
Нукл. _{H2A.J} , ¹⁸⁷	Нуклеосома с каноническими гистонами H3, H4, H2B и вариантным H2A.J (с заменами в гистоне H2A, соответствующими гистону H2A.J)	Гистоны <i>Homo sapiens</i> , полные хвосты гистонов	Общая длина ДНК – 187 п.н.; длина нуклеосомной ДНК 147 п.н., α -сателлитная последовательность + 20 п.н. линкеры ДНК	5AV9	1,5*3

Построение исходных моделей (Н.А. Косарим) производилось путем достраивания хвостов гистонов и линкеров ДНК (20 п.н.) к кристаллической структуре НКЧ с гистонами человека (PDB ID 5AV9 [194]). Достраивание

участков нуклеосомы осуществлялось в программе UCSF Chimera [193] (хвосты гистонов) и 3DNA [190] (ДНК). Модель нуклеосомы с вариантным гистоном H2A.J была получена путем внесения замен в модель нуклеосомы с каноническими гистонами (также проводилось в Chimera).

Модели димеров H2A-H2B и H2A.J-H2B (А.С. Федулова) были извлечены из соответствующих моделей нуклеосом. Для этих моделей были укорочены неупорядоченные хвосты гистонов (остались а.о. 16–102 и 34–122 цепей С (H2A) и D (H2B) соответственно).

2.1.6. Описание молекулярных моделей и траекторий динамики тетрасом (Глава 6)

Начальные конформации тетрасом были построены на основе кристаллической структуры НКЧ, депонированной в Protein Data Bank (PDB ID 1KX5 [41]). Список моделируемых систем представлен в Таблице 4.

Таблица 4. Список моделируемых в Главе 6 систем.

Название системы	Описание системы	Длина траектории
Тетр _{-разворачивание}	Траектория МД, демонстрирующая разворачивание нуклеосомной ДНК при удалении из структуры димеров H2A-H2B	60 нс
Тетр ₋₁	Траектория МД тетрасомы, содержащей 124 п.н. фрагмент ДНК, полные гистоновые хвосты (объединение коротких независимых траекторий)	2,5 мкс в сумме (170-240 нс на траекторию)
Тетр ₋₂	Траектория МД тетрасомы, содержащей 124 п.н. фрагмент ДНК, полные гистоновые хвосты (один долгий расчет)	2,5 мкс
Тетр _{-без хвостов}	Траектория МД тетрасомы, содержащей 120 п.н. фрагмент ДНК, удаленные гистоновые хвосты (один долгий расчет)	2,3 мкс

Для создания модели тетрасом на основе рентгеновской структуры НКЧ были сохранены гистоны H3 (цепи А, Е), H4 (цепи В, F) и центральный сегмент ДНК длиной 120–124 п.н. для соответствия моделируемых систем тетрасомам в ЯМР эксперименте; ДНК была симметрично усечена с обоих концов. В коротком

расчете, демонстрирующем изначальное разворачивание ДНК при удалении димеров (Тетр._{разворачивание}), координаты всех атомов ДНК сохранялись. В траекториях с исходно прямыми фланкирующими фрагментами ДНК (Тетр.₁, Тетр.₂ и Тетр._{без хвостов}), 40 п.н. ДНК на каждом конце ДНК были выпрямлены с помощью программы 3DNA путем установления параметров шага пар оснований (Roll, Rise, Shift, Tilt, Slide и Twist) на соответствующие значения прямой B-ДНК [190].

2.2. Протокол моделирования в задачах исследования динамики неупорядоченных хвостов гистонов в составе нуклеосом (Глава 7)

Данный протокол применялся в Главе 7. Изложенный ниже протокол проведения МД расчетов представлен О.О. Лебеденко.

2.2.1. Построение стартовых систем

Стартовая модель НКЧ была построена на основе кристаллической структуры PDB ID 3LZ0 [40] (гистоны *Xenopus laevis*, последовательность ДНК Widom 601). Неразрешенные в структуре неупорядоченные хвосты гистонов были достроены путем построения фрагментов гистонов с заданными углами Рамачандрана ($\Phi, \Psi = -60^\circ, 150^\circ$, в соответствии с углами в полипропиленовой спирали II) с помощью программы LEaP (входит в пакет Amber [119]). Построенные фрагменты «пришивались» к глобулярному домену гистонов после выравнивания по N-, C-, Ca-атомам крайних остатков.

2.2.2. Подготовка систем к расчету МД и проведение расчетов

Расчеты МД проводились с помощью программного пакета Amber22 [119]. В протоколе использовалось силовое поле AMBER ff19SB [121], дополненное коррекциями параметров ДНК parmbsc1 [132]. Модели были помещены в расчетную ячейку (изотропный усеченный октаэдр). Диаметр ячейки был выбран фиксированным (243 Å; обеспечивает расстояние от НКЧ до стенки более 12 Å). В моделировании использовались периодические граничные условия. Модели были окружены водой (модель OPC [125]) и ионами K⁺ и Cl⁻ (модель Янга-Читама

[186]) в концентрации 150 мМ и с нейтральным суммарным зарядом расчетной ячейки.

Минимизация проводилась в два этапа методом градиентного спуска. На первом этапе к атомам молекул ДНК были приложены гармонические потенциалы, ограничивающие их смещения относительно исходных координат (с константой $10 \text{ ккал}/(\text{моль} \cdot \text{Å}^2)$). На втором этапе минимизации не использовались дополнительные потенциалы. Каждый этап проводился в 500 шагов. Далее проводилось термостатирование системы (термостат Берендсена [195], 10 000 шагов, шаг интегрирования 1 фс, температура 298 К). Затем проводилась эквilibрация в ансамбле NPT; температура поддерживалась на уровне 298 К с использованием схемы перемасштабирования скорости (термостат Бусси) [187] с временем релаксации 1 пс, а давление – на уровне 1 бар с использованием баростата Берендсена [195] с временем релаксации 2 пс. Эквilibрирование проводилось в течение 500 000 шагов, шаг интегрирования был установлен 2 фс. К связям «тяжелых» атомов с водородами применялся алгоритм SHAKE. Радиус обрезки для невалентных взаимодействий был установлен $10,5 \text{ Å}$. Для расчета дальних взаимодействий использовался алгоритм PME (particle-mesh Ewald) с параметрами решетки по умолчанию. Расчет МД также проводился с шагом интегрирования 2 фс, времена моделирования составили 100 нс (3 повторности). Частота записи кадров траекторий – 1 нс.

За время расчета 100 нс происходила конденсация хвостов гистонов на поверхность НКЧ, что приводило к уменьшению размера системы. После этапа конденсации хвостов процедура построения расчетной ячейки, минимизации и эквilibрации повторялась с использованием описанных выше параметров. Новый размер ячейки был выбран фиксированным 206 Å . Для подготовленной заново системы были проведены расчеты траекторий МД длиной 2 мкс (3 повторности).

Расчеты проводились на высокопроизводительном вычислительном кластере Ньютон (кафедра биоинженерии) с использованием 20 CPU процессоров и NVidia GeForce RTX 2080 Ti GPU. Также расчеты проводились на

вычислительных узлах суперкомпьютера МГУ-270 (16 CPU процессоров, 1 NVidia A100). Использовалось ускорение расчета путем переноса расчетов невалентных взаимодействий на графические ускорители (видеокарты).

2.3. Обработка траекторий МД и анализ динамики нуклеосом

Обработка траекторий

Обработка траекторий (восстановление целостности нуклеосом из периодических образов, первичное выравнивание по всем атомам) производилась с помощью утилит программных пакетов для проведения МД (Gromacs и Amber). Вторичное выравнивание проводилось только по элементам гистонового фолда ($\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\alpha 3$ спиралям гистонов) и проводилось с помощью библиотеки MDAnalysis [196]. Такой подход был выбран для уменьшения шума в положении нуклеосомы, вызываемого подвижными хвостами гистонов (при их наличии) или динамичными концами ДНК (при их откручивании в контексте нуклеосомы или флуктуациях в контексте тетрасомы).

Определение системы координат нуклеосомы

В исследовании пластичности гистонов в составе НКЧ и $(H3-H4)_2$ тетрасом использовалось выравнивание кадров траектории в системе координат, определенной естественными осями нуклеосомы (система координат нуклеосом, СКН) (Рисунок 4 А). Нуклеосомная ось псевдосимметрии второго порядка (диадная ось нуклеосомы) определялась как ось OY. Ось супервитка ДНК была выбрана осью OZ и определялась путем поиска оси, перпендикулярной оси OY, дающей наименьшее значение суммы квадратов расстояний от центров пар нуклеотидов ДНК до оси OZ. Векторное произведение осей OY и OZ было обозначено за ось OX.

Определение систем координат димеров

Для сравнения геометрии димеров H2A-H2B и H3-H4 в свободном виде и в виде димеров в составе НКЧ и выявления внутренней пластичности гистонов была введена специальная система координат для каждого из димеров (системы

координат димеров, СКД). Использовался аналогичный подход – определение СКД исходило из геометрии димеров и их внутренней псевдосимметрии (Рисунок 4 Б). За ось OX димеров была выбрана ось псевдосимметрии второго порядка (определялась с помощью программы CE-Symm [197]). Ось OY была определена как ось, перпендикулярная оси OX, при этом проекции α 2-спиралей гистонов давали наибольший размах в проекции на эту ось. Ось OZ была определена как векторное произведение осей OX и OY. Определение СКД и помещение димеров в соответствующие системы координат проводилось на языке Python 3 с использованием библиотек Numpy и MDAnalysis [196]. Анализ внутренней динамики димеров гистонов проводился при предварительном выравнивании траекторий МД в соответствующие СКД путем минимизации RMSD кадров относительно начального состояния по положениям Ca-атомов спиралей гистонового фолда (α 1, α 2 и α 3).

Анализ ДНК-гистоновых контактов и откручивания ДНК

В анализе траекторий использовались скрипты на языке Python 3, использующие такие программные библиотеки, как MDAnalysis, numpy, pandas. Визуализация проводилась с помощью VMD и NGLview [198,199]. Также использовалась библиотека rnpuc1, разработанная А.К. Шайтаном и Г.А. Армеевым для анализа структуры и динамики нуклеосом. В частности, с помощью rnpuc1 проводился анализ ДНК-гистоновых контактов и анализ степени откручивания нуклеосомной и тетрасомной ДНК. Критерием контакта принималось расстояние между двумя «тяжелыми» атомами менее 4 Å; два остатка находились в контакте, когда между ними существовал хотя бы один атом-атомный контакт. Откручивание нуклеосомной ДНК определялось по геометрическому критерию: за величину откручивания принималась длина фрагмента ДНК, каждая пара нуклеотидов которого находилась более чем на 7 Å дальше от любой пары нуклеотидов в кристаллической структуре нуклеосомы. В Главах 3 и 6 при исследовании откручивания тетрасомной ДНК использовался критерий, основанный на анализе ДНК-гистоновых контактов, так как исходная

геометрия тетрасомы была получена на основе координат атомов в структуре нуклеосомы, и анализ смещений относительно кристаллической структуры был некорректен. Также, в связи с вариабельностью длины фланкирующей тетрасомы ДНК, измерялась длина связанной гистонами ДНК, а не длина свободного участка. Фрагмент связанной гистонами ДНК определялся как фрагмент между парами нуклеотидов, формирующих крайние контакты с гистонами.

Расчет двугранных углов, поиск водородных связей и вычисление расстояний между группами атомов проводилось с помощью пакета MDAnalysis [196]. В анализе водородных связей были приняты параметры по умолчанию (крайние значения расстояния донор-акцептор (D-A) и угла (D-H-A) были установлены равными 3 Å и 120° соответственно), при этом учитывались как атомы основной цепи, так и боковых цепей остатков.

Анализ внутренней динамики димеров гистонов

Положение С-конца $\alpha 2$ -спиралей гистонов определялось как позиции $C\alpha$ атомов остатков H3 114, H4 76, H2A 73 и H2B 84. Положение N-конца $\alpha 2$ -спиралей гистонов определялось как позиции $C\alpha$ атомов остатков H3 85, H4 49, H2A 46 и H2B 55. Амплитуды флуктуаций спиралей измерялись как максимальное расстояние между положениями концевых атомов $C\alpha$ спиралей после выравнивания димера в СКД. Угол $\alpha 2$ - $\alpha 2$ определялся как угол между векторам, образованными моментальными положениями $C\alpha$ -атомов N- и С-концов спиралей. Функции плотности вероятности значений параметров визуализировались с помощью метода kernel density estimation с Гауссовым ядром (реализация SciPy). Элементы вторичной структуры определялись с помощью программы DSSP [200].

Для определения характерных мод динамики $\alpha 2$ -спиралей димеров гистонов были выделены траектории этих спиралей из траекторий МД димеров и НКЧ. Выравнивание траекторий спиралей проводилось в СКД. Для двух копий димера в составе НКЧ были выделены по две траектории $\alpha 2$ -спиралей, анализ которых проводился независимо. Анализ главных компонент был применен к матрице ковариаций положений атомов основной полипептидной цепи (N, $C\alpha$, C,

O, H (водород амидной группы) реализация в программе Gromacs, функции covar и ana eig), и были определены собственные векторы и соответствующие им собственные значения. Сравнение векторов из разных траекторий проводилось также с помощью функционала программы Gromacs путем расчета скалярных произведений собственных векторов.

Анализ динамики тетрасом

Построение профилей RMSF (по координатам Ca атомов белка) проводилось с помощью программы MDAnalysis [147]. Углы Рамачандрана также были рассчитаны с использованием MDAnalysis. Карта Рамачандрана для конкретного остатка представляет значения углов φ/ψ в кадрах траектории МД.

Анализ расстояний и углов проводился с помощью библиотеки numru с использованием координат центров геометрии азотов гликозидной связи пары нуклеотидов (для ДНК; определялся как середина между положениями атомов N1 (для T и C) и N9 (для A и G)) или координат Ca атомов (для белка). Угол суперспирали ДНК определялся как двугранный угол между центрами четырех пар оснований при SHL -2,5, -0,7, 0,7, 2,5. Угол раскрытия тетрамера определялся положениями двух Ca атомов C-концевых остатков α 2-спиралей H4 (остаток 76) и центром масс области четырех-спирального контакта гистонов H3 (остатки 105–135 обоих гистонов H3).

2.4. Анализ структур нуклеосом

Определение подвижности гистонов из тепловых факторов PCA структур

Значения среднеквадратичных флуктуаций позиций атомов (RMSF) были оценены на основе B-факторов Ca-атомов кристаллографических структур с высоким разрешением. Для нуклеосомы была использована структура PDB ID 1KX5, для димера H2A-H2B – PDB ID 6K01 (свободный димер), для димера H3-H4 – PDB ID 2IO5 (димер в комплексе с шапероном Asf1). Расчет проводился по следующей формуле (B – значение B-фактора):

$$RMSF = \sqrt{\frac{3B}{8\pi^2}} \quad (4)$$

Анализ структур нуклеосом с разной последовательностью ДНК

Поиск и сортировка структур нуклеосом, содержащих разную последовательность ДНК и, соответственно, разное число п.н., входящих в состав НКЧ, проводились Г.А. Армеевым; список идентификаторов структур для каждой группы представлен в Таблице 5. В список вошли структуры из базы данных RCSB PDB с разрешением выше 4 Å, содержащие белковые цепи 4, определяющиеся как гистоны H3, H4, H2AA и H2B, и две цепи ДНК; допускалось дополнительное присутствие белковых цепей, не являющихся коровым гистонами. Среди найденных структур нуклеосом выбирались те, чьи последовательности давали хорошее соответствие с одним из трех популярных вариантов нуклеосомной ДНК (Widom 601 длиной 145 п.н., α-сателлитной длиной 146 п.н. и α-сателлитной длиной 147 п.н.). Другие последовательности ДНК были исключены из анализа.

Таблица 5. Список структур нуклеосом с разной длиной нуклеосомной ДНК
(предоставлен Г.А. Армеевым)

<p>НКЧ с позиционирующей последовательностью Widom 601 145 п.н.</p>	<p>7K5Y, 7K63, 7K5X, 7K60, 4QLC, 6IR9, 7D1Z, 6RYR, 7SCZ, 6T93, 6YOV, 6PWE, 6NE3, 7LYB, 7NKY, 7K61, 7KBE, 6T90, 4LD9, 7JOA, 6DZT, 7NKX, 7LYA, 7LYC, 7KBD, 7JO9, 5X0X, 7A08, 7EG6, 5Z3O, 6ESF, 7ENN, 3LZ0, 7OHA, 6WZ5, 7OHC, 7E8I, 7MBN, 3MVD, 6K1P, 6T9L, 6JYL, 6O96, 6NOG, 4R8P, 7OH9, 3UT9, 6PA7, 6WZ9, 3LZ1, 6IRO, 6NZO, 7MBM, 3TU4, 7OHB, 6PX1, 6NN6, 6VZ4, 6KIU, 6ZHX, 6ZHY, 6UH5, 6UGM, 7E8D, 6S01, 7TN2, 7SWY, 6NQA, 6VEN, 7JZV, 6NJ9, 6X59, 7CRQ, 7CRO, 7CRR, 7CRP, 7DBH, 7VBM, 7EA8, 7EA5, 7XD1, 6FQ5, 7XD0, 6R1T, 7KTQ, 6JXD, 7CCQ, 7XCR, 7XCT, 7K6Q, 7K6P, 5MLU, 6Y5E, 6SE0, 6SEG, 6SE6, 7D20, 6TEM, 6BUZ, 6E0C, 6SEF</p>
<p>НКЧ с α-сателлитной последовательностью 146 п.н.</p>	<p>3WTP, 5X7X, 3AV2, 5XM0, 3AV1, 5B0Z, 3AZJ, 5E5A, 5B24, 3W96, 5JRG, 6R8Z, 3AZM, 6JR0, 5Y0D, 5B2I, 6R94, 2CV5, 5B1M, 3AZK, 3W99, 1EQZ, 3AZI, 3W97, 3AFA, 3AZN, 6JR1, 3AZL, 6KVD, 5GTC, 5Y0C, 4YM6, 5B2J, 6V2K, 3AZF, 3AZH, 3AZG, 3AZE, 3AYW, 1S32, 3O62, 1KX4, 5XM1, 3X1S, 3REL, 3REJ, 2NQB, 3UTB, 3C1B, 1KX3, 3REK, 3KXB, 5B0Y, 5GXQ, 5B40, 1M1A, 1ZLA, 5B1L, 3C1C, 1M19, 3A6N, 1M18, 1P3P, 1P3G, 1P3I, 1P3O, 1P3B, 1P3F, 1P3A, 1P3K, 1P34, 1P3M, 1P3L, 4Z5T, 5ZBX, 5AY8, 1AOI, 5Z23, 3W98, 3KWQ, 6KXV</p>
<p>НКЧ с α-сателлитной последовательностью 147 п.н.</p>	<p>5AVC, 5AV6, 5XF4, 5AV8, 4KGC, 5XF3, 5AV5, 5XF5, 5AV9, 5AVB, 3REI, 2NZD, 3MGQ, 4XUJ, 3MGS, 4J8V, 3UTA, 3B6F, 5DNM, 4WU8, 4J8X, 3LJA, 5CP6, 2PYO, 3REH, 3KUY, 3MGP, 3MNN, 3MGR, 4WU9, 4J8U, 3B6G, 1KX5, 5XF6, 5DNN, 4J8W, 5OMX, 5ONW, 5ONG, 6IPU, 4XZQ, 4Z66, 4YS3, 6IQ4, 7U46</p>

Глава 3. Динамика нуклеосом на мульти-микросекундном масштабе времен

3.1. Результаты

В рамках работы было проведено моделирование МД единичных нуклеосом на временах 10-15 микросекунд. На достигнутых временах моделирования удалось наблюдать спонтанное появление функционально важных движений: откручивания нуклеосомной ДНК и частичное скольжение ДНК относительно октамера гистонов [43]. В разделах 3.1.1 и 3.1.2 приведен анализ откручивания и скольжения ДНК, обнаруженного в самой долгой траектории нашего моделирования (15 мкс) – модель НКЧ₁₄₅ (см. Таблица 1).

3.1.1. Откручивание нуклеосомной ДНК

Наблюдаемое откручивание нуклеосомной ДНК в равновесной динамике выражается в виде динамического обратимого разворачивания ДНК у входа и выхода из нуклеосомы (Рисунок 11 А, Б). Можно выделить два этапа откручивания. На первом этапе происходит разворачивание фрагмента ДНК длиной 10-12 п.н.; такое откручивание наблюдалось у обоих концов нуклеосомной ДНК (дистального и проксимального) и имело обратимый характер на достигнутых временах моделирования (Рисунок 11 Б). В литературе применяется термин «дыхание» ДНК, обозначающий динамическое обратимое откручивание ДНК на первом этапе (Рисунок 11 В-Г).

В равновесной динамике также наблюдается более амплитудной откручивание ДНК – второй этап откручивания, затрагивающий фрагмент ДНК до 30 п.н, что составляет внешний полувиток суперспирали ДНК. (Рисунок 11 Д). Переход от первого этапа откручивания ко второму требует более долгих времен моделирования; нам удалось наблюдать откручивание до 30 п.н. для дистального конца ДНК нуклеосомы после 14 мкс моделирования (Рисунок 11 Б). На каждой из стадий откручивания, ДНК высоко подвижна и исследует широкий

конформационный ансамбль как в плоскости нуклеосомы, так и в плоскости, параллельной оси супервитка ДНК.

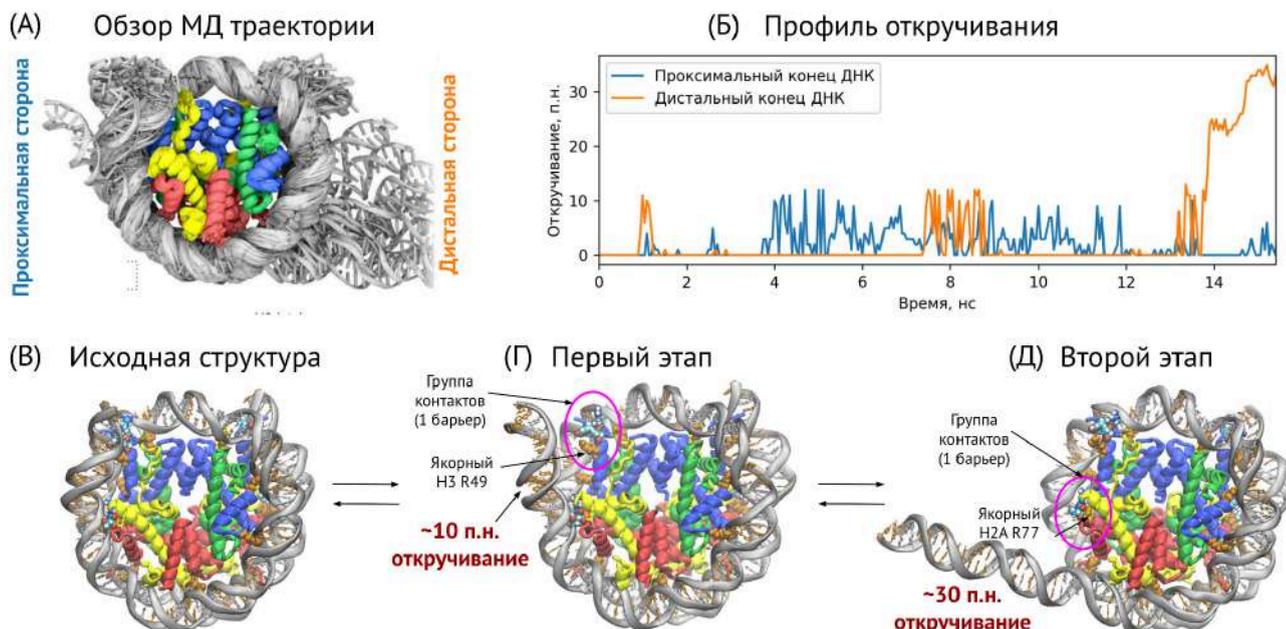


Рисунок 11. Динамика откручивания нуклеосомной ДНК в равновесном МД моделировании (НКЧ₁₄₅, 15 мкс). (А) Обзор МД траектории в виде наложения кадров МД траектории. (Б) Динамика изменения степени откручивания ДНК в ходе моделирования. (В-Д) Репрезентативные кадры МД траектории, иллюстрирующие разную степень откручивания ДНК.

Появление откручивания ДНК в динамике нуклеосомы связано с нарушением групп ДНК-гистоновых контактов у входа/выхода из нуклеосомы, называемых барьерами откручивания. В формировании первого барьера откручивания особое значение имеет участок гистона Н3 (остатки 39-49, включает в себя фрагмент N-хвоста и α N-спирали), играющий роль застежки («Н3-latch») путем формирования контактов одновременно и с концом ДНК у входа/выхода, и с внутренним витком ДНК. В состав Н3-застежки входит также якорный аргинин Н3 49, выход которого из малой бороздки ДНК в большой степени влияет на динамику «дыхания» ДНК (Рисунок 11 Г). Второй этап откручивания ДНК, продемонстрированный в МД расчетах (до 30 п.н.), связан с нарушением контактов ДНК с сайтом L1-L2, сформированным L2-петлей Н2А и L1-петлей

H2В; ключевую роль в этом сайте играет якорный аргинин H2А R77 (Рисунок 11 Д).

3.1.2. Скольжение нуклеосомной ДНК

Как известно (описано в разделе 1.1.3) в состав нуклеосом может входить ДНК разной длины (от 145 до 147 п.н.), что определяется наличием или отсутствием так называемых дефектов кручения ДНК. В МД траектории нуклеосомы с последовательностью ДНК Widom 601 (145 п.н., модель НКЧ₁₄₅) после 4 мкс моделирования произошло спонтанная релаксация такого дефекта кручения, приведшее к «втягиванию» дополнительной пары нуклеотидов ДНК во внутренний сайт нуклеосомы (SHL -5,5). «Втягивание» произошло благодаря скольжению фрагмента ДНК на проксимальной стороне нуклеосомы и привело к формированию структуры со стабильным измененным кручением двойной спирали ДНК этого фрагмента (Рисунок 12 А, желтая область). Наблюдаемое скольжение ДНК происходило по механизму штопорообразного закручивания ДНК (Рисунок 12 Б) и не привело к дестабилизации измененного фрагмента ДНК (Рисунок 12 В – проксимальный конец ДНК стабилен).

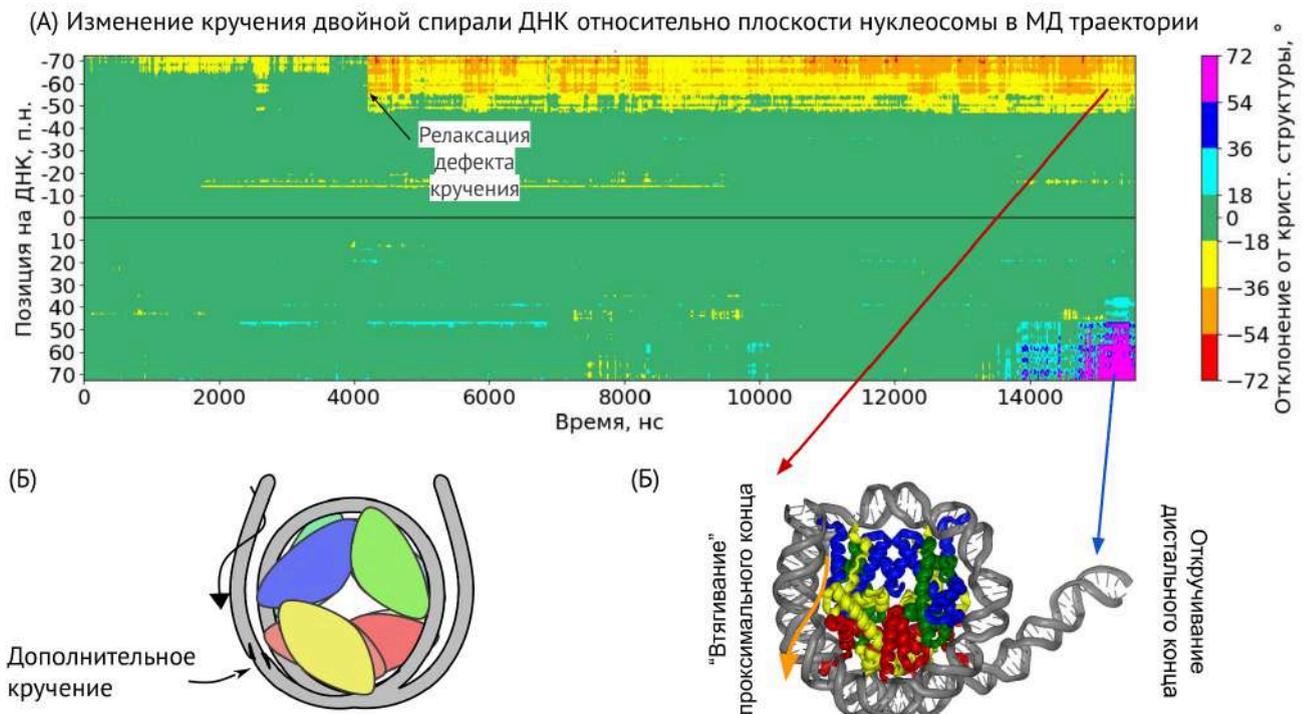


Рисунок 12. Скольжение нуклеосомной ДНК в равновесном МД моделировании (НКЧ₁₄₅). (А) Изменение кручения двойной спирали ДНК в траектории МД. (Б) Схематическое изображение наблюдаемого движения скольжения. (В) Репрезентативный кадр траектории.

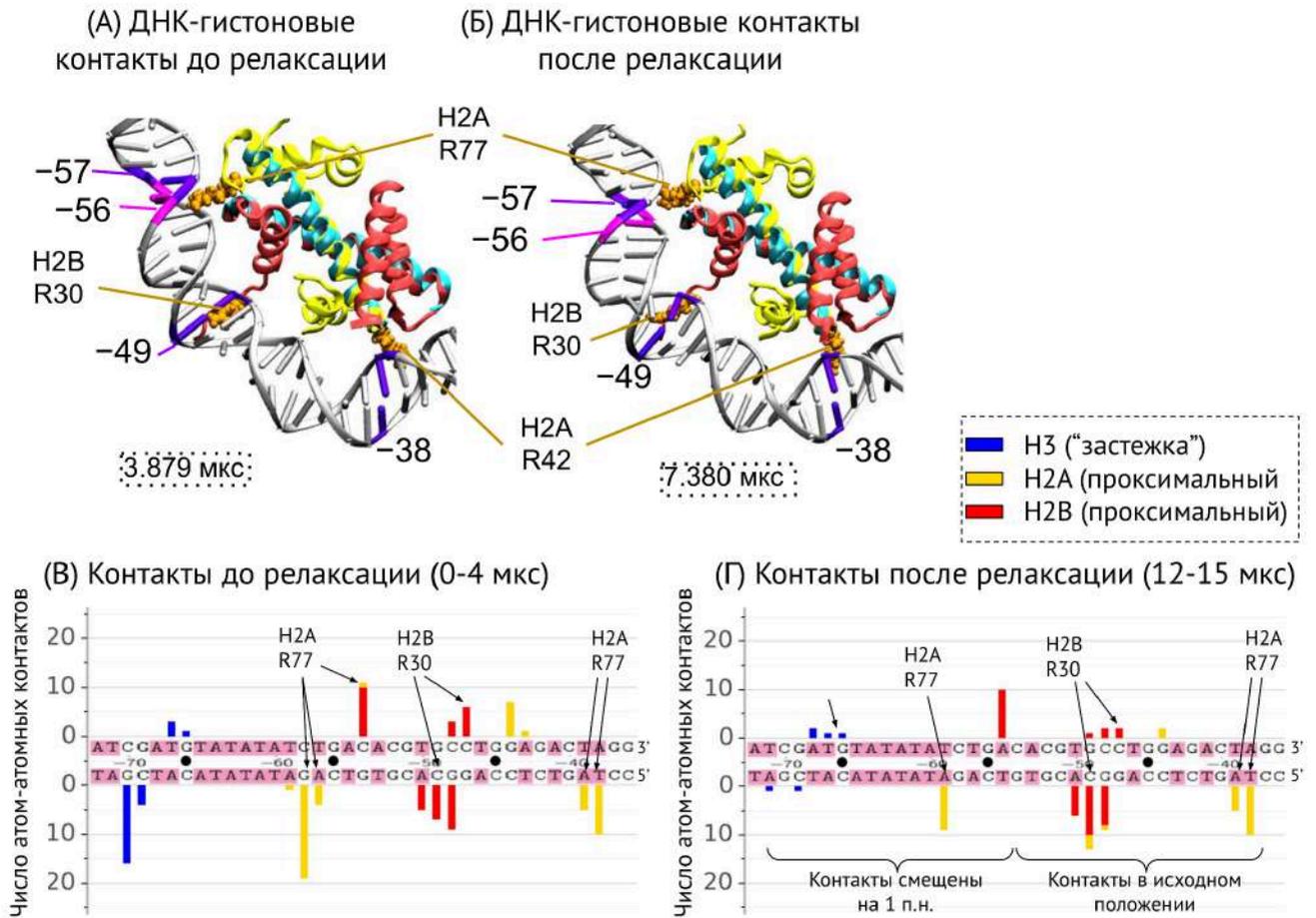


Рисунок 13. Реорганизация ДНК-гистоновых контактов при релаксации дефекта кручения ДНК в нуклеосоме. (А-Б) Изменение кручения ДНК в нуклеосоме. Показан фрагмент нуклеосомы в области сайта SHL -5,5. Выделенные цветом пары нуклеотидов -56 и -57 демонстрируют скольжение ДНК. Якорные аргинины показаны в виде молекулярной поверхности оранжевого цвета. (В-Г) Положение ДНК-гистоновых контактов относительно последовательности ДНК до и после релаксации.

При скольжении нуклеосомной ДНК происходит реорганизация ДНК-гистоновых контактов (потеря старых контактов и образование новых, Рисунок 13). Как было отмечено, наблюдаемое скольжение ДНК связано с

релаксацией дефекта кручения ДНК в сайте -5,5. До и после релаксации наблюдается аналогичные ДНК-гистоновые взаимодействия (Рисунок 13 А-Б), однако, контакты от сайта входа в нуклеосому до сайта SHL -5,5 смещаются относительно ДНК на 1 п.н., а контакты после сайта SHL -5,5 сохраняют свое положение (Рисунок 13 В-Г). Так как скольжение ДНК требует перестройки группы ДНК-гистоновых контактов, этот процесс статистически менее вероятен чем дыхание нуклеосомной ДНК, и происходит на больших временах моделирования (нам удалось наблюдать единичное свидетельство скольжения в равновесной мульти микросекундной МД нуклеосом).

3.1.3. Моделирование комплекса нуклеосомы с пептидом CENP-C_{мотив}

Продемонстрированные моды динамики нуклеосом (откручивание и скольжение) происходит спонтанно в равновесной динамике. С другой стороны, изменение кинетики движений ДНК в нуклеосомах может выступать механизмом регуляции прохождения геномных процессов через изменение последовательности гистонов, внесение модификаций гистонов и ДНК, а также через взаимодействие нуклеосом с белками хроматина. Согласно результатам высокопроизводительного скрининга [201], более половины взаимодействий нуклеосом с белками хроматина реализуется через определенную область на поверхности гистонового октамера с высокой плотностью отрицательно-заряженных аминокислот, называемую кислотным лоскутом («acidic patch», Рисунок 14 А). В состав кислотного лоскута входят остатки гистонов H2A (E56, E61, E64, D90, E91, E92) и H2B (E102, E110). В данном разделе была сделана попытка охарактеризовать структурно-динамические изменения нуклеосом при взаимодействии с белком-партнером через кислотный лоскут методами моделирования. Эксперименты коллег по измерению эффективности FRET между внутренними сайтами нуклеосомы показали, что пептид CENP-C_{мотив}, являющийся фрагментом центромерного белка CENP-C, приводит к формированию более компактных структур нуклеосом [202].

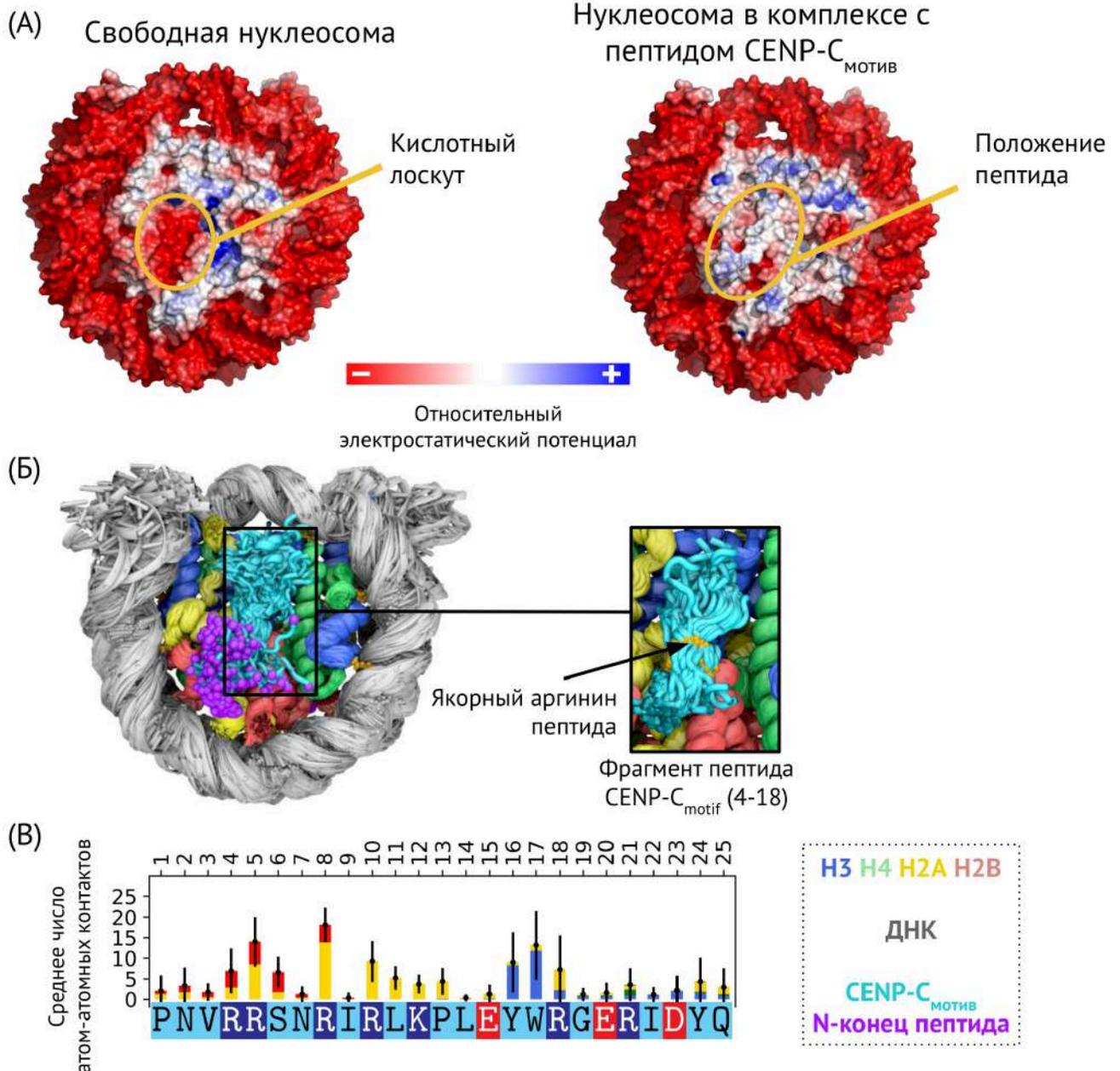


Рисунок 14. Взаимодействие нуклеосомы с пептидом CENP-C_{мотив}. (A) Изображение распределения электростатического потенциала на поверхности нуклеосомы в присутствии и в отсутствие пептида CENP-C_{мотив}. Для расчета и визуализации электростатического потенциала использовалась программа PyMOL [192] и встроенное расширение APBS. (Б) Динамика комплекса нуклеосомы с пептидом CENP-C_{мотив} (модель НКЧ_{CENP-C}). Представлена траектория МД (1 мкс) в виде наложения кадров. Оранжевым цветом в сноске показан остаток R8 пептида, формирующий стабильный контакт с кислотным лоскутом нуклеосомы. (В) Профиль числа контактов пептида с нуклеосомой вдоль последовательности пептида.

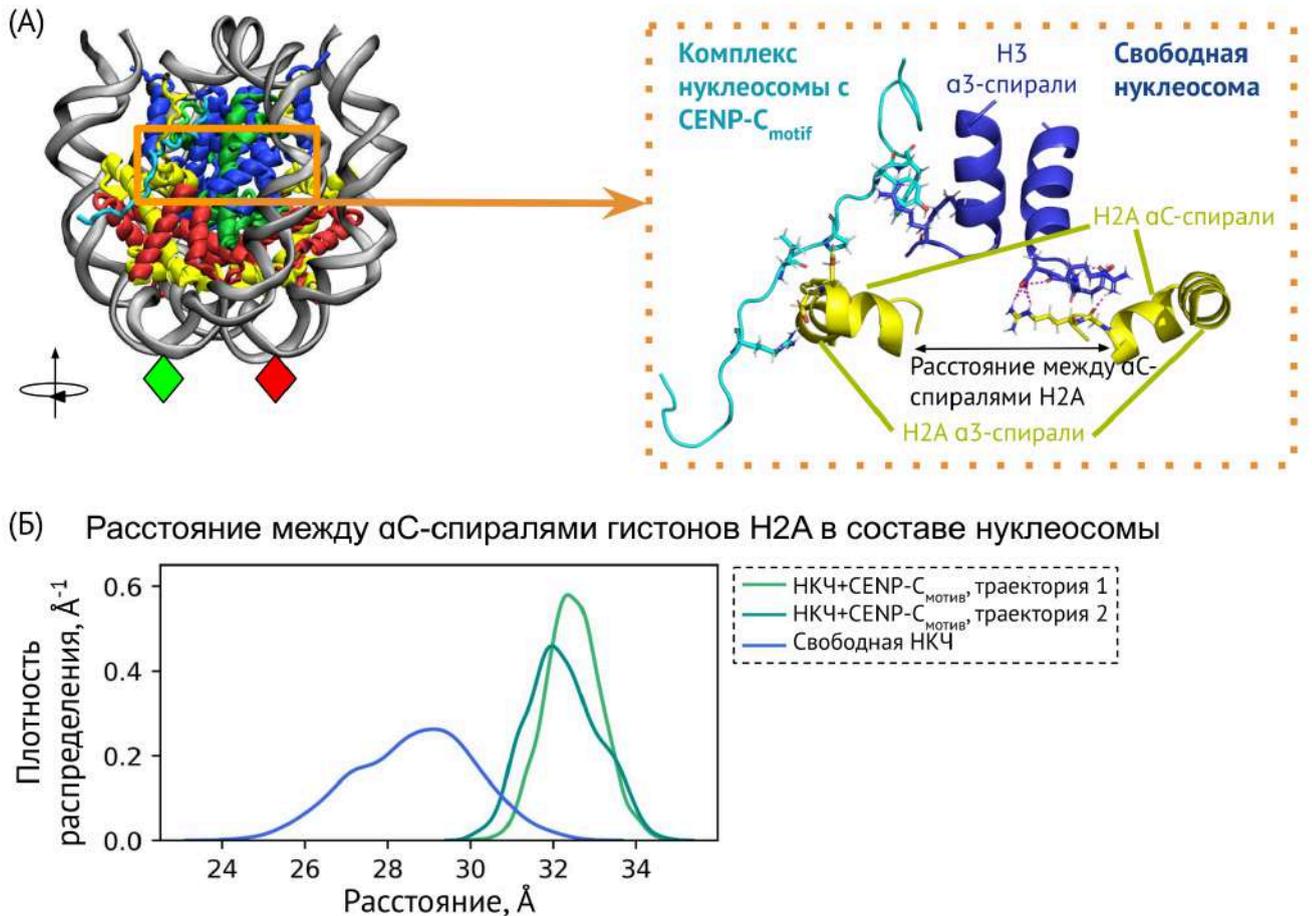


Рисунок 15. Изменения структуры нуклеосомы при связывании пептидом $\text{CENP-C}_{\text{мотив}}$. (А) Область взаимодействия пептида с гистонами H2A и H3 в сравнении с контактом между этими гистонами в нуклеосоме без пептида. Зеленый и красный ромбы обозначают область положения флуоресцентных меток в FRET-экспериментах. (Б) Распределение в динамике расстояния между αC -спиралями двух копий гистона H2A в нуклеосоме в присутствии и в отсутствии пептида.

Для описания влияния пептида $\text{CENP-C}_{\text{мотив}}$ на динамику нуклеосомы была построена атомистическая модель комплекса нуклеосомы с двумя пептидами $\text{CENP-C}_{\text{типов}}$ (с проксимальной и дистальной стороны) и проведены расчеты методом МД (длины расчетов – 1 мкс, пример траектории МД приведен на Рисунке 14 Б). Согласно расчетам, взаимодействие $\text{CENP-C}_{\text{мотива}}$ с нуклеосомой происходит главным образом через стабильный контакт между ключевым аргинином пептида с небольшой полостью, формируемой остатками кислотного

лоскута (что было известно из данных о структуре). Второй стабильной областью взаимодействий пептида с нуклеосомой является контакт между гидрофобной областью $\alpha 3$ -спирали гистона H3 и остатками пептида Y16 и W17 (Рисунок 14 В). Другие остатки пептида формировали транзитные контакты с гистонами.

При анализе структурных особенностей нуклеосомы при связывании пептида выяснилось, что при одновременном формировании контактов пептида с гистонами H3 и гистонами H2A происходит нарушение контакта между этими гистонами, характерного для структуры и динамики нуклеосом в свободном виде (Рисунок 15 А). Это приводит к «раздвижению» двух копий гистона H2A в центральной части гистонового октамера (Рисунок 15 Б). Однако изменений в области нуклеосомы, соответствующей положениям флуоресцентных меток в эксперименте (схематически изображены на Рисунке 15 А), не было обнаружено в МД расчетах (данные не приведены).

3.2. Обсуждение

Откручивание нуклеосомной ДНК

Мульти-микросекундная МД нуклеосом позволила смоделировать дыхание ДНК (10-12 п.н.) и откручивание внешнего полувитка суперспирали ДНК (до 30 п.н.) при физиологических условиях (ионная сила раствора 150 мМ). Важно отметить, что в нашей работе использовались модели нуклеосом с укороченными хвостами гистонов, что, как показано экспериментально [203,204], усиливает динамику откручивания. В аналогичных работах по моделированию микросекундной МД нуклеосом, но с полноразмерными гистоновыми хвостами описан только первый этап откручивания ДНК (10-12 п.н., ионная сила раствора 150 мМ, [168]). Откручивание внешнего полувитка ДНК в равновесном моделировании было показано ранее в работе Виноградова и Аксиментьева [169]: максимально авторы получили откручивание до 45 п.н., но моделирование проводилось в условиях высокой ионной силы (2 М $MgCl_2$). Высокая ионная сила значительно повлияла на время появления закрученного состояния нуклеосомы: авторы наблюдали откручивание в траекториях до 2 мкс, в то время как

сопоставимое откручивание в нашем моделировании удалось наблюдать только после 14 мкс моделирования.

В работе выделен участок гистона H3 («H3-застежка»), имеющий ключевое значение в появлении дыхания ДНК. Неупорядоченные хвосты гистонов H3 (N-конец) и H2A (C-конец), расположенные рядом с сайтом входа/выхода из нуклеосомы, также влияют на динамику дыхания ДНК, что было показано ранее в МД моделировании [168,205]. Нарушение и восстановление групп контактов, называемых барьерами откручивания (Рисунок 16), является кинетически долгим процессом, что делает процесс откручивания ДНК стадийным процессом (что согласуется с двухстадийным профилем откручивания, обнаруженном при силовом разворачивании нуклеосомы, см. раздел 1.2.5).



Рисунок 16. Схематическое представление стадий и барьеров откручивания ДНК в нуклеосоме.

В приведенных результатах наблюдалась асимметрия откручивания концов ДНК (показана на Рисунке 11 А), связанная с асимметрией последовательности ДНК с двух концов нуклеосомы, что согласуется с известными экспериментами [206]. Более того, в экспериментах по силовому разворачиванию нуклеосом оптическим пинцетом с мечением концов ДНК флуоресцентными метками (FRET) было описано явление, при котором откручивание ДНК с одной стороны нуклеосомы стабилизирует нуклеосомную ДНК на второй стороне [207]. Аналогичный эффект наблюдали в вычислительном эксперименте по силовому разворачиванию нуклеосом [165].

Связь последовательности ДНК со стабильностью нуклеосомы определяется жесткостью пар нуклеотидов в двойной спирали. Молекула ДНК имеет персистентную длину (порядка 50 нм [208]), заметно превышающую диаметр нуклеосомы (10 нм); соответственно, для формирования стабильной нуклеосомы требуется определенная гибкость ДНК, которая будет поддерживаться ДНК-гистоновыми контактами. Это объясняет феномен существования строго позиционирующих последовательностей, таких как Widom 601 [209], которая в МД расчетах формировала более стабильную нуклеосому в сравнении с последовательностями геномного происхождения (5S RNA [169], Esrrb/Lin28b [168], KRAS [60,170], TP53 [170,210] гены) или искусственными последовательностями (poly-AT [169], poly-GC [153,169], или poly-A [153]).

Скольжение нуклеосомной ДНК

Направленное скольжение нуклеосом в геноме производится комплексами ремоделирования хроматина с затратой АТФ. Однако спонтанное скольжение нуклеосомной ДНК также известно в литературе [174]. В работах двух научных групп в мульти-микросекундном моделировании были описаны процессы частичного скольжения ДНК нуклеосом [43,180,211]. Группа Ш. Ловерде продемонстрировала скольжение при моделировании в растворе с высокой ионной силой (2 М) с полноразмерными гистоновыми хвостами. В более поздней работе группы Ш. Ловерде [211] авторы приводят систематический анализ поведения нуклеосомной ДНК с разной последовательностью: α -сателлитной последовательностью и Widom 601. Нуклеосома с последовательностью ДНК Widom 601 демонстрировала как интенсивное откручивание ДНК на мульти-микросекундном масштабе времени, так и скольжение ДНК с релаксацией дефекта кручения в сайте SHL +5,5 (Рисунок 17, верхняя панель). Наблюдаемое смещение ДНК аналогично нашим результатам, но в описываемой работе смещение было смоделировано в ряде траекторий и в симметричных сайтах (SHL +5,5 и -5,5 в разных траекториях), в то время как в описанных в диссертации результатах такое движение является единичным наблюдением. Нуклеосомы с

α -сателлитной ДНК демонстрировали формирование дисторсий, которые определялись авторами как смещения центров масс пар нуклеотидов в направлении от центра нуклеосомы. Однако, формирование таких дисторсий α -сателлитной ДНК не приводило к смещению ДНК относительно гистонового ядра и реорганизации ДНК-гистоновых контактов в сайте SHL -5,5, как это было продемонстрировано на нуклеосомах с последовательностью ДНК Widom 601 (Рисунок 17, нижняя панель).

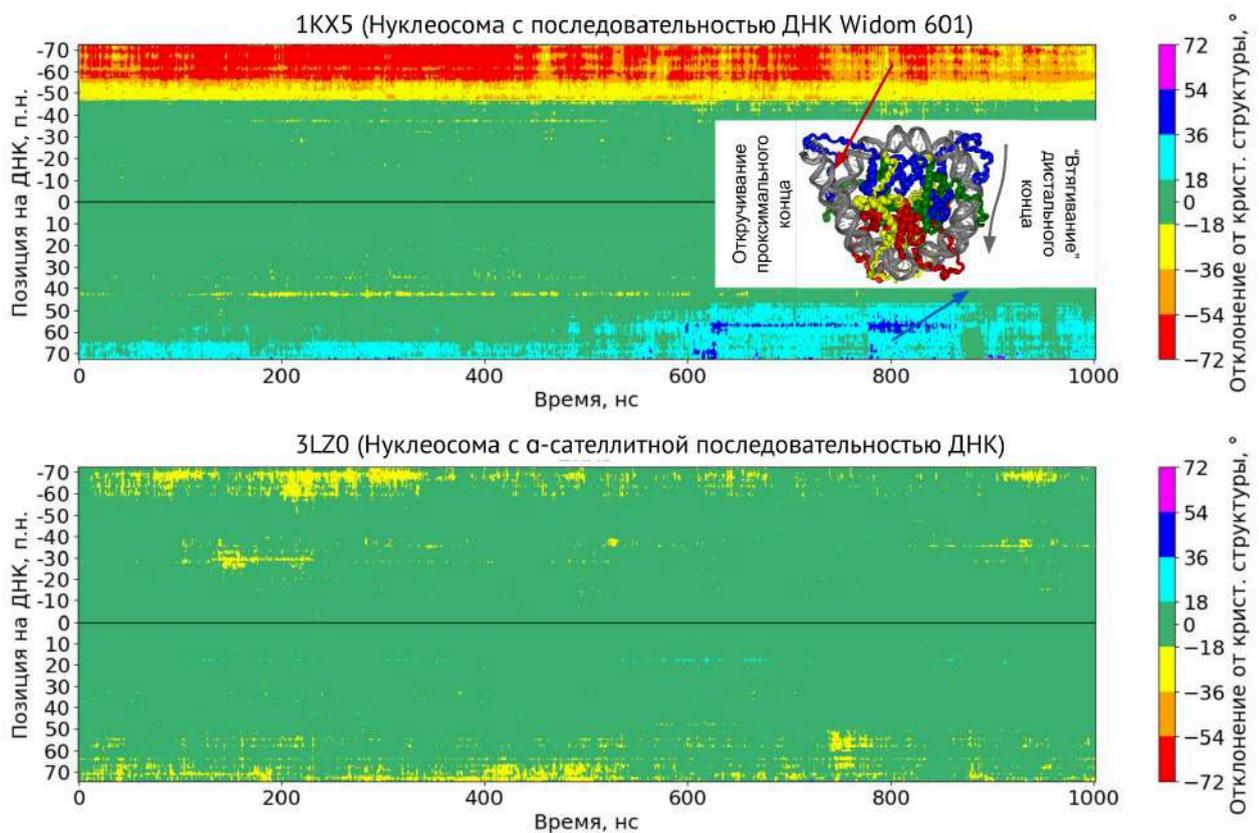


Рисунок 17. Анализ кручения суперспирали ДНК в траекториях МД, представленных в работе Khatua P. et al., 2024 [211]. Представлен расчет профиля относительного кручения пар нуклеотидов (относительно плоскости нуклеосомы) в выбранных МД траекториях для моделей на основе кристаллических структур 3LZ0 (145 п.н. нуклеосомная ДНК Widom 601) и 1KX5 (147 п.н. нуклеосомная α -сателлитная ДНК).

В отличие от работ группы Ш. Ловерде, в наших расчетах использовалась физиологическая концентрация соли (150 мМ), но были укорочены

неупорядоченные хвосты гистонов. В обоих случаях получали скольжение фрагмента ДНК у входа/выхода из нуклеосомы с увеличением скрученности двойной спирали ДНК в сайте нуклеосомы $SHL \pm 5,5$ («втягивание» дополнительной п.н.). При моделировании в растворе с высокой ионной силой время скольжения оказалось ниже (авторы наблюдали скольжение в траектории длиной до 1 мкс) в сравнении с моделированием в 150 мМ растворе (скольжение после 4 мкс моделирования), что подчеркивает важнейшую роль ДНК-гистоновых контактов, имеющих преимущественно электростатическую природу. Смоделированное движение согласуется с моделью скольжения путем диффузии дефекта кручения.

Во всех работах, описывающих формирование дисторсий ДНК и реорганизацию ДНК-гистоновых контактов в сайте $SHL +5,5$, не удавалось наблюдать дальнейшего перемещения дисторсии по ходу нуклеосомной ДНК. Таким образом, задача моделирования полного цикла скольжения нуклеосомной ДНК в атомистическом приближении еще не решена.

Взаимодействие нуклеосом с пептидом CENP-C_{мотив}

Проведение МД расчетов нуклеосом в комплексе с пептидом CENP-C_{мотив} позволило описать внутренние динамические изменения белкового ядра нуклеосомы. Однако нам не удалось воспроизвести изменения структуры суперспирали ДНК в нуклеосоме, показанное коллегами в FRET-эксперименте [202]. Можно предположить, что для воспроизведения показанного в эксперименте эффекта усиления компактности нуклеосомы при связывании пептидом происходит на временах динамики, превышающих длину нашего моделирования.

Задача получения достаточно длинных траекторий для демонстрации определенных динамических измерений и усиление наблюдений большим количеством повторностей упирается в активно-развивающиеся, но тем не менее ограниченные вычислительные ресурсы. Проведение вычислительно-затратных расчетов для решения широкого ряда вопросов структурной биологии хроматина

не представляется возможным, так как даже на уровне единичных нуклеосом реализуется огромный ландшафт взаимодействий с белками хроматина и способами эпигенетического маркирования нуклеосом. Отсюда вытекает необходимость перехода от попыток воспроизведения и интерпретации экспериментальных эффектов в МД расчетах к систематическому исследованию молекулярных механизмов динамики нуклеосом и поиску аллостерических путей динамики внутри нуклеосом.

Глава 4. Характеризация пластичности гистонов и ее связи с динамикой нуклеосомной ДНК

4.1. Результаты

Исследование пластичности глобулярного домена гистонов построено по пути декомпозиция нуклеосомы: было проведено моделирование свободных H2A-H2B и H3-H4 димеров для исследования мод внутренней динамики гистонов и сравнения ее с динамикой димеров в составе нуклеосом. Таким образом, проводилось моделирование трех типов атомистических моделей, представленных на Рисунке 4 А и в Таблице 1 раздела Методы.

4.1.1. Общее описание пластичности гистонов в составе свободных димеров и нуклеосом

Для исследования внутренней динамики димеров гистонов H2A-H2B и H3-H4 было проведено моделирование МД димеров, исходные конформации которых были взяты из кристаллической структуры нуклеосомы PDB ID 1KX5. Дальнейшее сравнение динамики свободных димеров будет проводиться с динамикой модели НКЧ₁₄₇, построенной на основе выбранной кристаллической структуры (PDB ID 1KX5). Общая структура глобулярного домена гистонов оставалась стабильной при моделировании свободных димеров (Рисунок 18 А и 19 А). Однако некоторые участки гистонов были более подвижны, чем в нуклеосоме, в связи с потерей контактов, которые формируются димером с ДНК и другими гистонами в контексте нуклеосомы. Отметим, что для сравнения именно внутренней динамики димеров в свободной форме и включенной в нуклеосому форме, траектории димеров в составе нуклеосомы были выровнены на исходную конформацию димера, что исключало движение димера в составе нуклеосом как целого. Рассмотрим отличия динамики свободных димеров и димеров в составе нуклеосом более детально.

При моделировании свободного димера гистонов H2A-H2B наиболее существенно ($RMSF$ остатков $> 2 \text{ \AA}$) усиливается динамика следующих участков: участок докинг домена и $\alpha 3$ -спирали гистона H2A и N-конца $\alpha 1$ -ext спирали H2A (Рисунок 18 А, Б). Петли L1 и L2 гистонов H2A и H2B в динамике свободного димера также продемонстрировали подвижность выше, чем в контексте нуклеосомы, в составе которой эти петли формируют L1-L2 сайты связывания ДНК. Интересно, что усиление подвижности для L1 и L2 петель гистонов произошло асимметрично: петли H2A L1 и H2B L2 (формирующие в нуклеосоме сайт связывания в SHL 3,5) оказались более подвижными чем H2A L2 и H2B L1 (формирующие в нуклеосоме сайт связывания в SHL 3,5). Подвижность спиралей гистонового фолда также несколько выше у свободного димера чем у димера в составе нуклеосомы.

Сравнение динамики свободного и включенного в состав нуклеосомы димера гистонов H3-H4 также показало увеличение подвижности гистонов в виде свободного димера (Рисунок 19 А, Б). Наибольшие изменения затронули αN -спираль H3, также известную как H3-застежка (H3-latch [43]), формирующую контакты с двумя витками ДНК (с внутренним витком в SHL ± 1 и с концом нуклеосомной ДНК в SHL ± 7). Также сильные изменения затронули C-конец $\alpha 3$ -спирали и $\beta 3$ лист гистона H4, участвующие в формировании контактов с H2B в составе нуклеосомы. Аналогично изменениям, описанным для димера H2A-H2B, повышается подвижность L1 и L2 (более заметно) петель, что связано с их ролью в формировании контактов с ДНК в составе нуклеосомы.

Альтернативный метод поиска свидетельств пластичности гистонов – анализ B-факторов структур нуклеосом и димеров, полученных методом PCA с высоким разрешением. B-факторы характеризуют флуктуации положений атомов в кристаллической структуре и связаны с тепловым движением атомов; профили B-факторов могут быть пересчитаны в профили RMSF (см. Методы для деталей расчета и Рисунки 18 Б и 19 Б с результатом расчетов). Экспериментальные данные достаточно хорошо описывают форму профилей флуктуаций положений атомов из расчетов МД, имея, однако, более высокие значения, что может быть

связано с ограниченностью по времени исследования конформационного пространства методом МД. В экспериментальных профилях подтверждается повышенная динамика гистонов в составе свободного димера по сравнению с димером в составе нуклеосомы, особенно в областях L1 и L2 петель. Повышенная динамика спиралей $\alpha 1$ H2A и αN H3 в димере относительно нуклеосомы подтверждается отсутствием экспериментальных данных для этих участков (не разрешены в структурах). Важно отметить, что для гистонов H3 и H4 в виде димера профили экспериментальных значений были получены из структуры H3-H4 димера с шапероном (в силу отсутствия известных структур интактных димеров), что повлияло на значения, особенно на С-конец $\alpha 2$ -спирали и на $\alpha 3$ -спираль гистона H3 и $\beta 3$ -листа H4 [212]. Также отличия данных эксперимента и МД были обнаружены для αC -спирали гистона H2A: в экспериментальной структуре димера гистонов H2A-H2B не была зафиксирована дезорганизация αC -спирали, наблюдаемая в МД свободного димера. Для этой спирали не были обнаружены контакты внутри кристаллической решетки, и причины этого отличия не были выяснены.

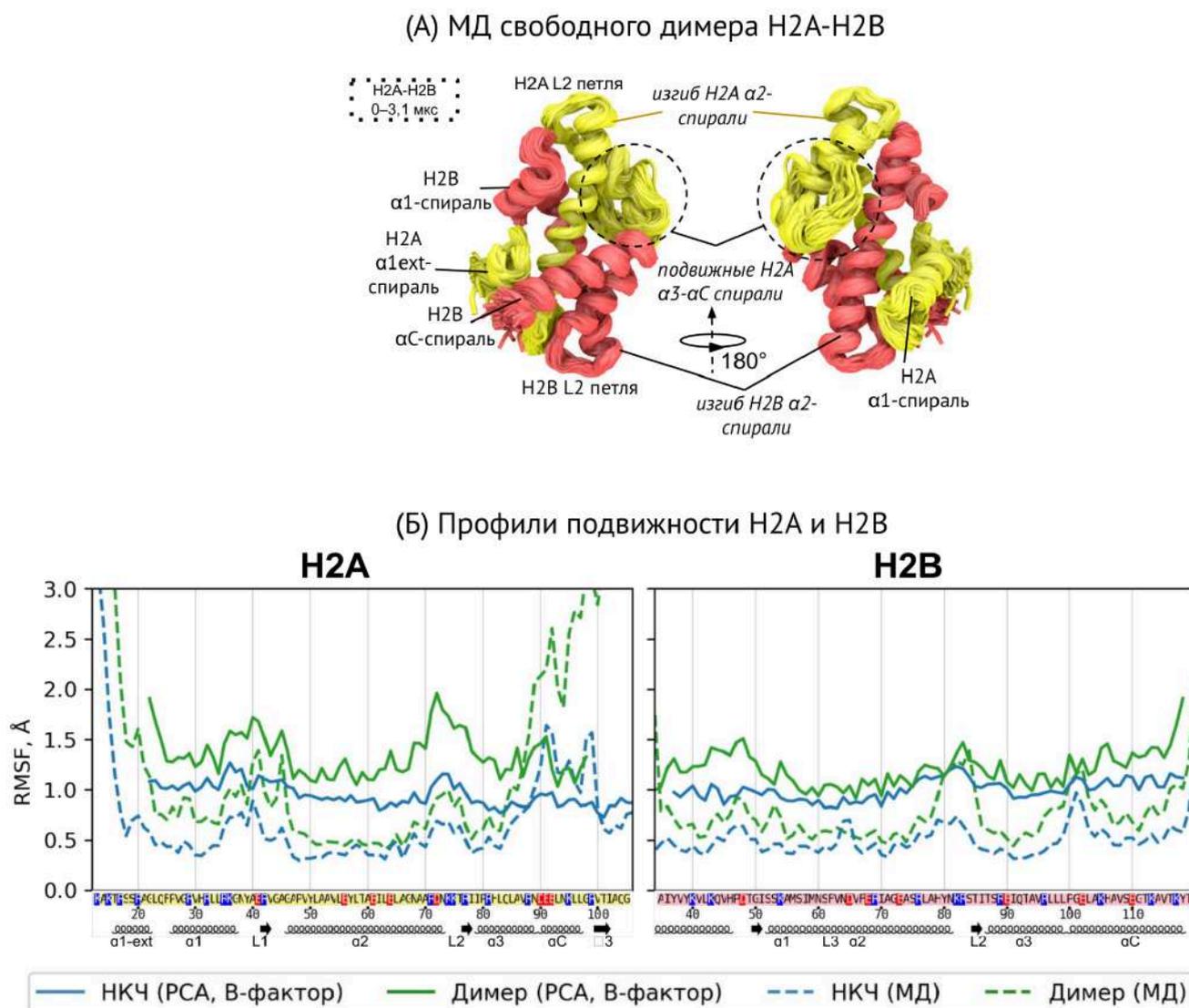
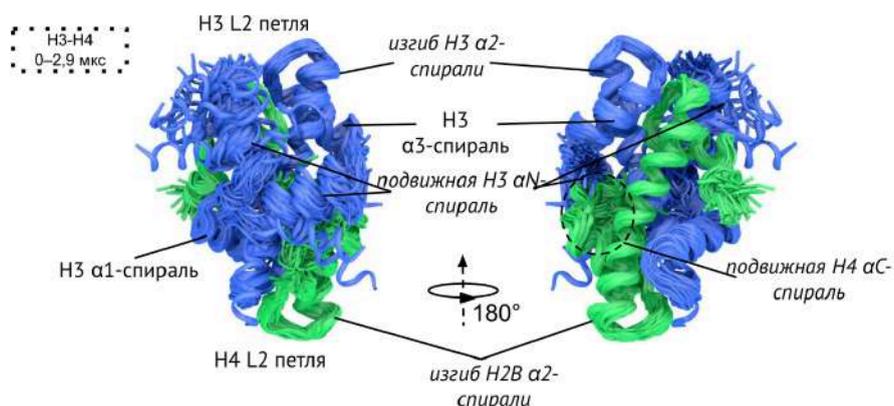


Рисунок 18. Внутренняя динамика димера гистонов H2A-H2B в свободном виде и в составе нуклеосом. (А) Обзор динамических состояний димера H2A-H2B в виде наложения кадров траектории МД. (Б) Профили среднеквадратичных флуктуаций (RMSF) положений $C\alpha$ атомов гистонов H2A и H2B в траекториях МД и экспериментальной структуре. Приведено сравнение свободного H2A-H2B димера и H2A-H2B димера в составе НКЧ₁₄₇. Для построения профиля RMSF для димера в составе нуклеосомы, предварительно было проведено выравнивание кадров траектории по координатам димера. Экспериментальные значения RMSF были рассчитаны из B-факторов структур, полученных методом PCA (для гистонов в составе димера и НКЧ PDB ID 1KX5 и 6K01, соответственно).

(A) МД свободного димера Н3-Н4



(Б) Профили подвижности Н3 и Н4

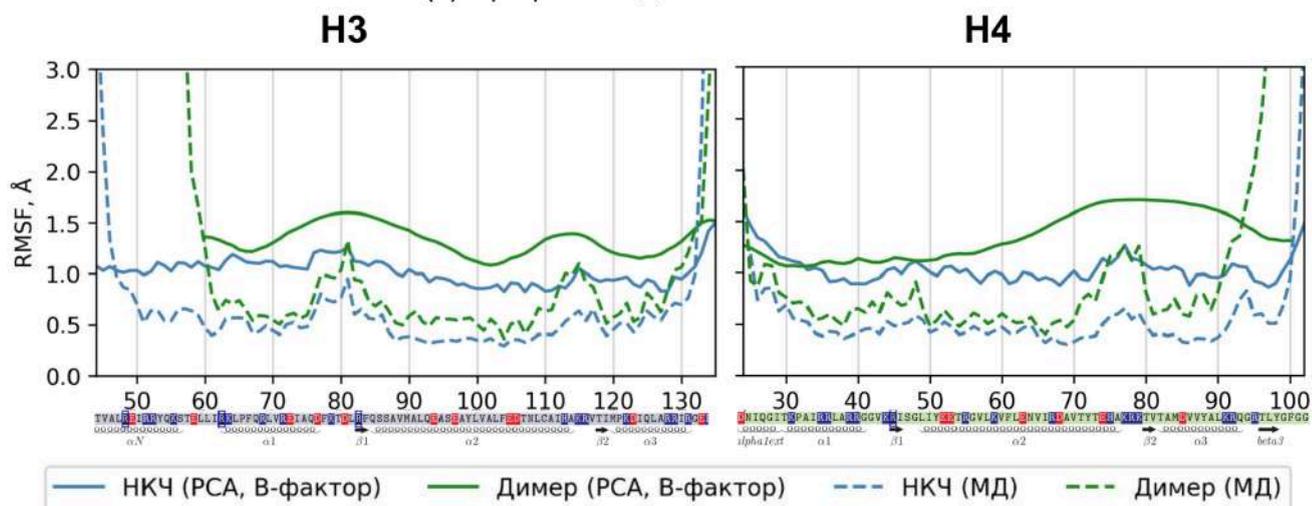


Рисунок 19. Внутренняя динамика димера гистонов Н3-Н4 в свободном виде и в составе нуклеосом. (А) Обзор динамических состояний димера Н3-Н4 в виде наложения кадров траектории МД. (Б) Профили среднеквадратичных флуктуаций (RMSF) положений Са атомов гистонов Н3 и Н4 в траекториях МД и экспериментальных структурах. Приведено сравнение свободного Н3-Н4 димера и Н3-Н4 димера в составе НКЧ₁₃₇. Для построения профиля RMSF для димера в составе нуклеосомы, предварительно было проведено выравнивание кадров траектории по координатам димера. Экспериментальные значения RMSF были рассчитаны из В-факторов структур, полученных методом РСА (для гистонов в составе димера и НКЧ PDB ID 1KX5 и 2IO5, соответственно).

4.1.2. Изгиб $\alpha 2$ -спиралей гистонов

Из анализа пластичности гистонов в МД можно отметить общую закономерность в повышении динамики С-концов длинных $\alpha 2$ -спиралей (Рисунок 18, 19, 20). $\alpha 2$ -спирали являются самыми длинными спиральями гистонов и формируют мотив связывания пар гистонов в составе димера (мотив «рукопожатие»). Амплитуда движений С-конца $\alpha 2$ -спиралей гистонов Н2А и Н2В составила 4,5 Å и 6,8 Å, соответственно, в динамике свободного димера. Амплитуда флуктуаций концов $\alpha 2$ -спиралей Н2А и Н2В в контексте нуклеосомы составила 4,2 Å (Рисунок 20 А). При этом, если проводить выравнивание кадров траекторий нуклеосом не по отдельным димерам, а по нуклеосоме целиком, то амплитуда колебаний С-конца $\alpha 2$ -спиралей принимает максимальное значение для Н2А гистона и составляет 7 Å (Рисунок 21 А,Б). Для гистонов Н3 и Н4 амплитуды флуктуаций концов $\alpha 2$ -спиралей в составе свободного димера составили 5,5 и 7,0 (Н3 $\alpha 2$ и Н4 $\alpha 2$), в составе нуклеосом – 3,0 и 3,1 (Рисунок 20 Б). Таким образом, оба типа димеров обладают пластичностью $\alpha 2$ -спиралей, амплитуда которой заметно уменьшается для димера Н3-Н4 в контексте нуклеосомы. Для димера Н2А-Н2В нуклеосомный контекст также уменьшает амплитуду изгиба, но не так сильно. Заметим, что среднее значение положений атомов в динамике димеров в составе нуклеосомы хорошо согласуется с экспериментальной структурой, при этом МД среднее в траекториях свободных димеров смещено относительно кристаллической структуры нуклеосомы. Из этого следует, что контекст нуклеосомы (контакты с ДНК и другими гистонами) влияет на степень изгиба $\alpha 2$ -спиралей димеров гистонов Н2А-Н2В и Н3-Н4.

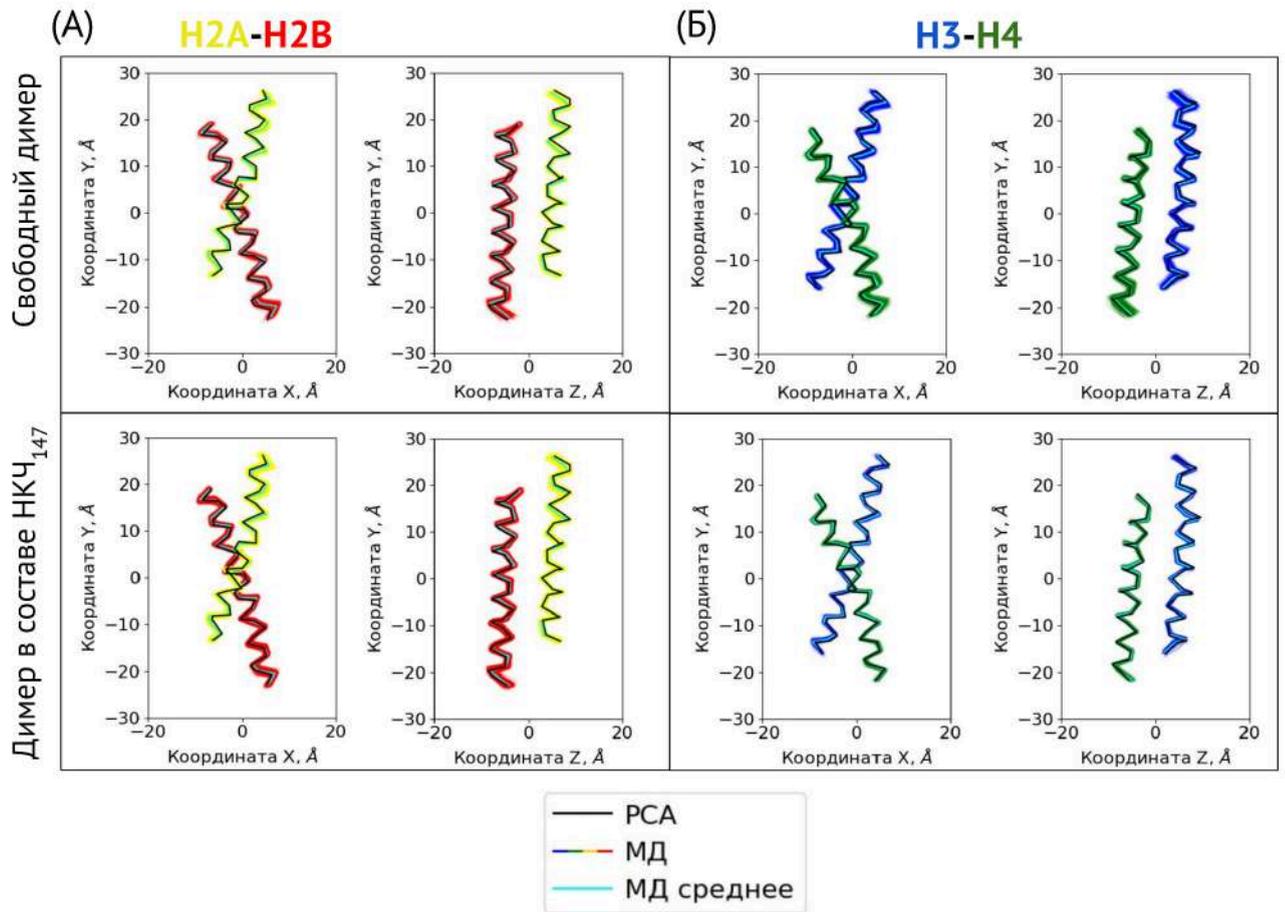


Рисунок 20. Пластичность $\alpha 2$ -спиралей гистонов. Проекция положений Са атомов $\alpha 2$ -спиралей гистонов H2A-H2B (A) и H3-H4 (Б) в МД траекториях на перпендикулярные плоскости системы координат димера.

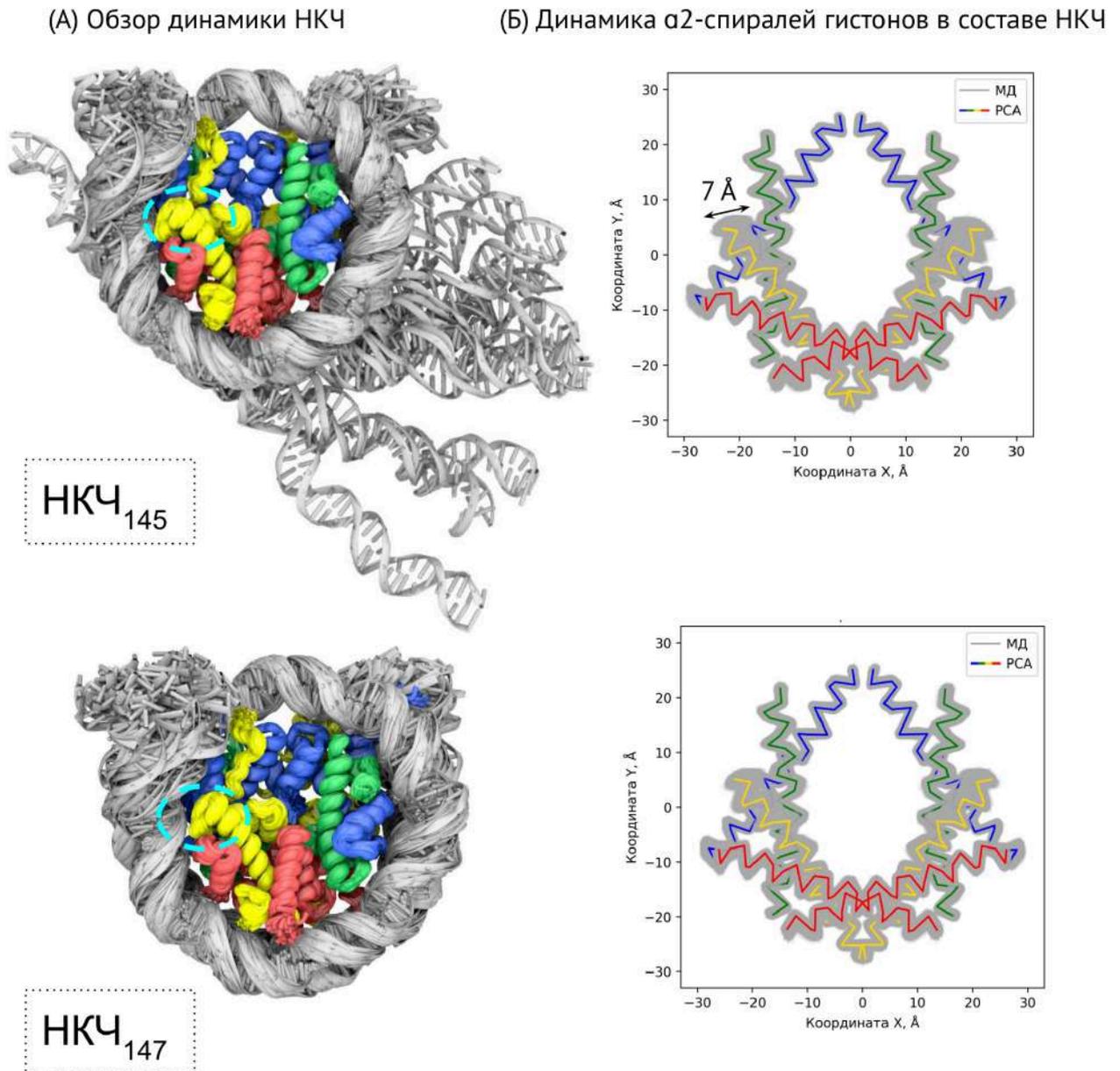


Рисунок 21. Динамика НКЧ с укороченными хвостами гистонов. (А) Обзор динамики НКЧ в виде наложения кадров траектории МД. (Б) Проекция положений Са атомов $\alpha 2$ -спиралей гистонов на плоскость нуклеосомы.

Для выделения коллективной переменной, описывающей наблюдаемый изгиб, был проведен анализ главных компонент матриц ковариаций положений Са-атомов в траектории МД. Такой анализ был применен для свободных димеров Н2А-Н2В и Н3-Н4, так как амплитуда динамики в этих траекториях выше. В анализе учитывались только $\alpha 2$ -спирали для извлечения характеристических мод изгиба, но не стохастических движений терминальных спиралей. Для димера

гистонов H2A-H2B (Рисунок 22) и H3-H4 (Рисунок 23) были охарактеризованы по две аналогичные моды: изгиб в плоскости OXY димера вдоль оси псевдосимметрии (описывает 24% и 35% вариативности положений атомов в динамике H2A-H2B и H3-H4), а также изгиб в плоскости OZY димера перпендикулярно оси псевдосимметрии (описывает по 11% вариативности положений атомов в обоих типах димеров).

В качестве более простой для вычисления и визуального представления геометрической переменной, описывающей изгиб димеров, был предложен угол между спиралью α_2 - α_2 , значения которого достаточно хорошо согласуются с проекцией кадров траектории МД на первый собственный вектор (корреляция Пирсона 0,92). Распределения углов для свободных димеров и димеров в составе НКЧ (Рисунок 22 Г и 23 Г) заметно пересекаются, однако распределения имеют разную ширину. Стандартные отклонения для угла в динамике свободных димеров составили $2,1^\circ$ (H3-H4) и $2,0^\circ$ (H2A-H2B), а стандартные отклонения в динамике димеров в составе НКЧ составили $1,5^\circ$ (H3-H4) и $1,2^\circ$ (H2A-H2B). Для обоих димеров можно видеть смещение наиболее вероятного значения угла свободной формы относительно связанной с НКЧ формы: формирование контактов димера с ДНК приводит к увеличению α_2 - α_2 угла и изгибу димера в сторону ДНК.

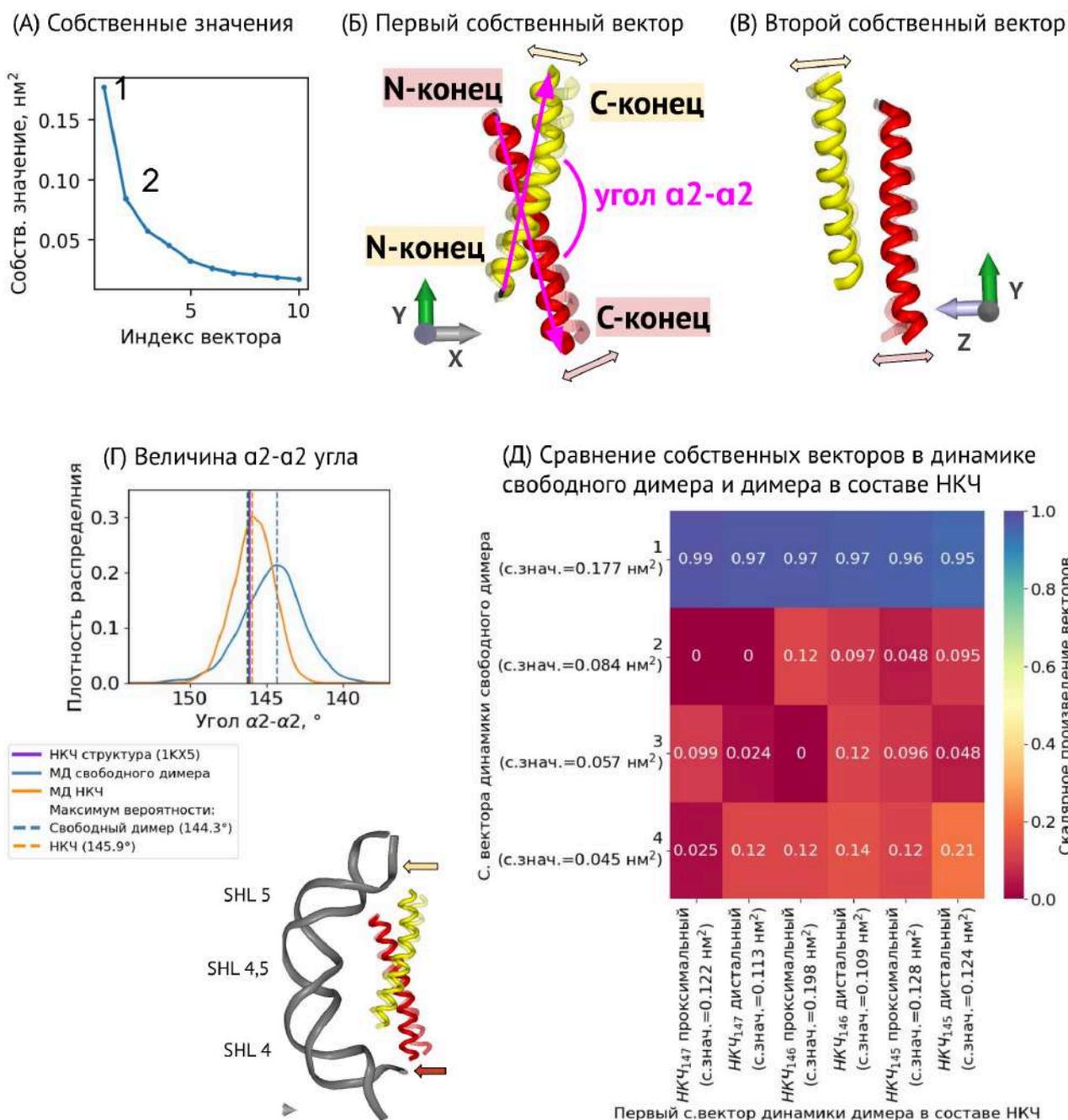


Рисунок 22. Внутренняя динамика изгиба димера H2A-H2B. (А-Б) Анализ главных компонент тепловых флуктуаций положений Ca атомов $\alpha 2$ -спиралей H2A-H2B. (А) Собственные значения, соответствующие первым 10 собственным векторам. (Б-В) Динамические моды, соответствующие первым двум собственным векторам. Показано наложение двух крайних МД состояний в проекции на собственный вектор. (Г) Распределение значений угла $\alpha 2-\alpha 2$ в МД траекториях свободного димера и димера в составе нуклеосомы. Сиреневая линия соответствует значению угла, принимаемого в кристаллической структуре НКЧ

(PDB ID 1KX5). Схематическое изображение направления смещения димера в контексте НКЧ приведено ниже. (Д) Сравнение первых собственных векторов динамики димера в составе НКЧ с четырьмя собственными векторами динамики свободного димера. Сравнение приведено в виде матрицы скалярных произведений векторов. Соответствующие векторам собственные значения указаны в скобках. Динамика двух копий димеров (проксимального и дистального) в составе НКЧ анализировалась независимо.

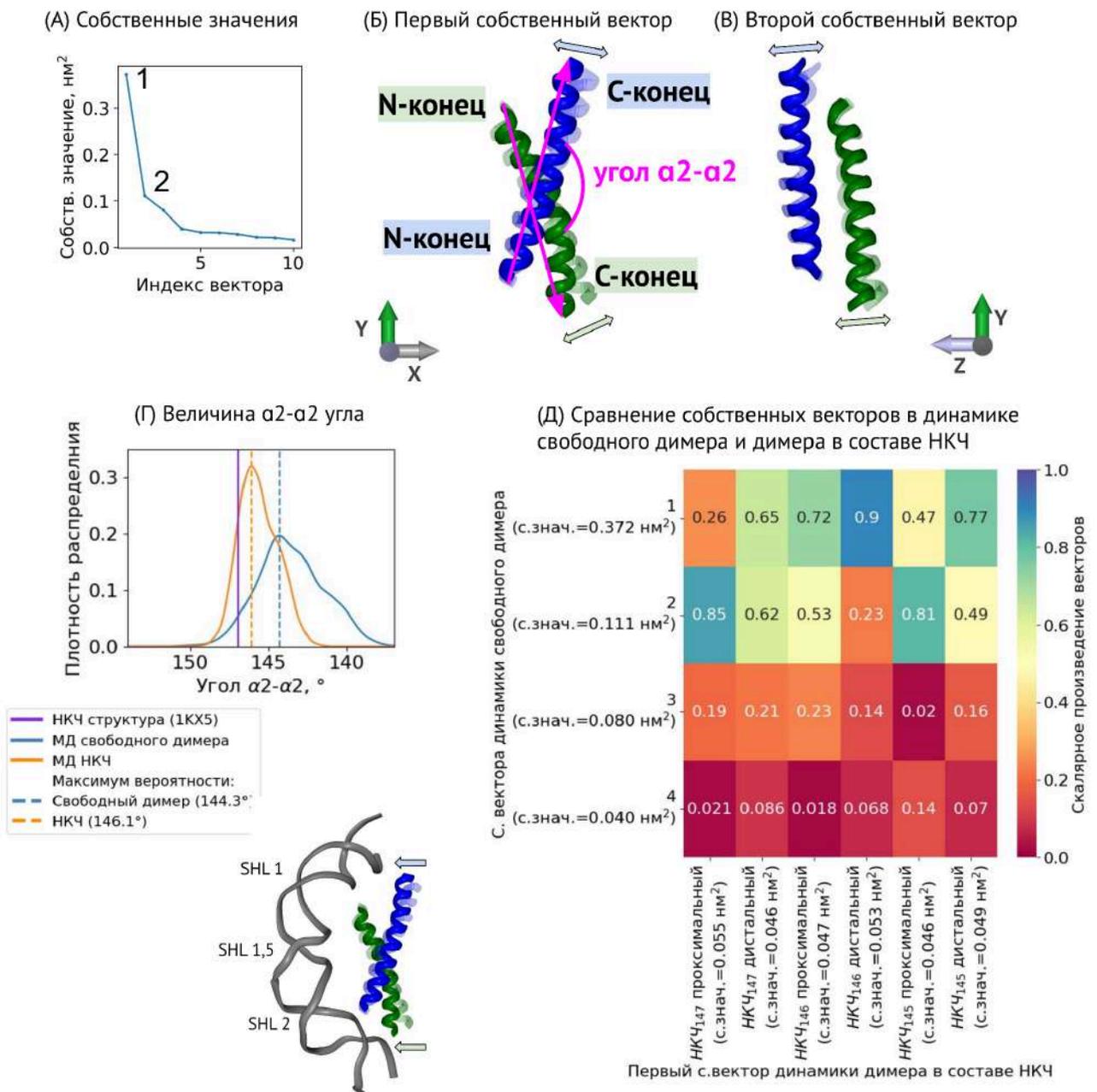


Рисунок 23. Внутренняя динамика изгиба димера НЗ-Н4. (А-Б) Анализ главных компонент тепловых флуктуаций положений Са атомов $\alpha 2$ -спиралей Н2А-Н2В. (А) Собственные значения, соответствующие первым 10 собственным векторам. (Б-В) Динамические моды, соответствующие первым двум собственным векторам. Показано наложение двух крайних МД состояний в проекции на собственный вектор. (Г) Распределение значений угла $\alpha 2$ - $\alpha 2$ в МД траекториях свободного димера и димера в составе нуклеосомы. Сиреневая линия соответствует значению угла, принимаемого в кристаллической структуре НКЧ (PDB ID 1KX5). Схематическое изображение направления смещения димера в контексте НКЧ приведено ниже. (Д) Сравнение первых собственных векторов динамики димера в составе НКЧ с четырьмя собственными векторами динамики свободного димера. Сравнение приведено в виде матрицы скалярных произведений векторов. Соответствующие векторам собственные значения указаны в скобках. Динамика двух копий димеров (проксимального и дистального) в составе НКЧ анализировалась независимо.

Для выяснения воспроизводимости характерных мод изгиба димеров был проведен аналогичный анализ главных компонент динамики димеров, извлеченных из ряда траекторий НКЧ (НКЧ₁₄₅, НКЧ₁₄₆ и НКЧ₁₄₇); копии димеров в составе нуклеосом анализировались независимо. Для сравнения собственных векторов из разных траекторий было рассчитано их скалярное произведение, принимающее значение 1 в случае сонаправленных векторов и 0 в случае ортогональных векторов. При сравнении первых собственных векторов динамики димера Н2А-Н2В в составе НКЧ с собственными векторами свободного димера (Рисунок 22 Д) было выявлено, что первая мода динамики димера Н2А-Н2В довольно четко воспроизводится в разных траекториях. При этом, соответствующие векторам собственные значения (характеризующие амплитуду движений) в траекториях НКЧ имеют тот же порядок, что и первое собственное значение динамики свободного димера. Сравнение мод динамики димера НЗ-Н4 из разных траекторий дало менее ясные результаты (Рисунок 23 Д): В разных

траекториях НКЧ первый собственный вектор динамики был более близок к первому или ко второму собственному вектору свободного димера, соответствующим изгибу вдоль оси псевдосимметрии или перпендикулярно ей. Вероятно, это связано с малой амплитудой динамики димера НЗ-Н4 в составе НКЧ (собственные значения первых векторов из траекторий НКЧ на порядок меньше первого собственного значения динамики свободного димера).

4.1.3. Связь пластичности димера гистонов Н2А-Н2В с последовательностью нуклеосомной ДНК и релаксацией дефекта кручения ДНК

Исходя из того, что изгиб димера Н2А-Н2В меняется при включении его в состав нуклеосом, необходимо установить, как влияет разная последовательность ДНК на степень изгиба димера. В данном разделе проводилось исследование динамики нуклеосом, начальная конформация которых была взята из кристаллических структур с разной длиной нуклеосомной ДНК (145 – 3LZ0, 146 – 1AOI, 147 – 1KX5, см. Таблицу 1). Также был проведен поиск структур нуклеосом в базе данных структур PDB и их сортировка по длине нуклеосомной ДНК (поиск и сортировка проводились Г.А. Армеевым, список идентификаторов структур приведен в Таблице 5), на основе которых также был проведен расчет углов изгиба димера Н2А-Н2В. Согласно полученным распределениям (Рисунок 24 А), структуры, содержащие 145 и 146 п.н., имеют немного более изогнутые димеры по сравнению со структурами, содержащими 147 п.н. Похожая тенденция наблюдалась для результатов МД расчетов: димеры Н2А-Н2В в модели НКЧ₁₄₇ релаксировали в сторону еще меньших значений углов димера, что, вероятно, связано с потерей ограничений, накладываемых кристаллическими условиями. В случае модели НКЧ₁₄₆ наблюдали асимметрию значений углов для дистального и проксимального димеров Н2А-Н2В, что связано с присутствием дефекта кручения ДНК только с одной стороны от диады. Однако моделирование динамики в течение нескольких микросекунд позволило Н2А-Н2В димеру также принять более низкие значения (Рисунок 24 Б) и приблизиться к распределению углов в траектории МД НКЧ₁₄₇.

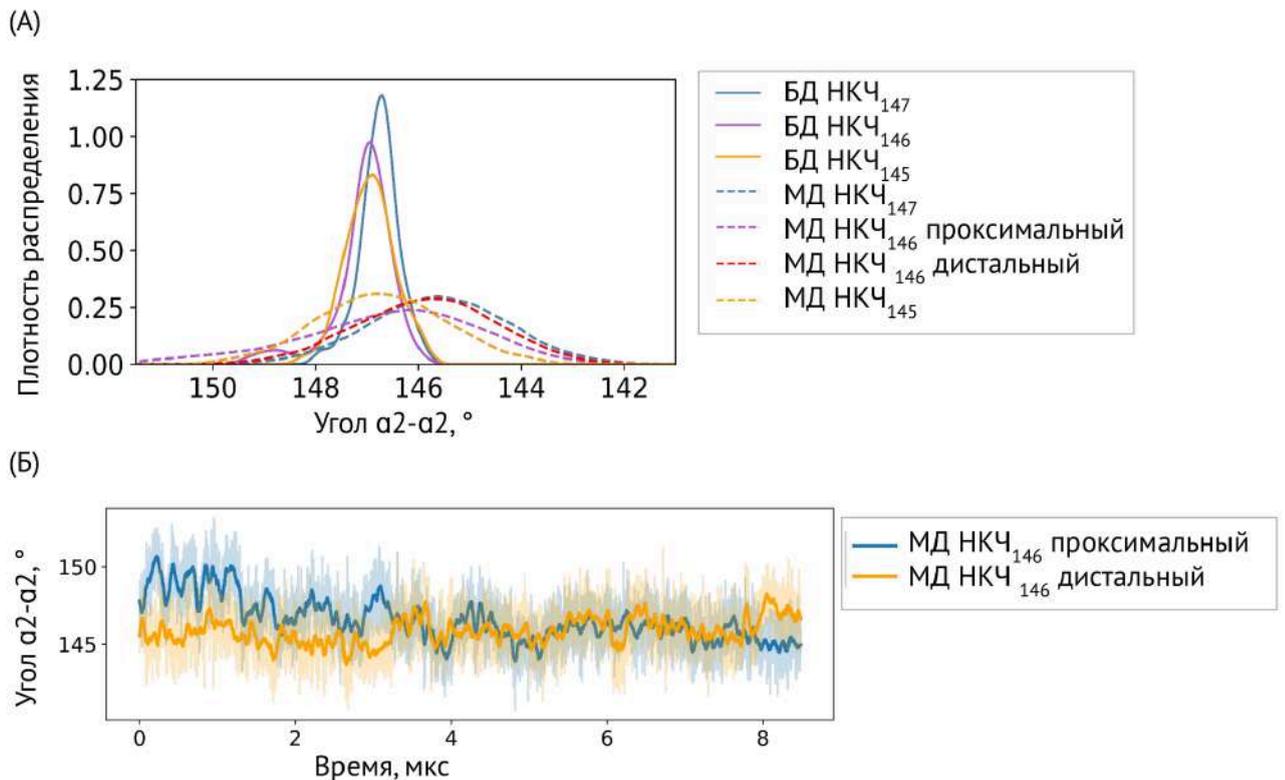


Рисунок 24. Изгиб димера Н2А-Н2В при разной длине нуклеосомной ДНК (145, 146 и 147 п.н.). (А) Распределения значений углов $\alpha_2-\alpha_2$ Н2А-Н2В в МД расчетах моделей НКЧ с разной последовательностью ДНК и в экспериментальных структурах НКЧ, сгруппированных по длине нуклеосомной ДНК. (Б) Динамика изменений углов $\alpha_2-\alpha_2$ Н2А-Н2В в траектории МД нуклеосомы с 146 п.н. ДНК (НКЧ₁₄₆).

Моделирование нуклеосомы с 145 п.н. ДНК дает смещение угла димера Н2А-Н2В в сторону более больших значений (Рисунок 24 А). Это может быть объяснено тем, что в структуре НКЧ₁₄₅ присутствует два симметричных дефекта кручения ДНК в $SHL \pm 5$, находящиеся внутри области контактов димера Н2А-Н2В. Из-за дефекта кручения между сайтами ДНК-гистоновых контактов находится на одну пару нуклеотидов меньше, чем в структуре НКЧ₁₄₇, что является дополнительным фактором, вызывающим изгиб димера. В траектории НКЧ₁₄₅ после 4 микросекунд моделирования произошла релаксация дефекта кручения с одной стороны нуклеосомы, сопровождающаяся «втягиванием» дополнительной пары нуклеотидов в нуклеосому (Рисунок 25 А-В).

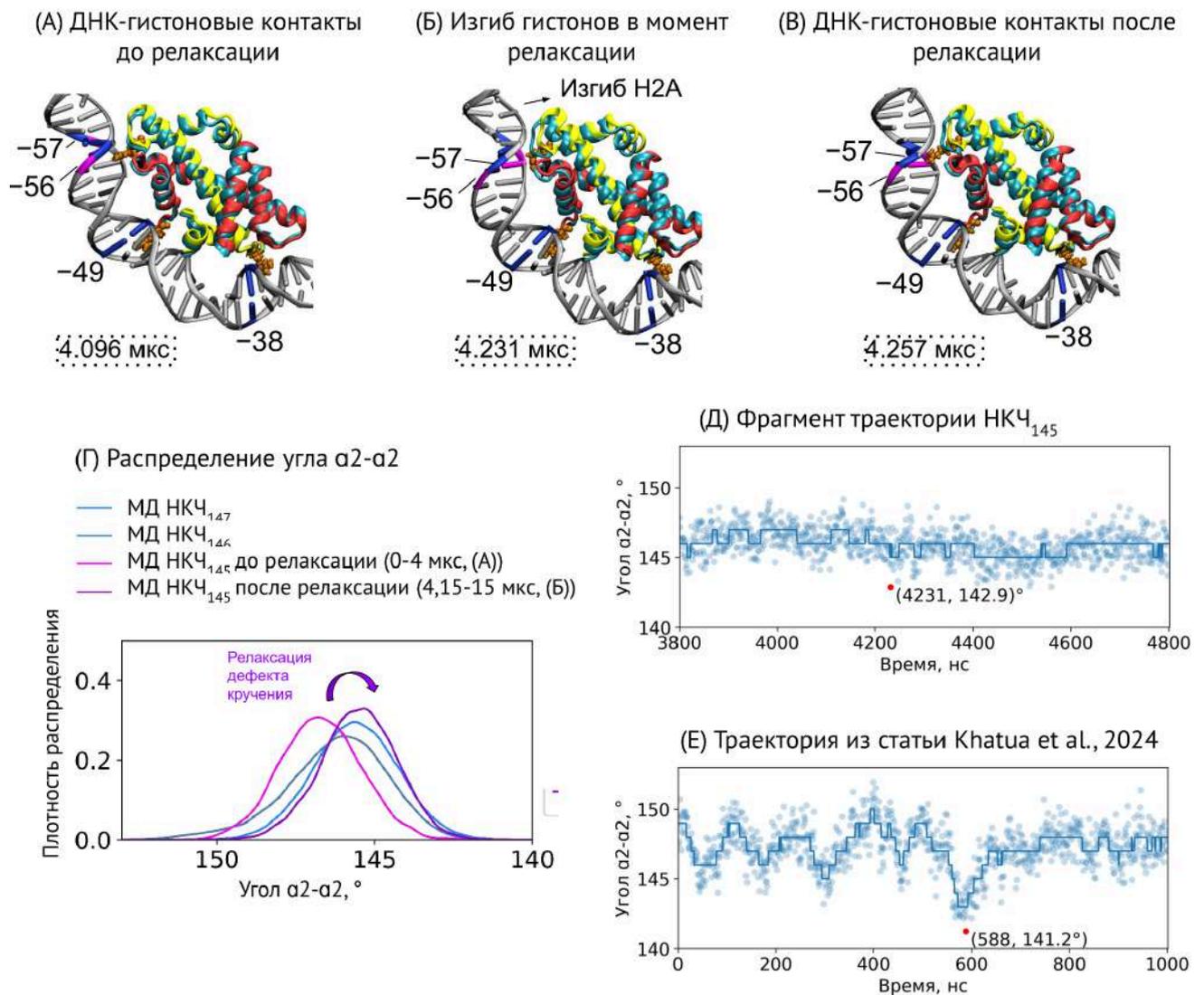


Рисунок 25. (А-В) Изгиб димера Н2А-Н2В в процессе релаксации дефекта кручения. Голубым показана конформация гистонов в кристаллической структуре. (Г) Изменение распределения изгиба димера Н2А-Н2В до и после релаксации дефекта кручения. (Д-Е) Изменение угла димера Н2А-Н2В в динамике. Приведены графики для траектории, описанной в диссертации (НКЧ₁₄₅), и для траектории из работы Khatua et al., 2024 [211]. Подписан кадр траектории, в котором наблюдалось минимальное значение угла димера.

Для перестройки ДНК-гистоновых контактов и прохождения локального скольжения ДНК нужен был изгиб димера в сторону центра нуклеосомы, что было описано в работе Армеев и др. [43]. Этот изгиб составил $142,9^\circ$, что на 3° меньше, чем максимум распределения углов в НКЧ ($145,9^\circ$, см. раздел 4.1.2).

Далее, значения углов димера были проанализированы до и после этого события (Рисунок 25 В); оказалось, что релаксация дефекта кручения привела к смещению распределения углов димера, которое стало хорошо совпадать с распределением углов НКЧ₁₄₇.

4.1.4. Пластичность димера H2A-H2B при откручивании внешнего полувитка суперспирали ДНК

Такие процессы, как откручивание нуклеосомной ДНК и сборка-разборка нуклеосом, вероятно, связаны с динамикой H2A-H2B димера в силу его расположения у сайтов входа и выхода из нуклеосомы [213]. В данном разделе проводилось исследование роли динамики димера H2A-H2B в откручивании нуклеосомной ДНК. Как было отмечено, откручивание ДНК – стадийный процесс динамической потери и восстановления стабильных ДНК-гистоновых контактов, сопровождаемый интенсивными флуктуациями свободного от контактов фрагмента ДНК. Была построена модель нуклеосомы с изначально открученным фрагментом ДНК длиной 25 п.н., соответствующей второй стадии откручивания и потере контактов ДНК с H2A L2-петлей и якорным аргинином H2A R77. В траектории МД такой системы наблюдали закручивание ДНК с восстановлением контактов (Рисунок 26). Первичное восстановление контактов произошло примерно за 500 нс моделирования (Рисунок 26 Б), но контакты первичной стадии имели транзистный характер. На этом этапе наблюдали изгиб димера гистонов H2A-H2B в сторону участка ДНК, способствуя формированию временных ДНК-гистоновых контактов. Сближение ДНК и гистонов позволило остатку H2A R77 взаимодействовать с фосфатами ДНК. На втором этапе прикручивания ДНК и гистоновый сайт связывания адаптировались друг к другу для восстановления стабильного контакта – встраивания H2A R77 в малую бороздку ДНК (Рисунок 26 В).

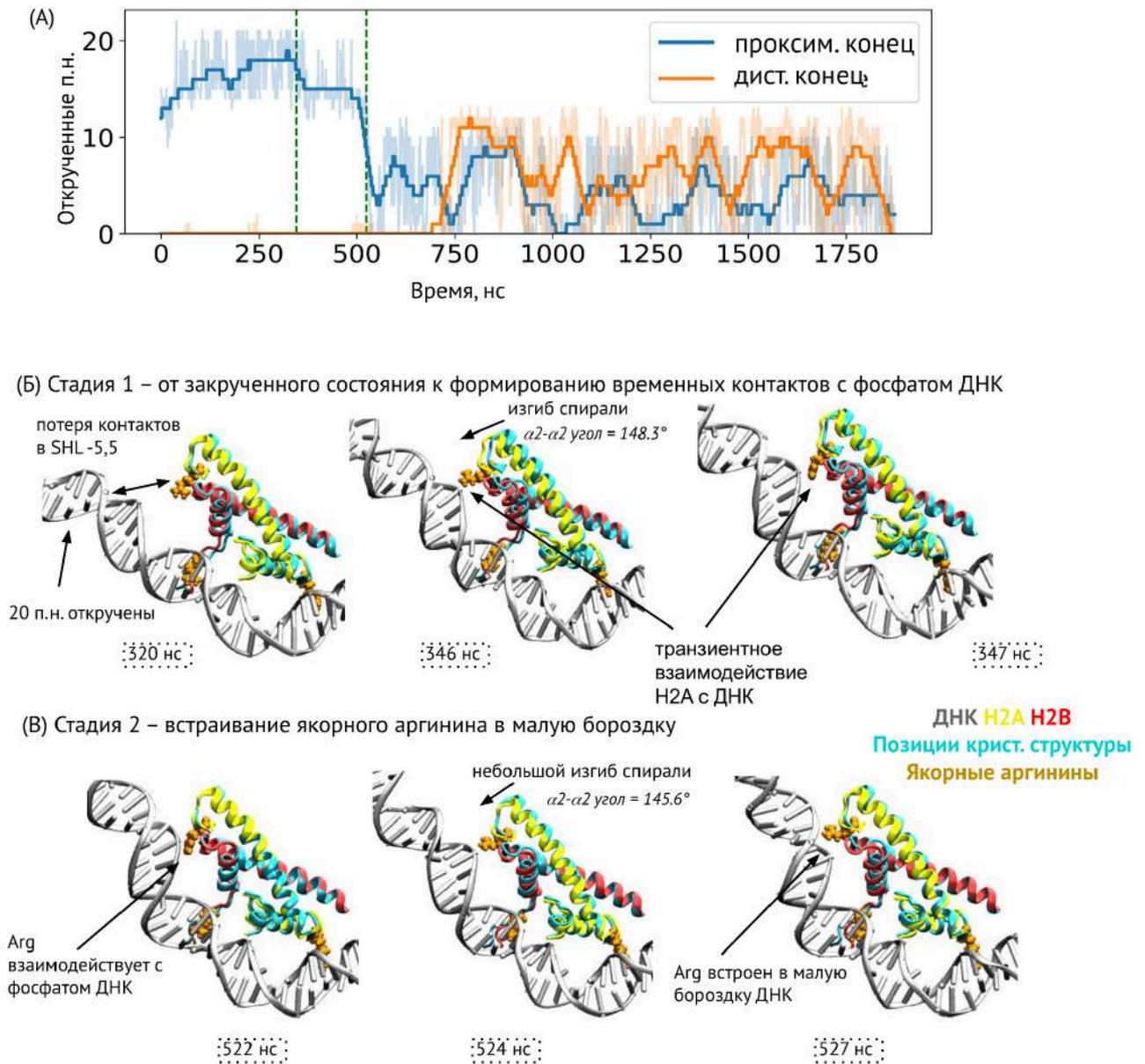


Рисунок 26. Прикручивание нуклеосомной ДНК, сопровождаемое изгибом димера H2A-H2B. (А) Степень откручивания ДНК в моделировании МД НКЧ с изначально открученным фрагментом ДНК длиной 25 п.н. на проксимальной стороне. Зеленые вертикальные линии отмечают временные точки событий прикручивания, изображенные на панелях Б и В. Тонкие полупрозрачные линии соответствуют мгновенным значениям откручивания; толстые линии изображают сглаженный сигнал с фильтром Савицкого-Голея с использованием окна 100 нс и полинома первой степени. (Б-В) Стадии восстановления ДНК-гистоновых контактов при прикручивании ДНК. Голубым показана конформация гистонов в кристаллической структуре.

4.2. Обсуждение

В этом разделе приводится исследование динамики отдельных компонентов, составляющих белковое ядро нуклеосомы – димеров гистонов H2A-H2B и H3-H4. Для исследования пластичности гистонов использовался анализ сравнения среднеквадратичных отклонений положений атомов в динамике, анализ проекций положений атомов в динамике нуклеосом и свободных димеров гистонов и анализ траекторий методом главных компонент. Для сравнения данных моделирования с экспериментальными данными были выбраны структуры нуклеосом и отдельных димеров, полученные методом РСА, из которых были извлечены В-факторы, или тепловые факторы, характеризующие смещения атомов в силу тепловых флуктуаций. В свободном виде димеры гистонов более динамичны, чем в составе нуклеосом, что подтверждается и МД расчетами, и анализом В-факторов. Наиболее большие отличия между свободной и нуклеосом-связанной формами наблюдаются для участков гистонов, формирующих сайты связывания с ДНК и другими гистонами. В частности, происходит разупорядочение короткого $\alpha 3$ -листа на С-конце гистона H4 из-за потери контактов с гистонами H2B; этот эффект был ранее показан авторами работы по исследованию структуры H3-H4 димера в комплексе с шапероном ASF1A [212]. Другими сайтами наибольших изменений стали докинг домен гистона H2A, формирующий взаимодействия с тетрамером гистонов (H3-H4)₂ в тетрасоме и обеспечивающий стабильность нуклеосом. Известна группа вариантных гистонов H2A, имеющих укороченный докинг-домен, структура которых менее стабильна, чем структура нуклеосом с каноническими гистонами [77]. Также при «извлечении» H3-H4 димера из контекста нуклеосомы значительно дестабилизируется αN -спираль гистона H3, выполняющая функцию регулятора откручивания нуклеосомной ДНК (формирует контакты с двумя витками ДНК).

Помимо динамики концевых спиралей гистонов, длинные $\alpha 2$ -спирали показали пластичность, наиболее выраженную в форме свободных димеров. Эти спирали формируют структурный мотив димеризации гистонов – мотив

«рукопожатие», общий для димеров H2A-H2B и H3-H4. Анализ пластичности $\alpha 2$ -спиралей для этих димеров также показал во многом сходные результаты. Оказалось, что свободные димеры склонны быть не только более динамичными, но и дают смещенное среднее состояние изгиба относительно димеров в контексте нуклеосомы (как в МД расчетах, так и в кристаллической структуре). При формировании ДНК-гистоновых контактов в сайтах связывания L1L2 происходит вытягивание димера в сторону контактов, сопровождаемое изменением кривизны фрагмента ДНК. Эти результаты могут служить механистическим обоснованием того факта, что для формирования суперспирали диаметром 10 нм из жесткой ДНК, вероятно, важна пластичность гистоновых структур.

Моды внутренней динамики димеров гистонов могут быть важны для работы молекулярных машин. Многие молекулярные машины взаимодействуют с сайтами SHL ± 2 и SHL ± 5 , которые фланкированы контактами димеров H3-H4 и H2A-H2B, соответственно, т.е. находятся внутри фрагментов ДНК, связанных димерами (Рисунок 22 Г, 23 Г). Например, в цикле работы ремоделеров происходит формирование дефекта кручения ДНК в сайте SHL 2; при этом процесс ремоделирования нуклеосом чувствителен к внесению межмолекулярных сшивок в димере H3-H4 [52]. Таким образом, ключевой внутренней модой динамики димеров гистонов является динамика изгиба, характерная для обоих видов димеров (H2A-H2B и H3-H4). Мода изгиба включает изгиб отдельных $\alpha 2$ -спиралей гистонов и, вероятно, является характерной модой для белков, взаимодействующих через структурный мотив «рукопожатие».

Нуклеосомный контекст способствует изменению изгиба $\alpha 2$ -спиралей гистонов H2A и H2B (изгиб в сторону ДНК). Дефекты кручения ДНК, которые локализуются в области между сайтами связывания гистонов H2A-H2B, вызывают дальнейший изгиб $\alpha 2$ -спиралей гистонов в сторону ДНК; при перестройке ДНК-гистоновых контактов в процессе релаксации дефектов кручения изгиб димера уменьшается и принимает значения, характерные для нуклеосом без дефектов кручения [214]. Процесс релаксации, однако, происходит с изгибом димера в сторону центра нуклеосомы [43], обеспечивая возможность

проскальзывания фрагментов ДНК в сайте L1L2. Между максимальным углом изгиба в состоянии с дефектом кручения и величиной угла изгиба для прохождения скольжения разница составляет 11° . Мы предполагаем, что внутренняя динамика димера H2A-H2B усиливает процесс скольжения ДНК. Эта гипотеза требует дальнейшего изучения экспериментальными методами. Опираясь на продемонстрированное в разделе 4.1.2 во многом схожее поведение димеров гистонов H2A-H2B и H3-H4, можно предположить, что прохождение скольжения ДНК по всей нуклеосоме имеет схожий механизм и требует пластичности всех 4 димеров гистонов нуклеосомы.

Так как ДНК вызывает изгиб димера в сторону контактов, мы предположили, что откручивание внешнего полувитка суперспирали ДНК могло бы способствовать релаксации изгиба димера в сторону центра нуклеосомы. Однако, в моделировании открученной нуклеосомы мы не обнаружили таких изменений, что свидетельствует о том, что не только ДНК-гистоновые контакты влияют на степень изгиба димера, но и взаимодействия внутри октамера гистонов. Более того, $\alpha 2$ -спираль H2A демонстрировала движения дальнейшего изгиба в сторону потерянных ДНК-гистоновых контактов, способствуя формированию первичных контактов в процессе прикручивания ДНК. Было выдвинуто предположение, что изгиб димера в сторону открученного фрагмента ДНК может определять стабильность нуклеосомы в целом, так как изменяет кинетику переходов между стадиями откручивания. В пользу этого предположения свидетельствует факт, что при внесении в димер H2A-H2B глутаральдегидных сшивок не происходит формирования стабильных нуклеосом из гексасом [54]. Аналогичные смещения $\alpha 2$ -спирали H2A наряду со смещениями других спиралей были продемонстрированы в исследовании методом криоЭМ перестроек нуклеосом при повышении концентрации соли, вызывающей откручивание ДНК [54].

Учет эпигенетического ландшафта генома, включая ПТМ гистонов и вариации их последовательности, значительно расширяет количество объектов исследования. Мы предполагаем, что влияние эпигенетических факторов на пластичность гистонов может быть одним из механизмов регуляции динамики и

стабильности хроматина. Более ранние работы фокусируются на исследовании ПТМ гистонов в области входа/выхода из нуклеосомы, а также на интерфейсе взаимодействий гистонов, влияющих на стабильность нуклеосом [10,215]. Однако, существуют и ПТМ глобулярной части гистонов. Например, для модификации H2A Y57ph было показано уменьшение термостабильности нуклеосом [216].

Таким образом, на степень изгиба димера H2A-H2B влияет последовательность нуклеосомной ДНК. Связь между изгибом димера гистонов и последовательностью ДНК обеспечивается механистическими свойствами ДНК и наличием/отсутствием дефектов кручения суперспирали ДНК. Процесс релаксации дефекта кручения требует изгиба H2A α 2-спирали в сторону центра нуклеосомы; соответственно для прохождения этого процесса требуется пластичность гистонов. Также пластичность важна для поддержания стабильности нуклеосом, участвуя в восстановлении утраченных в процессе откручивания ДНК контактов.

Глава 5. Влияние последовательности гистона на динамику нуклеосомы на примере вариантных гистонов H2A.J и H2A.Z

Глава 5 посвящена исследованию вопроса влияния последовательности гистонов на структуру и динамику нуклеосом (в частности, на описанную ранее пластичность димера H2A-H2B и на L1-L1 взаимодействие между копиями гистонов H2A в нуклеосоме). В качестве объектов исследования в этом разделе были выбраны две вариантные формы гистона H2A: H2A.Z и H2A.J.

5.1. Результаты

5.1.1. Динамика димера H2A.Z-H2B и H2A.Z-содержащей нуклеосомы

Для исследования внутренней динамики вариантного гистона *Homo sapiens* H2A.Z были построены атомистические модели димера гистонов H2A.Z-H2B и H2A.Z-содержащих нуклеосом. МД НКЧ, содержащей в составе H2A.Z гистон, продемонстрировала интенсивное откручивание ДНК, сильнее проявленное с одного конца НКЧ и появившееся уже на первой микросекунде моделирования (Рисунок 27 А,Б). В нашей работе проводилась одна повторность моделирования НКЧ длиной 6 микросекунд, поэтому определенных выводов о влиянии варианта на стабильность нуклеосом сделать нельзя. Однако статистически значимое откручивание ДНК в вариантной нуклеосоме позднее показали в работе Li et al., проведя сравнительное моделирование нуклеосом с H2A и H2A.Z с суммарным временем моделирования 84 микросекунды [210].

Далее мы исследовали пластичность димеров H2A.Z-H2B с точки зрения динамики изгиба, описанной в Главе 4 (Рисунок 27 В,Г). Динамика изгиба свободного димера H2A.Z-H2B хорошо согласуется с динамикой канонического димера H2A-H2B, однако принимая более широкий диапазон значений угла $\alpha_2-\alpha_2$, отражая большую пластичность вариантного гистона. Динамика изгиба димера в составе НКЧ дает смещенное распределение угла $\alpha_2-\alpha_2$ в вариантной системе в

сторону ДНК (наиболее вероятный угол H2A.Z-H2B димера в НКЧ на $3,8^\circ$ больше, чем у H2A-H2B димера в НКЧ). Изгиб вариантного димера в составе НКЧ сильнее с дистальной стороны (с умеренным откручиванием ДНК), но и на проксимальной стороне димер принимает более изогнутые конформации по сравнению с канонической НКЧ. Из этого следует, что $\alpha 2$ -спирали гистона H2A.Z более пластичны, и, как следствие, изгиб, вызванный формированием ДНК-гистоновых контактов, выше, чем в канонических нуклеосомах.

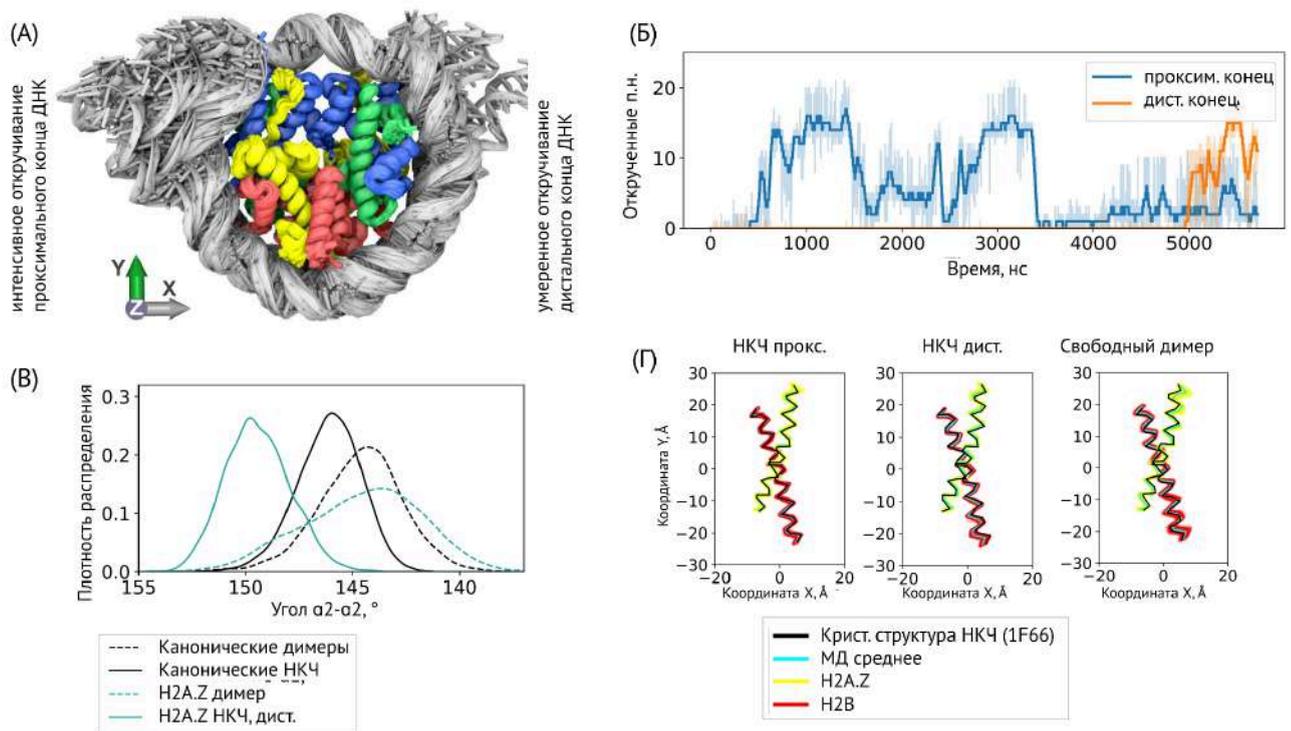


Рисунок 27. МД моделирование систем с вариантным гистоном H2A.Z. (А) Обзор траектории МД H2A.Z-содержащей НКЧ в виде наложения кадров траектории. (Б) Динамика откручивания нуклеосомной ДНК в траектории МД H2A.Z-содержащей НКЧ. (В-Г) Пластичность гистона H2A.Z в составе димера и НКЧ. (В) Распределения значений углов $\alpha 2$ - $\alpha 2$ для канонического H2A-H2B и вариантного H2A.Z-H2B димеров в свободном состоянии и в контексте нуклеосом. (Г) Проекция положений Ca атомов $\alpha 2$ -спиралей гистонов H2A(.Z) и H2B в траекториях МД.

Недавние экспериментальные данные по гистонам *S. cerevisiae* свидетельствуют о том, что различия между H2A и H2A.Z на N-конце $\alpha 2$ -спирали

(G47K и P49A у дрожжей, G46T и P48A у человека, Рисунок 28 А) влияют на термостабильность нуклеосом и способность ремоделера SWR1 у дрожжей различать канонические и H2A.Z-содержащие нуклеосомы [39,40]. Хотя у *S. cerevisiae* H2A.Z имеет другую аминокислотную замену в одной позиции (G47K у дрожжей против G46T у человека), гистоны H2A.Z у всех эукариот имеют последовательность, в которой глицин и пролин на N-конце $\alpha 2$ -спирали канонического H2A замещены другими аминокислотами, что подчеркивает важность замен в этих позициях [66].

Мы провели детальный анализ конформационной динамики области N-конца $\alpha 2$ -спирали гистонов H2A и H2A.Z. Анализ элементов вторичной структуры показал, что этот участок может претерпевать переход между α -спиральной конформацией и конформацией поворота с водородной связью (Рисунок 28 Б,В). Такой переход наблюдался как для систем H2A, так и для систем H2A.Z, и в виде свободного димера, и в контексте нуклеосомы. Однако частота появления различных конформаций существенно различалась между системами с гистонами H2A и H2A.Z. Равновесие в системах H2A.Z было существенно смещено в сторону наличия α -спиральных конформаций вблизи T49 (G46 в H2A). Эта тенденция была более выражена для H2A.Z-содержащих нуклеосом, чем для свободных димеров H2A.Z-H2B. Стабилизация N-конца $\alpha 2$ -спирали в H2A.Z сопровождается образованием водородной связи между карбонильным кислородом остатка A48 и азотом остова остатка V52 (Рисунок 28 В, левая панель). В траекториях происходили переходы к конформации поворота, сопровождаемые потерей водородной связи A48-V52 (подтверждено тестом Фишера, p -value < 0.01). Поворот поддерживается другой водородной связью – между карбонильным кислородом остатка G47 и азотом остова остатка A50. Для канонического гистона H2A также наблюдали обе конформации N-конца $\alpha 2$ -спирали (Рисунок 28 В, правая панель), где водородная связь A45-V49 соответствовала появлению α -спирали, а связь G44-A47 соответствовала повороту. Позиции ключевых замен находятся внутри витка α -спирали (в случае ее появления) и, соответственно, являются важными для стабильности такой

конформации, что объясняет смещение равновесия между конформациями для гистонов H2A и H2A.Z.

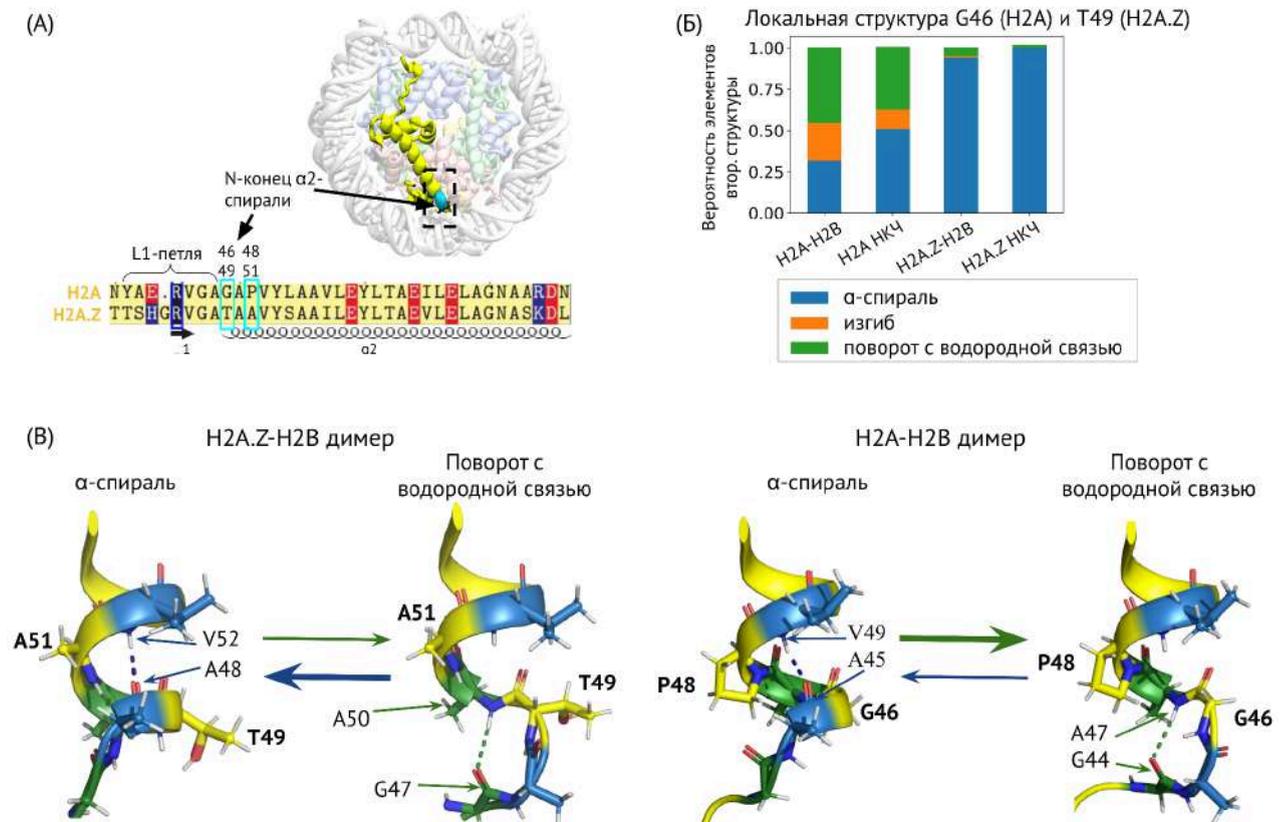


Рисунок 28. Динамические переходы N-конца $\alpha 2$ -спирали в гистонах H2A и H2A.Z. (A) Расположение структурных элементов гистона H2A.Z в контексте нуклеосом; выделен N-конец $\alpha 2$ -спирали. Фрагмент выравнивания последовательностей гистонов H2A и H2A.Z показан ниже; ключевые для узнавания ремоделером SWR1 замены выделены циановым (G46 и P48 в H2A на T49 и A51 в H2A.Z, последовательности указаны для *H. sapiens*). (B) Вероятность участия N-конца $\alpha 2$ -спирали H2A/H2A.Z в различных элементах вторичной структуры в траекториях МД димеров и НКЧ. Анализ вторичной структуры был получен с помощью DSSP для остатков G46 или T49 для H2A или H2A.Z, соответственно. (B) Иллюстрация структурного перехода между α -спиралью и поворотом с водородной связью на N-конце $\alpha 2$ -спирали H2A/H2A.Z. Толщина стрелок отражает преобладание одного из двух состояний.

5.1.2. L1-L1 взаимодействие в динамике нуклеосом, содержащих вариантный гистон H2A.J

Далее проводилось исследование роли динамики L1-петли гистона H2A и его вариантной формы H2A.J в стабильности нуклеосом. Известно, что нуклеосомы с вариантной формой H2A.J более термостабильны, чем нуклеосомы с каноническими гистонами. При детальном анализе научной группой Н. Kurumizaka было выяснено, что основной вклад в повышении термостабильности вариантной нуклеосомы вносит одна замена – S40A. Она находится в L1-петле гистона, при этом в криоЭМ структуре вариантной нуклеосомы не было обнаружено отличий конформации L1-петли H2A.J от H2A [84]. Гистон несет в 40 позиции аланин, в то время как канонические гистоны H2A в зависимости от изоформы могут нести как аланин, так и серин (согласно протеомному анализу, серин несут 20% молекул канонического гистона) [83]. Замена S40A расположена вблизи «якорного» аргинина R42, который образует стабильные контакты с малой бороздкой ДНК в положении ± 4 суперспирали (четыре витка ДНК от центра нуклеосомы) [43]. Известно, что L1-петли двух копий гистона H2A внутри нуклеосомы взаимодействуют между собой, стабилизируя общую структуру нуклеосомы [6].

Анализ водородных связей в ходе сравнительного моделирования МД нуклеосом с гистонами H2A и H2A.J показал, что гидроксильная группа боковой цепи S40 в H2A образует водородные связи с кислородом карбонильной группы R42, а иногда и с кислородом карбонильной группы S84 в H2B (Рисунок 29 А). Такие контакты наблюдались в 76% и 29% кадров траектории МД H2A-содержащей нуклеосомы, соответственно. Наличие водородной связи S40-R42 поддерживает изогнутую конформацию L1-петли, что соответствует данным рентгеноструктурного анализа НКЧ.

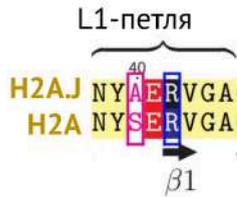
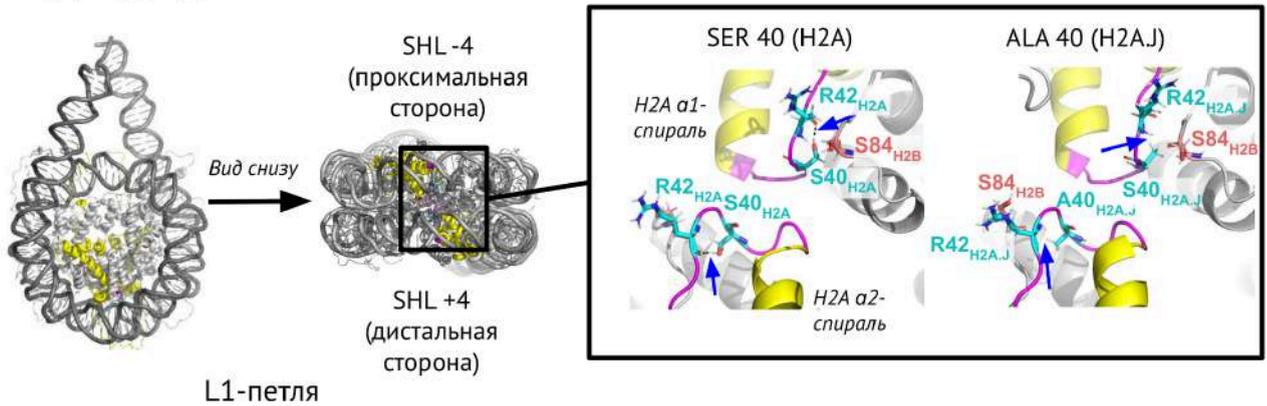
В гистоне H2A.J присутствует замена S40A, которая приводит к полному исчезновению упомянутых водородных связей как с R42 в H2A.J, так и с S84 в H2B из-за отсутствия гидроксильной группы у аланина (Рисунок 29 А). Несмотря на потерю водородной связи при замене S40A, общая структура L1-петель в

большинстве траекторий МД Н2А.Ј-содержащих нуклеосом оставалась схожей (Рисунок 29 Б). Однако в одном из моделирований нуклеосомы, содержащей гистон Н2А.Ј, два торсионных угла пептидного остова вблизи замены S40A спонтанно изменились (Рисунок 30 А). Это сопровождалось увеличением расстояния между А40 и остовом R42, так что в случае обратной замены А40S в этой конформации образование водородной связи с R42 стало бы невозможным. Так как это событие, вероятно, достаточно редкое, и нам удалось наблюдать его в одной из шести траекторий, то было проведено дополнительное моделирование МД димеров Н2А-Н2В и Н2А.Ј-Н2В, которое показало подобную реорганизацию L1-петли в Н2А.Ј (Рисунок 30 Б).

Альтернативная конформация L1-петли Н2А.Ј гистона коррелировала с изменением вероятности контактов между двумя димерами Н2А-Н2В в нуклеосоме, в частности с вероятностью образования водородной связи между E41 в Н2А/Н2А.Ј на одной половине нуклеосомы и N38 в Н2А/Н2А.Ј на противоположной стороне (Рисунок 30 А). Т.е., альтернативная конформация является более эффективной с точки зрения геометрии контактов между димерами Н2А.Ј-Н2В внутри нуклеосомы.

Таким образом, замена S40A в гистонах Н2А может приводить к изменению конформации L1-петель вследствие потери водородной связи между S40 и R42, что, в свою очередь, изменяет характер взаимодействий между двумя димерами Н2А/Н2А.Ј-Н2В в нуклеосоме.

(A) Структура L1-петли и замена S40A



(Б) Структура L1-L1 интерфейса в МД траекториях

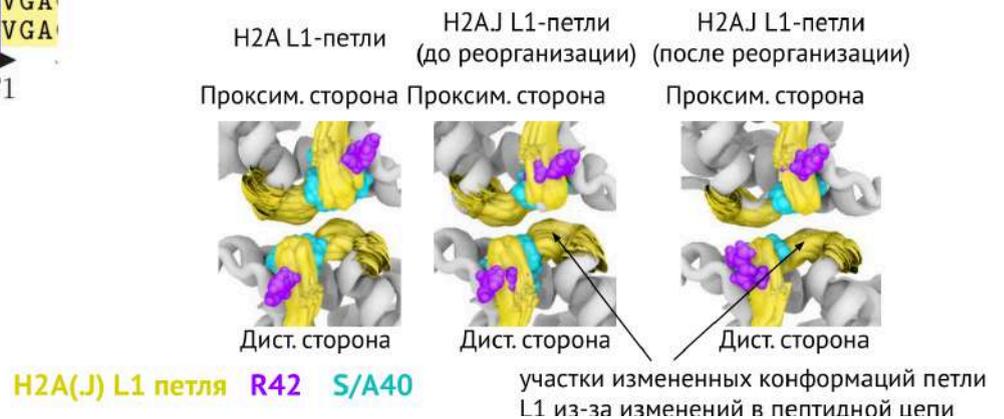
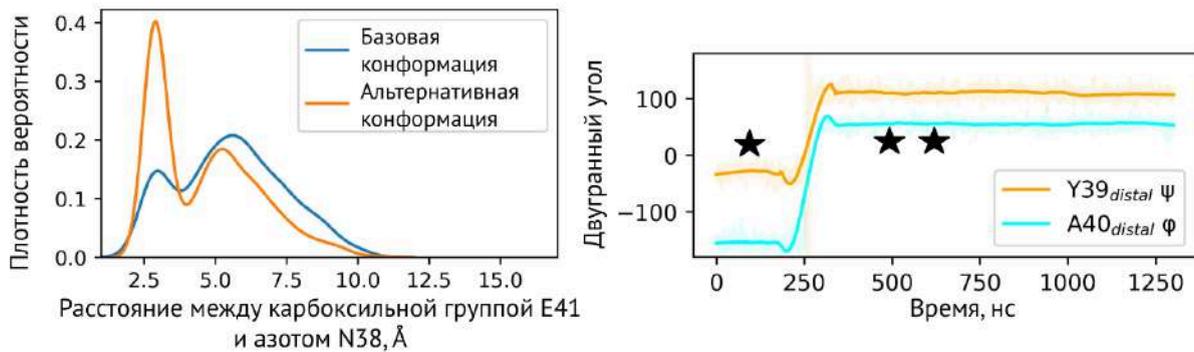
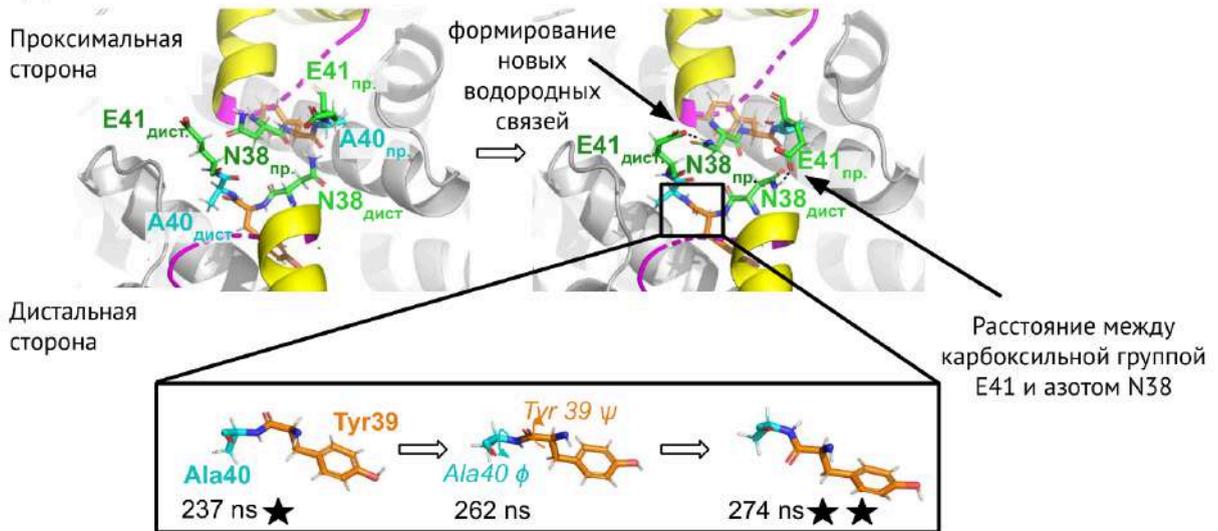


Рисунок 29. Молекулярные детали влияния замены S40A в H2A/H2A.J на конформацию и динамику L1-петли. (А) Взаимодействия между H2A-H2B-димерами (L1-L1 интерфейс), которые изменяются в результате замены S40A. Гистоны H2A/H2A.J окрашены в желтый цвет, L1-петля H2A/H2A.J показана пурпурным цветом. Синими стрелками отмечено наличие водородной связи между S40 и R42 у H2A и отсутствие такой связи между A40 и R42 у H2A.J. (Б) Обзор конформаций L1-петель гистонов H2A и H2A.J в траектории МД в виде наложения кадров. Цветом выделены замена S40A и якорный R42.

(а) L1-петли и их роль во взаимодействии между димерами H2A/H2A.J-H2B

★ Базовая конформация L1-L1 интерфейса ★★ Альтернативная конформация L1-L1 интерфейса



(Б) Двугранные углы Рамачандрана при моделировании свободных димеров

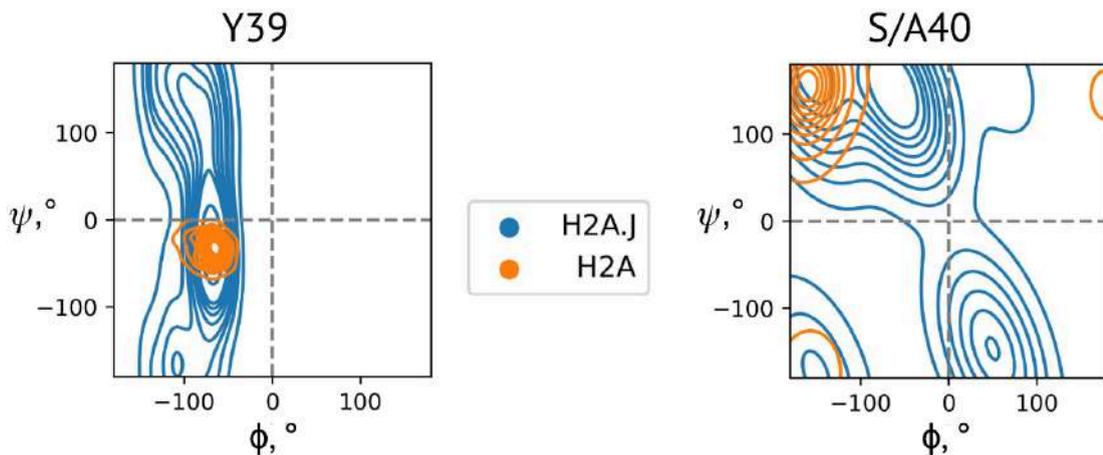


Рисунок 30. Реорганизация контактов между димерами H2A/H2A.J-H2B при изменении конформации полипептидной цепи. (А) Слева: наблюдаемая реорганизация H2A.J L1-петли, сопровождающаяся изменением торсионных углов полипептидной цепи между остатками Y39 и A40 (см. вставку в черной рамке) и

образованием меж-N2A.J-N2B-димерной водородной связи между E41 и N38. Справа: изменения вероятности распределения расстояния между донорными и акцепторными атомами остатков E41 и N38 (вверху) и изменения двугранных углов пептидной основы (внизу) при реорганизации L1-петли. Одна и две звездочки обозначают базовую и альтернативную конформации L1-петли, соответственно. (Б) Распределение углов Рамачандрана для остатков Y39 и S/A40 в МД траектории свободных димеров N2A-N2B и N2A.J-N2B.

5.2. Обсуждение

В контексте нуклеосомы, N2A-N2B димеры формируют контакты не только с тетрамером (H3-H4)₂ и ДНК, но и друг с другом через взаимодействие L1-петель копий N2A гистона. Известно, что один из димеров может спонтанно выходить из состава нуклеосомы, чему способствует откручивание внешнего полувитка суперспирали ДНК [31]. В экспериментах по измерению термостабильности нуклеосом регистрируются температуры выхода двух N2A-N2B димеров. Поскольку выход димеров связан с интенсивностью откручивания ДНК [163], на скорость выхода может влиять повышение ионной силы раствора, усиливающее откручивание [54,217]. Например, N2A.Z-содержащие нуклеосомы показали и меньшую термостабильность, и более низкую устойчивость к высокой ионной силе [50]. С точки зрения структуры, стабильность нуклеосом зависит от стабильности ДНК-гистоновых контактов и силы барьера откручивания. К примеру, повышенную стабильность нуклеосом с вариантом макроN2A связывают с наличием макродомена, ограничивающего динамику нуклеосомной ДНК [218]. Но также для макроN2A показана важная роль L1-петли в обеспечении более высокой стабильности нуклеосом в растворе с высокой ионной силой [219], структура которой отличается от L1-петли канонического гистона (показано в криоЭМ [78] и МД [220]). Большое значение L1-петли в определении стабильности нуклеосом демонстрирует также пример одиночной замены M51L гистона N2A (встречается у некоторых изоформ гистона), снижающей температуру плавления нуклеосом на 3 °С. Повышенная экспрессия изоформ с

такой заменой ускоряет пролиферацию клеток [16,221]. Другой пример – *in vitro* исследование, в котором проводилось внесение замены N38С Н2А (область L1 петли). Образование дисульфидной связи между пространственно сближенными введенными цистеинами в L1 петле обеспечивало усиление стабильности [222].

Моделирование МД нуклеосом, содержащих варианты гистоны Н2А.Z и Н2А.J, показало, что не столько статическая конформация, сколько существование альтернативных конформаций и динамических переходов между ними характерно для L1-петель вариантов гистона Н2А. Для гистона Н2А.J было показано, что при потере водородной связи внутри гистона Н2А.J при замене S10A снижается жесткость L1-петли и возможны перестройки полипептидной цепи (углы Рамачандрана исследуют более широкий диапазон значений для остатков Y39 и A40), что было показано в МД свободных димеров Н2А.J-Н2В. Такие перестройки ограничены для жесткой петли Н2А из-за водородной связи S40 с якорным R42. В нуклеосоме такая перестройка затруднена из-за ограничения подвижности соседних остатков (тот же R42, встроенный в малую бороздку ДНК в контексте нуклеосомы), однако, нам удалось наблюдать такую перестройку в одной из траекторий МД Н2А.J-содержащих НКЧ. Эта перестройка привела к созданию более эффективной ориентации петель L1 двух копий гистонов Н2А.J и повышению вероятности контактов между копиями гистона (между остатками E41 и N38). Мы предполагаем, что существование такой альтернативной конформации может быть механизмом повышения термостабильности Н2А.J нуклеосом, так как повышает число меж-димерных водородных связей [83].

Для гистона Н2А.Z было показано, что, как и для канонического гистона Н2А, характерны динамические переходы области конца L1-петли и начала α 2-спирали (а.о. 44-49 в Н2А и 47-52 в Н2А.Z) между α -спиральным витком и поворотом с водородной связью. Отличием вариантов и канонического гистона является смещение динамического равновесия в сторону одной из конформаций: у вариантного гистона преобладает удлинение α 2-спирали, у канонического – формирование поворота. Преобладание той или иной конформации в

каноническом или вариантном гистонах согласуется с отличием конформаций L1-петель в статических экспериментальных структурах [214].

Для нуклеосом с гистоном H2A.Z показана более низкая термостабильность и устойчивость к соли по сравнению с канонической нуклеосомой [50]. При этом также известно, что H2A.Z-нуклеосомы демонстрируют более интенсивное откручивание ДНК (в криоЭМ структуре разрешено 136 п.н. ДНК [223], интенсивное откручивание показано в МД исследовании [210]) и высокую доступность ДНК к расщеплению нуклеазами [223]. МД расчеты описывают ключевое значение С-хвоста H2A.Z в формировании более подвижных концов ДНК. Интересно, что в работе Lewis et al. [223] пересадка L1-петли H2A в гистон H2A.Z не повысила стабильность нуклеосомной ДНК, а пересадка С-хвоста и α С-спирали канонического гистона повысили стабильность нуклеосомной ДНК, но только в половину относительно нуклеосом с полным каноническим гистоном. Из чего можно предположить существование еще одного механизма наряду с особенным С-хвостом, влияющего на интенсивность откручивания нуклеосомной ДНК в H2A.Z-нуклеосомах.

В моделировании МД димеров H2A.Z-H2B и H2A.Z-содержащих нуклеосом было показано отличие пластичности α 2-спирали вариантного гистона. Было показано, что свободные димеры H2A.Z-H2B обладают повышенной гибкостью. В случае нуклеосом-встроенной формы мы наблюдаем значительно более выраженный изгиб в направлении ДНК. Отметим, что динамика изгиба димера гистонов H2A.J-H2B идентична каноническому димеру, что, вероятно, связано с идентичной аминокислотной последовательностью вариантного H2A.J и канонического H2A гистонов в области α 2-спирали. Эти наблюдения свидетельствуют о возможности влияния аминокислотной последовательности гистона на средний изгиб и гибкость димеров H2A-H2B и согласуются с недавними структурными исследованиями других гистоновых вариантов.

В частности, Сато и др. [224] продемонстрировали, что в нуклеосомах на основе гистонов *G. lamblia* наблюдается выгибание α 2-спирали H2A наружу. Одновременно Чжоу и др. [73] обнаружили, что нуклеосомы, содержащие H2A.B,

имеют излом под углом 15° в С-концевой области $\alpha 2$ -спирали H2A.B, хотя этот излом был более выражен вдоль оси суперспирали нуклеосомы. Такое движение соответствует второму собственному вектору, выявленному в нашем анализе методом главных компонент динамики $\alpha 2$ -спиралей (раздел 4.1.2, Рисунок 22 В).

Глава 6. Исследование динамики тетрамера гистонов (H3-H4)₂ и тетрасом

В Главе 6 будут представлены результаты по части МД моделирования тетрасом, проводимого в рамках совместного исследования [225] трех научных групп: группа интегративной биологии под рук. А.К. Шайтана, группа регуляции транскрипции и репликации под рук. В.М. Студитского и группа ЯМР-исследований МГУ-ППИ под рук. Shi Xiangyan. В работе использовалась комбинация биохимических, структурных, спектроскопических и МД-подходов.

6.1. Результаты

6.1.1. Структура и динамика ДНК в тетрасоме

Тетрамер (H3-H4)₂ организует центральные ~60 п.н. нуклеосомной ДНК. Фланкирующие центральный участок фрагменты ДНК принимают спиральную структуру благодаря контактам с димерами H2A-H2B и дополнительным контактам концов нуклеосомной ДНК с αN-спиралью гистона H3. Мы провели расчеты моделирования откручивания нуклеосомной ДНК при «вырезании» димеров H2A-H2B из кристаллической структуры НКЧ. Это привело к быстрому (в течение десятков наносекунд) раскручиванию изогнутых фрагментов нуклеосомной ДНК, фланкирующих тетрамер H3-H4, что привело к образованию структуры тетрасомы (Рисунок 31 А). В ходе моделирования МД тетрасомы (в виде коротких запусков 170-240 нс каждый; в сумме 2,5 мкс) фланкирующие сегменты тетрасомной ДНК претерпели широкий спектр конформационных флуктуаций (Рисунок 31 Б). Эти флуктуации наблюдались как в плоскости нуклеосомного диска, так и вдоль оси суперспирали нуклеосомы. Такой широкий диапазон конформационной гибкости позволяет предположить, что тетрасомы могут выполнять функцию шарниров в структуре нуклеосомных фибрилл более высокого порядка.

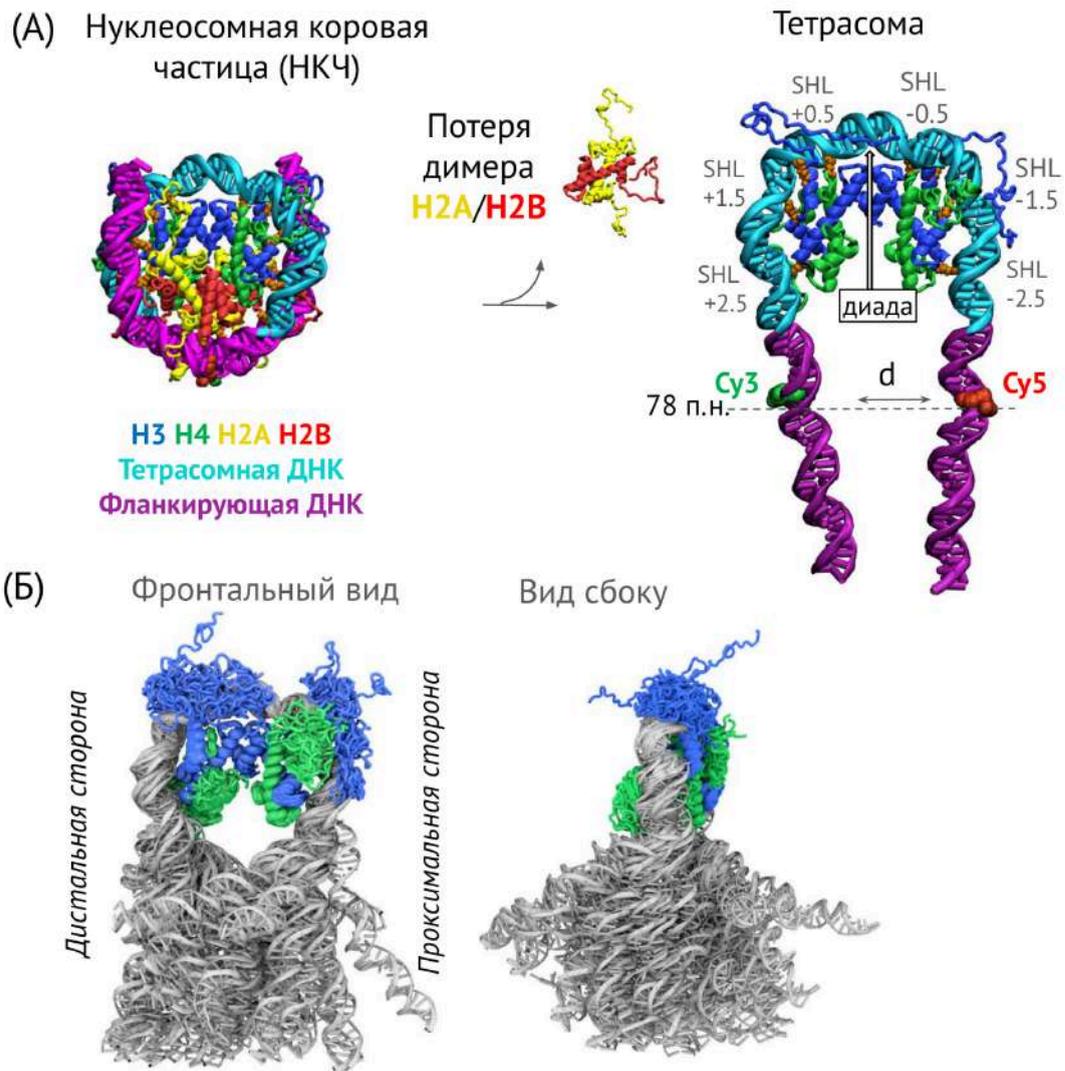


Рисунок 31. Структура и динамика тетрасомной ДНК в субмикросекундном моделировании (Тетр.₁). (А) Структуры НКЧ и тетрасомы. Структура тетрасомы была получена методом МД путем удаления димеров H2A/H2B из структуры НКЧ. На нуклеосомной ДНК выделен цветом тетрасомный сегмент ДНК (центральные 57 п.н., обозначен голубым цветом) и два фланкирующих тетрасому сегмента ДНК (обозначены пурпурным цветом). Также изображены нуклеотиды в позициях +38 и -39 от диады, которые несли присоединённые флуоресцентные метки Cy3 и Cy5 соответственно при проведении экспериментов FRET. (Б) Репрезентативные конформации тетрасомы, полученные в результате моделирования МД в двух ракурсах. Показано в виде наложения выровненных кадров траектории МД. (В-Д) Динамика контактов ДНК и гистонов в тетрасоме в траектории МД.

Рисунок 32. Анализ ДНК-гистоновых контактов в МД моделировании тетрасомы. (А) Стабильные контакты между ДНК и тетрамером гистонов (Н3-Н4)₂ в тетрасоме и нуклеосоме. Стабильные контакты, сохраненные в тетрасоме, обозначены черными рамками. Стабильные контакты, утерянные в МД тетрасомы, но присутствующие в МД нуклеосом обозначены серыми рамками. Выделены кластеры контактов в соответствии с позицией на супервитке ДНК. Фрагмент последовательности гистона Н4 показан ниже. (Б) Разворачивание и обратное присоединение ДНК, наблюдаемые при субмикросекундном моделировании МД тетрасомы. (В) Динамика количества связанных гистонами п.н. ДНК в траектории МД. Тонкие полупрозрачные линии обозначают мгновенные значения; толстые линии показывают сигнал, сглаженный фильтром Савицкого-Голея с использованием окна 100 нс и полинома первой степени. График составлен из нескольких параллельных симуляций, соединенных последовательно. Указано число пар относительно диады для проксимального и дистального фрагментов тетрасомной ДНК.

Тетрамер Н3-Н4 взаимодействует с ДНК посредством трёх симметрично расположенных пар участков связывания ДНК в тетрасоме. Эти участки расположены на расстоянии 0,5, 1,5 и 2,5 витка спирали ДНК от диады (Рисунок 31 А). Были проанализированы стабильные контакты (>90% кадров траектории) между гистонами Н3-Н4 и ДНК в нуклеосомах и тетрасоме. Тетрасомы содержали меньшее количество стабильных контактов при SHL $\pm 0,5$ и $\pm 1,5$, а стабильные взаимодействия при SHL $\pm 2,5$ были утрачены (Рисунок 32 А). В сайте SHL $\pm 2,5$ в нуклеосоме несколько остатков L2-петли Н4 (Н4R78, Н4K79 и Н4T80) и якорный аргинин Н3R83 взаимодействуют с малой бороздкой и образуют стабильные контакты с ДНК [107]. Однако в тетрасоме контакты этих участков связывания периодически нарушались из-за событий динамического разворачивания ДНК, происходящего в течение 10–100 нс (Рисунок 32 Б,В). Во время этих событий ДНК оставалась связанной с тетрамером при SHL $\pm 1,5$, взаимодействуя с Н3R64, Н3K65 и Н3L66.

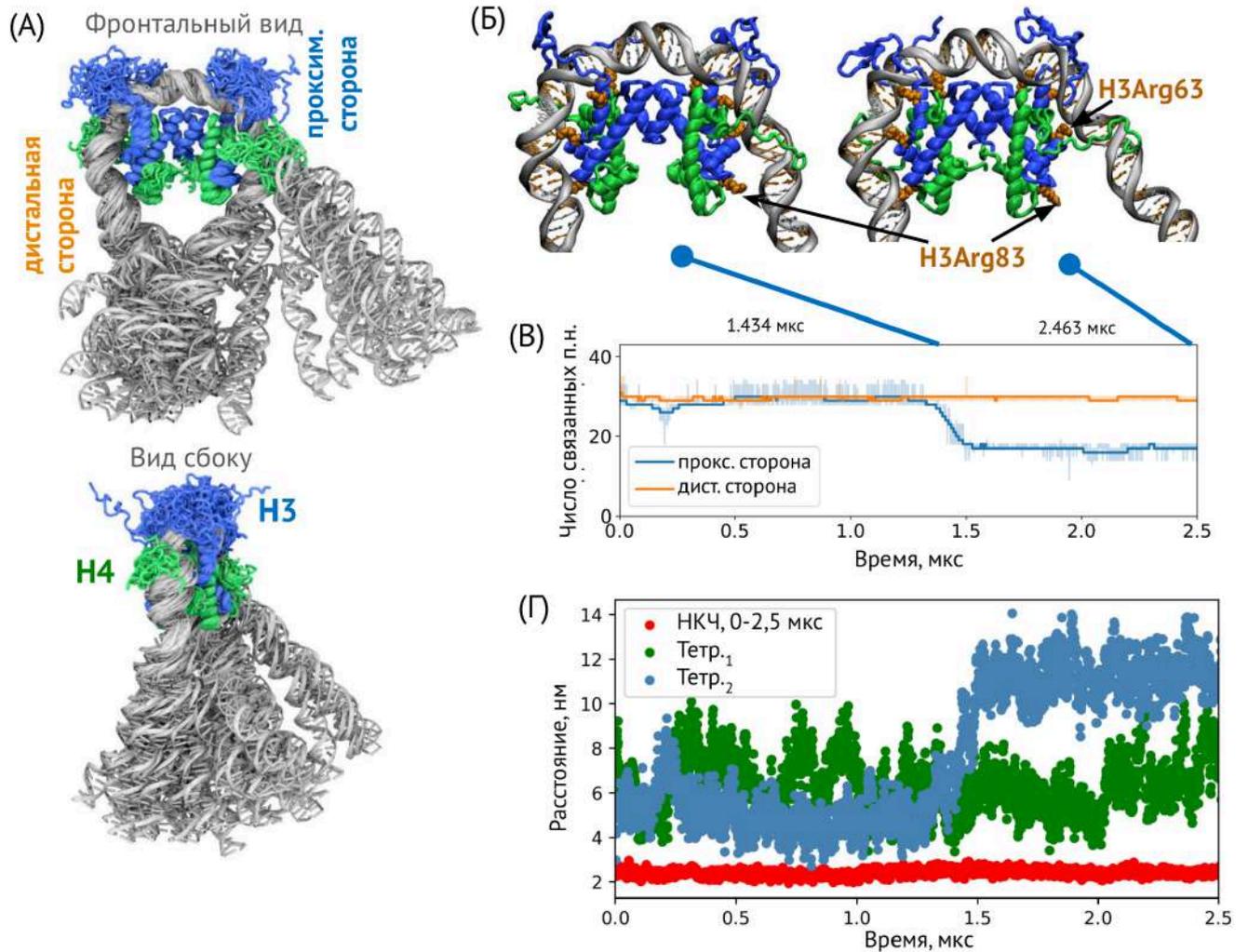


Рисунок 33. Динамика разворачивания тетрасомной ДНК в мульти-микросекундном моделировании тетрасом (Тетр.₂). (А) Конформации тетрасомы, полученные в результате моделирования МД, выровненные и наложенные друг на друга (вид спереди и сбоку). (Б) Репрезентативные кадры (1,434 и 2,463 мкс) динамики тетрасомы во время разворачивания ДНК. (В) Динамика длины ДНК, оставшейся связанной с глобулярной частью тетрамера (Н3-Н4)₂, в ходе моделирования. (Г) Изменение расстояния (d) между центрами масс пар оснований ДНК по данным МД моделирования НКЧ и тетрасом, к которым были присоединены флуорофоры Су5 и Су3 в экспериментах FRET.

В независимом запуске моделирования МД длиной 2,5 мкс (единый долгий расчет) мы наблюдали, что разворачивание ДНК может продолжаться дальше, сопровождаясь потерей контактов в сайте SHL $\pm 1,5$ (Рисунок 33 А,Б,В). Кинетика

процесса разворачивания/обратного закручивания ДНК была аналогична процессу откручивания ДНК, которое наблюдалось для концов нуклеосомной ДНК в моделировании НКЧ (31). Интересно, что несмотря на отсутствие контактов между высокодинамичной фланкирующей тетраасому ДНК, взаимодействующей в нуклеосоме с НЗ-застежкой, и гистонами, контакты α N-спирали НЗ и С-концевых остатков N-хвоста НЗ с ДНК частично сохранились (НЗ R40, Y41, G44). Можно предположить, что НЗ-застежка может также способствовать стабилизации тетраасомы.

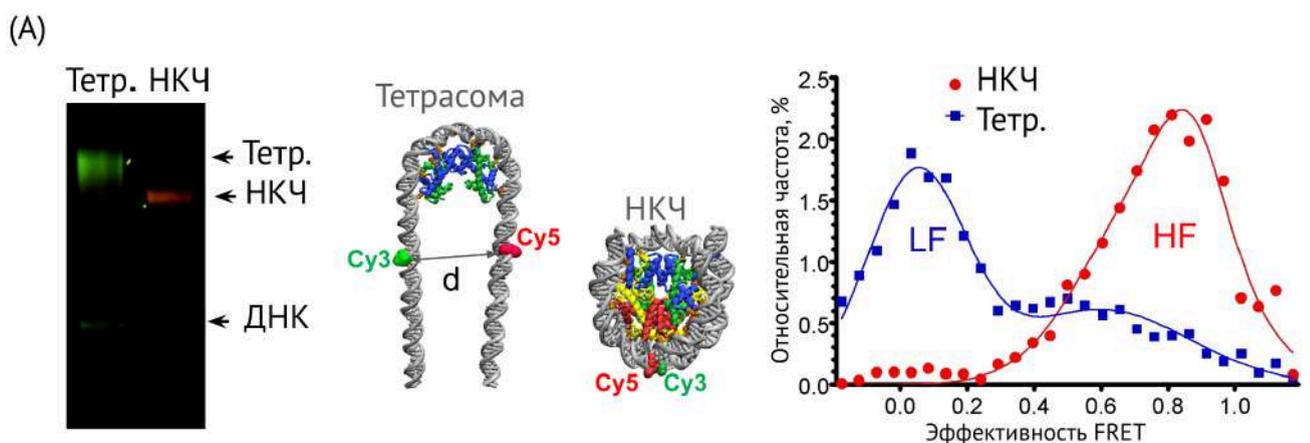


Рисунок 34. Эксперименты по измерению эффективности FRET нуклеосом и тетраасом, данные предоставлены сотрудниками группы проф. В.М. Студитского. (А) Анализ FRET-в-геле нуклеосом и тетраасом. Сигналы флуоресценции Cy3 (зелёный цвет) и Cy5 (красный цвет) были измерены на длине волны возбуждения Cy3 и объединены. Снижение эффективности FRET между Cy3 и Cy5 обуславливает изменение цвета полосы с красного на зелёный. (Б) Распределение эффективности FRET для нуклеосом и тетраасом в растворе, измеренное с помощью микроскопии spFRET. Показаны типичные профили ЭПР (аппроксимированные гауссовыми функциями); обозначены области профилей с высоким FRET (HF) и низким FRET (LF).

Результаты по моделированию динамики тетраасомной ДНК сравнивались с экспериментальными данными, полученными методом микроскопии FRET. Для этого нуклеосомы и тетраасомы были собраны на 147-п.н. фрагменте ДНК,

содержащем флуоресцентные метки Cy5 и Cy3. Положения флуоресцентных меток показаны на Рисунке 31 А. Нуклеосомы продемонстрировали высокую эффективность FRET между Cy3 и Cy5, которая значительно снижается при нарушении структуры ДНК (например, в результате раскручивания ДНК): этот эффект можно обнаружить как в геле, так и в растворе [28]. При измерении FRET в геле, нуклеосомы и тетрасомы образовывали отдельные полосы с несколько различной подвижностью (Рисунок 34 А). Анализ FRET в геле выявил значительное снижение эффективности FRET между Cy3 и Cy5 в тетрасомах по сравнению с нуклеосомами. Также проводился анализ FRET одиночных частиц в растворе, который подтвердил, что эффективность FRET снижена в тетрасомах по сравнению с нуклеосомами (Рисунок 34 Б). Данные, полученные обоими экспериментальными методами, показывают, что ДНК в тетрасоме значительно раскручена по сравнению с ДНК в нуклеосоме. Согласно данным FRET одиночных частиц, тетрасомы неоднородны по динамическому состоянию ДНК, и минимальное среднее расчетное увеличение расстояния между флуоресцентными метками в основной субпопуляции тетрасом по сравнению с нуклеосомами составляет 5 нм. Наши моделирования МД показывают, что среднее расстояние между нуклеотидами, используемыми для прикрепления флуоресцентных меток, составляло 2,5 нм в нуклеосомах, 5,9 нм в тетрасомах до раскручивания ДНК и увеличивалось до 11,3 нм после того, как одна из ДНК теряла контакты с одним из внешних участков связывания ДНК (Рисунок 33 Г). В целом, данные, полученные с помощью FRET, согласуются с данными моделирования МД и указывают на то, что ДНК, связанная с тетрамером (H3-H4)₂, значительно раскручена.

Подводя итог, наши данные моделирования FRET и МД показывают, что потеря димеров H2A-H2B нуклеосомами приводит к высвобождению сегментов ДНК, фланкирующих центральный участок ДНК длиной 60 п.н., который остается связанным с тетрамером. Фланкирующие сегменты ДНК обладают высокой динамичностью и могут придавать необычную геометрию общему пути ДНК в хроматиновой нити, повышая ее гибкость, что, в свою очередь, может

способствовать взаимодействию между различными регуляторными элементами в хроматине [226].

Динамика гистонов в тетрасоме

Далее мы исследовали динамику тетрамера гистонов (H3-H4)₂ в составе тетрасом. Для этой задачи результаты МД моделирования сравнивались с результатами твердотельной ЯМР-спектроскопии, используемой для исследований глобулярного домена гистонов в составе нуклеосомы [227]. В эксперименте сравнивались спектры для нуклеосом и тетрасом и использовали ¹³C и ¹⁵N меченые гистоны H4, для которых были получены спектры 2D NCA/NCО и проанализированы профили интенсивности пиков (Рисунок 35) (другие эксперименты по ЯМР спектроскопии подробно описаны в статье [225]). Эти спектры предоставляют информацию о структуре и динамике белка в миллисекундном-микросекундном (мс-мкс) диапазоне для каждой аминокислоты. Уменьшение интенсивности пиков или их исчезновение является результатом возросшей подвижности и динамики соответствующих областей белка. Данные ЯМР сравнивались с профилями RMSF из МД траекторий (Рисунок 36).

Значительно усиленная динамика и в моделировании МД, и в ЯМР-эксперименте наблюдалась для С-конца гистона H4 (область H4 Q93-G101) в тетрасоме по сравнению с нуклеосомой (Рисунок 35). Этот участок образует короткий β -лист (β 3), взаимодействующий с гистоном H2A (докинг доменом) в контексте нуклеосомы, и теряет связывающего партнера в тетрасоме, что объясняет наблюдаемое увеличение динамики. В моделировании, кроме общего повышения динамики, было также показано разупорядочивание этого фрагмента (см. карты Рамачандрана для остатков 97, 98 и 99 на Рисунке 37 А). Аналогичное разупорядочивание β 3-листа H4 в составе свободного димера H3-H4 было показано в разделе 4.1.1. Наблюдаемое в ЯМР эксперименте снижение интенсивности пика NCA для H4A89, вероятно, также объясняется потерей связывающего партнера в тетрасоме, поскольку H4A89 взаимодействует с H4R92 и H4Q93 в нуклеосоме.

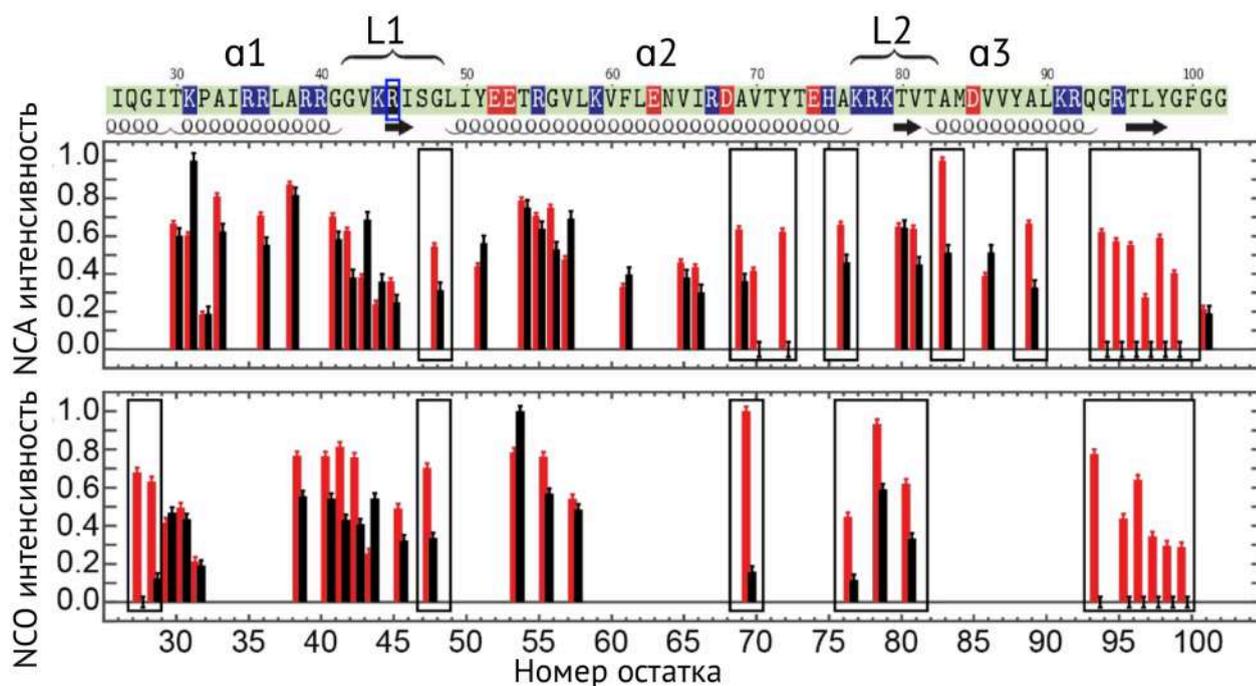


Рисунок 35. Сравнение динамики глобулярного домена Н4 в составе НКЧ и тетрасом методом твердотельной ЯМР-спектроскопии (данные представлены профессором Xiangyan Shi). Нормализованные интенсивности пиков NCA (сверху) и NCO (снизу) глобулярного домена гистона Н4 в тетрасоме длиной (черный) и нуклеосоме (красный). Пики, отсутствующие в спектрах тетрасомы, показаны нулевыми интенсивностями с планками погрешностей. Все пиковые интенсивности нормализованы по максимальной пиковой интенсивности соответствующего спектра. Погрешности вычислены на основе значений среднеквадратичного отклонения шумов в спектрах. Прямоугольные рамки выделяют остатки, различающиеся пиковыми интенсивностями и/или химическими сдвигами между тетрасомой и нуклеосомой.

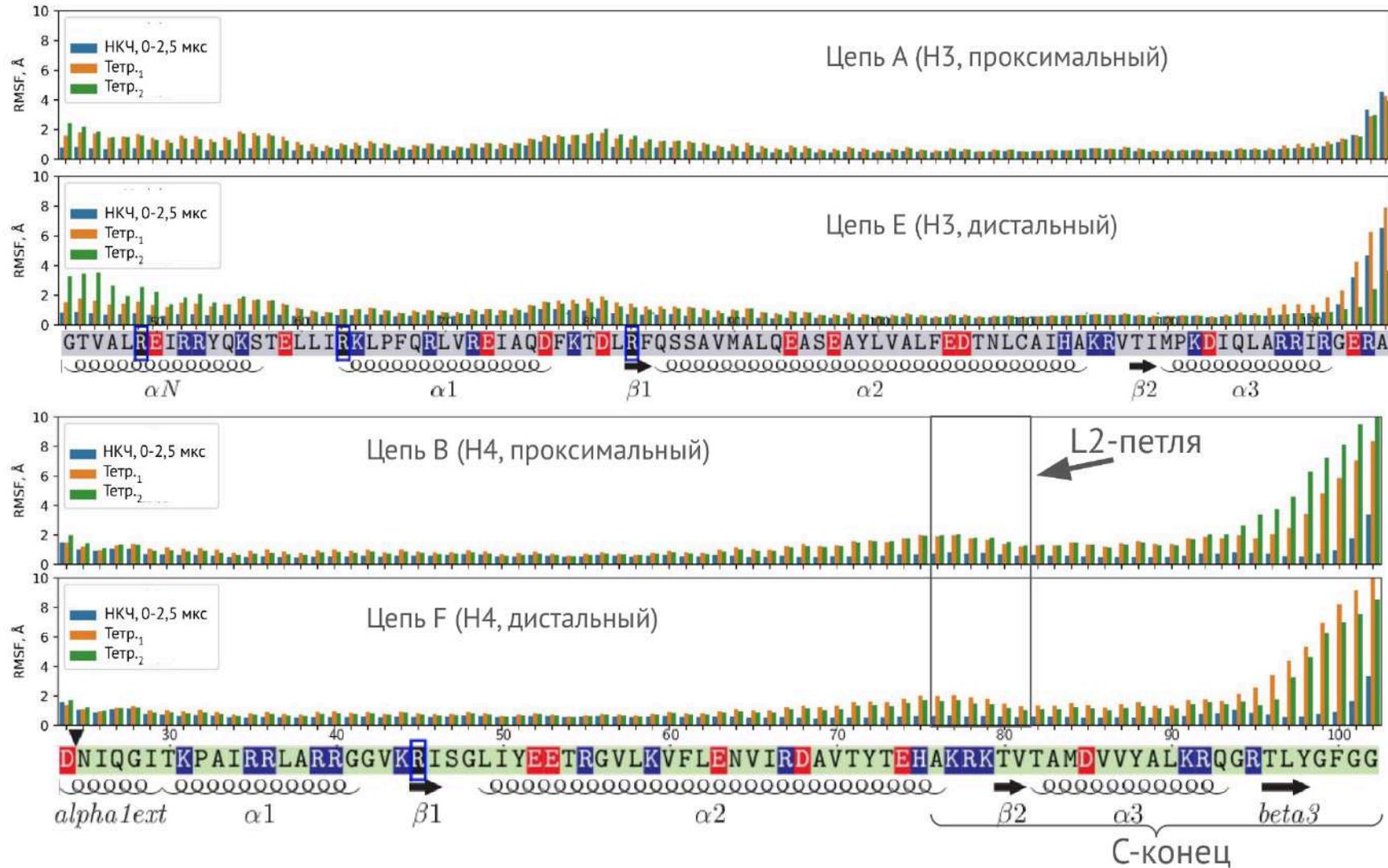


Рисунок 36. Среднеквадратичные отклонения положений Ca-атомов гистонов N3 и N4 в траекториях МД тетрасом и НКЧ.

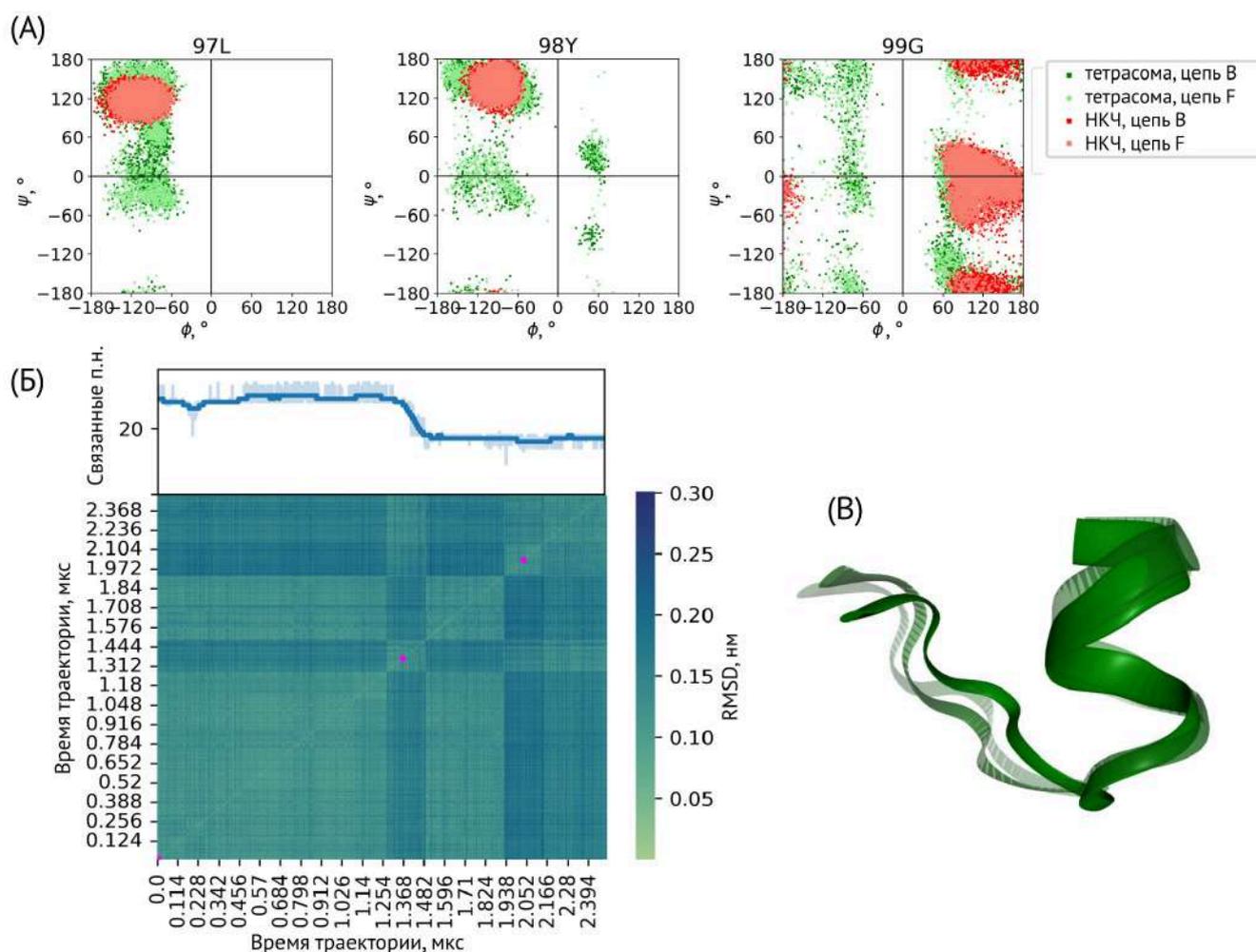


Рисунок 37. Изменение динамики отдельных участков гистона Н4 в тетрасоме по сравнению с НКЧ по данным МД моделирования. (А) Углы Рамачандрана (ϕ/ψ) белкового остова для остатков 97, 98 и 99 гистона Н4 при моделировании тетрасомы (зелёный) и нуклеосомы (красный). Точки представляют собой индивидуальные значения, рассчитанные для отдельных кадров МД с интервалом в 1 нс. (Б) Пластичность петли L2 Н4 в траектории МД Тетр.₂ (мульти-микросекундная динамика). В рассмотрении взят гистон с проксимальной стороны тетрасомы, для которой было показано прохождение разворачивания ДНК. Значения среднеквадратичных смещений (RMSD) положений Са-атомов остатков 70–82 гистона Н4, рассчитанные между различными кадрами траектории. На правой панели показаны три репрезентативные конформации (0, 1,365 и 2,036 мкс) с различной прозрачностью

(1, 0,6 и 0,2 соответственно); соответствующие позиции на матрице обозначены пурпурными точками.

В ЯМР эксперименте было показано значительное усиление динамики L1-петли гистона, однако это не было подтверждено результатами МД моделирования. Для области L1, формирующей сайт связывания ДНК вблизи диады и несущей якорный R45, показано расщепление пиков и химические сдвиги в спектрах, полученных от тетрасом (расщепление пиков NCA для H4K44 и H4G48, возмущения химических сдвигов NCA и NCO для H4V43-H4R45). Из этих данных следует, что L1-петля в тетрасоме более подвижна, чем в нуклеосоме, но также имеет альтернативные состояния с достаточно долгими временами переходов между ними. Мы не обнаружили таких альтернативных состояний в МД, вероятно, в силу короткой длины моделирования. Могут быть выдвинуты предположения о возможном разворачивании тетрасомной ДНК вплоть до диадной области и о влиянии возможных дефектов кручения в сайтах SHL ± 2 . Также была выявлена гораздо более высокая гибкость остатков Q27-I29 ($\alpha 1$ -ext спираль), что, вероятно, отражает повышенную подвижность N-концевых участков H4 в тетрасомах; это явление также не было описано исходя из данных моделирования и требует дальнейшего исследования.

Интересным оказалось значительно более низкая интенсивность пиков областей V70-Y72 и A76-T82 белка H4 в тетрасоме (Рисунок 35), что указывает на усиление динамики C-концевого конца $\alpha 2$ -спирали H4 и прилегающей L2-петли H4 в тетрасоме. Эти результаты согласуются с повышенными флуктуациями L2-петли H4 и C-концевых областей, наблюдаемыми в наших расчетах МД (Рисунок 36). Область L2-петли H4 образует сайт связывания ДНК в SHL $\pm 2,5$, и динамическое разворачивание/обратное закручивание ДНК (продемонстрированное в прошлом разделе) в этом сайте влияет на конформационную динамику петли и аминокислотных остатков внутри нее. Действительно, анализ конформаций L2-петли в мульти-микросекундной траектории МД (в которой наблюдалось откручивание, Рисунок 33 Б) методом

построения RMSD матриц для этого участка показал, что при возникновении откручивания L2 петля приобретает возможность исследовать несколько альтернативных конформаций со среднеквадратичными смещениями атомов до 3 Å (Рисунок 37 Б,В).

6.1.2. Внутренняя пластичность гистонов Н3 и Н4 и ее функциональная роль в динамике тетрасом

В соответствии с предыдущими результатами по моделированию тетрасом [106], отсутствие димеров Н2А-Н2В в тетрасоме предсказуемо приводило к разрыхлению общей структуры тетрамера Н3-Н4 в тетрасомах по сравнению с нуклеосомами. В нашем моделировании наблюдалось значительное увеличение гибкости С-концевых концов длинных $\alpha 2$ -спиралей и L2-петель гистонов Н4 и αN -спиралей гистонов Н3 (Рисунок 38 А). Аналогично исследованию внутренней динамики димера Н3-Н4, был проведен анализ главных компонент матриц ковариаций атомов в траектории, который выявил две основных коллективных моды конформационной динамики тетрамеров (Н3-Н4)₂ (Рисунок 38 Б). В совокупности эти две моды объясняют 54% динамической дисперсии в тетрасомах (Рисунок 38 В). Первая мода представляла собой раскрытие/закрытие тетрамера по принципу «пакмана», вторая – «скручивание» тетрамера, что позволяло ему «сплющиваться» вдоль суперспиральной оси ДНК (Рисунок 38 Б). Описанные моды динамики были выделены независимо из траекторий тетрасом с полноразмерными хвостами и с удаленными хвостами (данные не приведены).

Для количественной оценки раскрытия/закрытия тетрамера и изменений скручивания тетрамера были проанализированы два геометрических параметра: (1) расстояние между концами $\alpha 2$ -спиралей Н4 и (2) торсионный угол ДНК, определяемый четырьмя участками ДНК на SHL -2,5, -0,7, 0,7 и 2,5 (Рисунок 39 А). Распределение этих параметров в тетрасомах и нуклеосомах сравнивается на Рисунке 39 Б, В. Показали, что тетрамер более гибок в тетрасоме и в среднем принимает несколько более «закрытую» конформацию (максимум распределения составил 3,8 и 4,0 нм для тетрасомы и нуклеосомы) (Рисунок 39 Б).

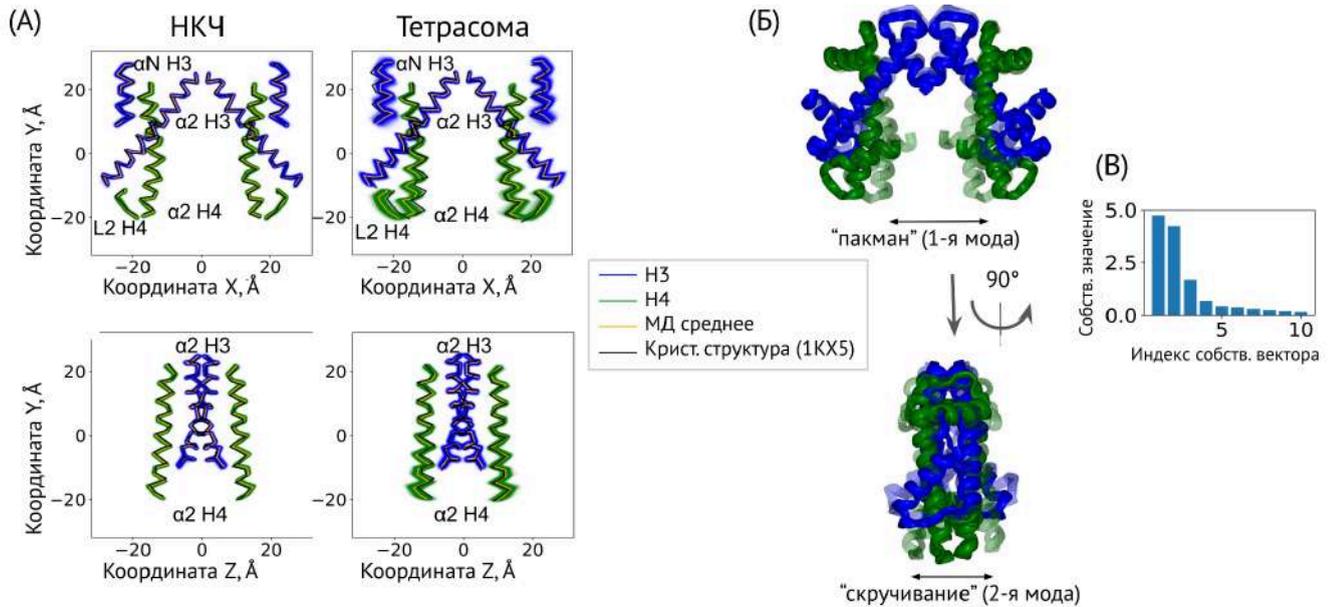


Рисунок 38. Внутренняя пластичность тетрамера гистонов $(H3-H4)_2$ в составе тетрасомы. (А) Динамика гистонов в тетрасоме и НКЧ в виде двумерных проекций (сверху – вид спереди, снизу – вид сбоку) положений атомов C- α ключевых структурных элементов гистонов ($\alpha 2$ -спиралей H3 и H4, петли L2 H4 и αN -спирали H3) во время моделирования методом МД нуклеосомы (15 микросекунд) и тетрасомы (2,5 микросекунды). (Б) Коллективные движения тетрамера H3-H4 в тетрасоме: раскрытие по принципу «пакмана» и «скручивание» тетрамера во фронтальной и боковых плоскостях соответственно. ДНК не показана. Коллективные моды были определены с помощью анализа главных компонент ковариационной матрицы движений атомов белкового остова, полученной на основе МД траектории (первые и вторые собственные векторы). (В) Амплитуды (собственные значения) первых 10 коллективных мод (собственных векторов).

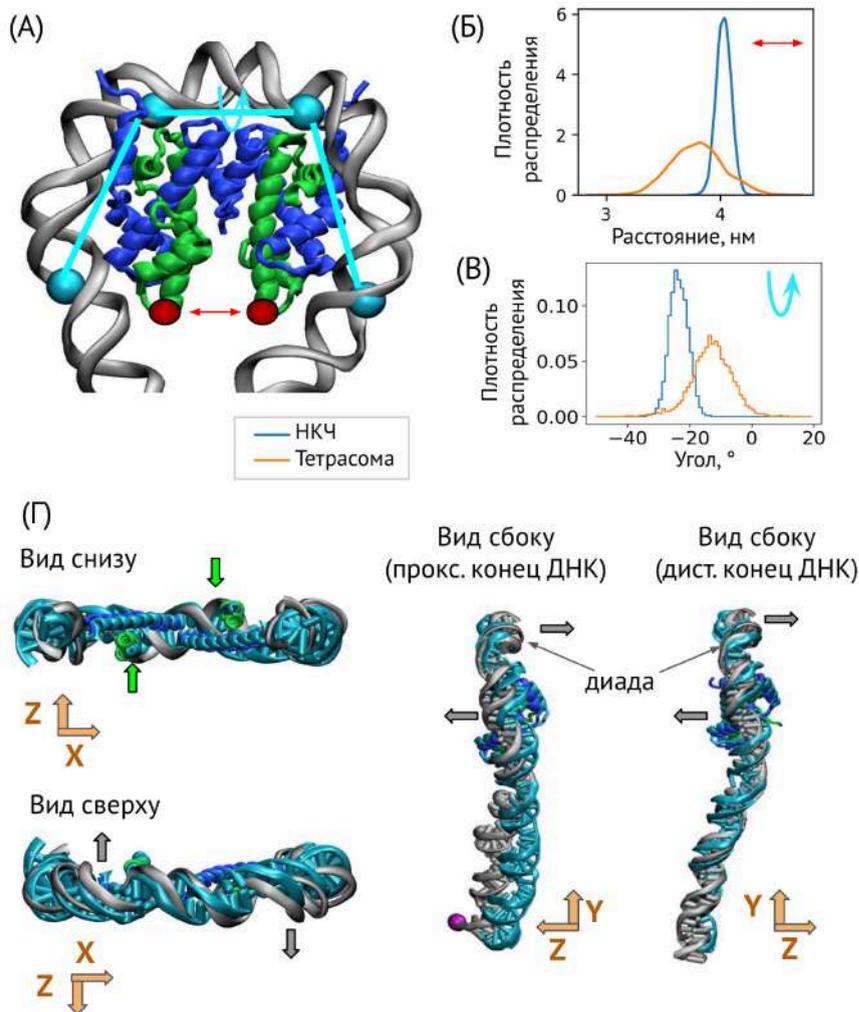


Рисунок 39. Суперспирализация тетрасомной ДНК. (А) Геометрические дескрипторы, использованные для анализа динамики тетрасомы расстояние между концами $\alpha 2$ -спиралей Н4 (красная стрелка) и торсионный угол суперспирали тетрасомной ДНК (голубая стрелка). (Б, В) Распределения величин геометрических параметров, показанных на панели (А), полученные в результате моделирования МД тетрасом и НКЧ. (Г) Пример конформации тетрасомы (показан в нескольких ориентациях) с положительной суперспирализацией. Положительная суперспирализация ДНК сопровождается одновременным уплощением тетрамера (см. зеленую и серую стрелки). Исходная структура ДНК и гистонов (с отрицательной суперспирализацией) показана голубым цветом. Ориентации показаны вдоль осей системы отсчёта нуклеосомы (показаны оранжевыми стрелками, где оси Z и Y соответствуют осям суперспирали и диады соответственно).

Более выраженная разница наблюдается для изменений в скручивании. Форма тетрамера $(H3-H4)_2$ задает геометрию суперспирали ДНК. Для нуклеосомы торсионный угол принимает отрицательные значения (так как нуклеосомная ДНК формирует левую суперспираль). Наиболее вероятное значение составляет -24° (Рисунок 39 В). Для тетрасомы максимум распределения смещен в -13° , распределение шире. Более того, распределение торсионного угла у тетрасомы заходит в область положительных значений. Такое распределение отражает более высокую гибкость тетрамера $(H3-H4)_2$ в тетрасоме по сравнению с нуклеосомой и предполагает, что отрицательная суперспирализация ДНК, создаваемая тетрамером внутри нуклеосомы, сильнее, чем в тетрасоме. Тетрасома обладает потенциалом для перехода между левой и правой суперспиралью в рамках тепловых флуктуаций (Рисунок 39 Г).

6.2. Обсуждение

При потере гистонов H2A-H2B происходит раскручивание фланкирующих тетрасому участков ДНК, которые высоко динамичны в составе тетрасом. Конформация и динамика тетрамера гистонов $(H3-H4)_2$ отличаются в присутствии H2A-H2B димеров в составе нуклеосомы и в их отсутствии в составе тетрасомы. Наибольшие изменения (дестабилизация и усиление динамики) характерны для интерфейса взаимодействия тетрамера с димером H2A-H2B, а также для α N-спирали H3, теряющей контакты с внешним витком ДНК в составе тетрасом. Однако также показаны отличия и в динамике участков гистонов, формирующих сайты связывания ДНК SHL $\pm 2,5$, связанное с динамическим нарушением ДНК-гистоновых контактов в этом сайте, что позволяет соответствующим участкам гистонов (в первую очередь L2-петле H4) приобретать динамичность, характерную для этого участка в составе свободного H3-H4 димера. Такое разворачивание ДНК в мульти-микросекундном МД моделировании доходило до сайта SHL $\pm 1,5$. Это согласуется с данными ЯМР-экспериментов, но также эксперименты показывают отличия в динамике L1-петли и $\alpha 1$ -ext спирали H4, формирующих сайты связывания вблизи диады (SHL $\pm 0,5$), что позволяет

предположить возможность дальнейшего разворачивания ДНК на больших временах моделирования или существования дефектов кручения ДНК в областях между кластерами контактов, как это было показано для нуклеосом (см. раздел 4.1.3, 4.1.4).

Также ЯМР данные показали повышенную динамику N-хвоста гистона H4, а более ранние работы демонстрировали аналогичный результат и для N-хвоста H3 [107]. В нашем моделировании присутствовали хвосты гистонов, также продемонстрировавшие несколько большую подвижность в составе тетраасом. Однако моделирование проводилось с использованием классического протокола для моделирования глобулярных белков и ДНК, и вопрос применимости анализа к динамике хвостов в таком случае остается дискуссионным (см. раздел 1.2.3) и результаты такого анализа не были включены в строгий анализ данного раздела. Отметим, однако, что ключевыми в стабилизации нуклеосом являются два хвоста, находящиеся в области входа/выхода из нуклеосомы: N-хвост H3 и C-хвост H2A. Участие этих двух хвостов в процессах откручивания было описано механистически [43,168] и было показано дестабилизирующее действие удаления хвостов на структуру нуклеосом [203,228]. В структуре тетраасомы крайние участки связанной гистонами ДНК взаимодействуют с N-хвостом H4, из чего можно предположить его роль в стабилизации тетраасомы по аналогии с N-хвостом H3 и C-хвостом H2A. По недавним результатам, удаление H4 хвоста изменяет позиционирование нуклеосом в хроматине [47], при этом ранее было показано, что позиционирование $(H3-H4)_2$ тетрамера происходит и в отсутствие гистонов H2A и H2B [103].

В МД моделировании тетраасом показали, что глобулярная структура тетрамера $(H3-H4)_2$ внутри тетраасомы является пластичной и принимает ансамбль конформаций, отличный от такового в нуклеосоме. В частности, структура тетрамера в тетраасоме более закрытая (имеет меньшее расстояние между внешними сайтами связывания ДНК $SHL \pm 2,5$). Это расходится с ранее опубликованной работой Рычкова и др., где показали, что междимерное расстояние $((H3 \cdot H4)-(H3' \cdot H4'))$ в тетраасомах больше, чем в нуклеосомах [106].

Одной из причин такого расхождения результатов может быть связь крупномасштабных флуктуаций в геометрии ДНК (включая фланкирующую ДНК) с динамикой тетрамера посредством контактов гистонов с ДНК, которые были более сильными в исследовании Рычкова и др. из-за выбора силового поля (в нашем протоколе используются коррекции CUFIX, решающие известную проблему аномально сильных зарядовых взаимодействий в МД расчетах [126]). Наблюдения, полученные в ходе нашего моделирования, показывают, что разворачивание тетрамерной ДНК позволяет ей принимать более закрытую конформацию. Дальнейшие исследования МД в различных условиях с более длительными временными масштабами моделирования могут дополнительно прояснить этот вопрос.

Из траекторий были выделены две характеристические моды движения: открытие и закрытие тетрамера в плоскости нуклеосом и изменение скрученности тетрамера, связанное со степенью суперспирализации, связанной с тетрамером ДНК. Такие моды движения являются следствием внутренней пластичности гистонов Н3 и Н4, так как могут быть получены путем складывания характеристических движений изгиба двух димеров Н3-Н4 в составе тетрамера (определение внутренней пластичности димера приведено в разделе 4.1.2).

МД расчеты показали, что степень отрицательного суперспирального скручивания, сообщаемого ДНК тетрамером в тетрамере, значительно ниже, чем в нуклеосоме. Более того, конформации с небольшими значениями положительного суперспирального скручивания ДНК наблюдались в рамках тепловых колебаний. Положительная и отрицательная суперспирализация ДНК являются важными факторами, влияющими на функционирование генома. Известно, что время транскрипции положительная и отрицательная суперспирализация ДНК генерируется ниже и выше полимеразы, соответственно [229]. Одна нуклеосома при своей разборке высвобождает около 1,26 отрицательной суперспирализации ДНК [230], что может быть полезно для поглощения положительной суперспирализации, генерируемой перед движущимися полимеразой. Способность тетрамер поглощать стресс суперспирализации без потери

связанных с ДНК гистонов Н3 и Н4 может предотвращать выпадение гистонов и способствовать поддержанию эпигенетических ландшафта.

В литературе описаны случаи спонтанного переключения тетрасомы с левой на правую суперспирализацию ДНК [231,232]; в частности, было отмечено спонтанное переключение направления вращения у тетрасом, при этом левостороннее состояние было энергетически выгоднее на 2,5 к_BT (примерно в 12 раз более вероятно) [233]. Предполагалось, что с точки зрения структуры правозакрученное состояние может формироваться при реорганизации интерфейса Н3-Н3 (четырёх-спирального контакта) [234,235]. Мы не наблюдали реорганизации этого интерфейса в микросекундном масштабе времени, но не можем исключить, что это может произойти при более долгом моделировании. С другой стороны, расчеты показывают, что конформации тетрамера с небольшой степенью правой суперспирализации уже доступны благодаря гибкости глобулярной структуры тетрамера гистонов без необходимости перестройки Н3-Н3 контактов. С помощью моделирования МД мы показали, что в среднем степень отрицательной суперспиральности, передаваемой ДНК тетрамером в тетрасоме, значительно ниже (по модулю), чем в нуклеосоме. Уровень суперспирализации ДНК может влиять на вероятность того, что димеры Н2А-Н2В останутся связанными с тетрамером в составе нуклеосом, особенно после откручивания внешнего витка нуклеосомной ДНК.

В рамках исследования [225] также проводился анализ силы барьеров транскрипции с помощью Pol II, результаты которого свидетельствуют о сохранении тетрасомой барьеров прохождения полимеразы, соответствующих областям контактов тетрамера (Н3-Н4)₂ с ДНК. Но для этих барьеров показана более низкая сила. Вероятно, повышенная динамика тетрасомы, в частности движение разворачивания ДНК, может быть причиной более легкого прохождения полимеразы через тетрасомы по сравнению с нуклеосомами.

Динамика тетрамера дополняется гибкостью фланкирующих тетрасому сегментов ДНК, динамика которой показана как во фронтальной плоскости тетрасомы, так и в перпендикулярном направлении. В совокупности гибкость

тетрамера и гибкость ДНК обеспечивают широкий диапазон потенциальных конформаций ДНК в хроматиновой фибрилле, состоящей из тетрасом, чем нуклеосомы. Следовательно, образование тетрасом, вероятно, увеличивает гибкость хроматиновых фибрилл, их способность формировать петли (в том числе необходимые для взаимодействия энхансеров и промоторов [236]) и поглощать стресс суперспирализации, возникающий при транскрипции и репликации.

Глава 7. Моделирование динамики неупорядоченных ХВОСТОВ ГИСТОНОВ

7.1. Результаты

7.1.1. Взаимодействие хвостов гистонов с нуклеосомой

Для исследования динамики хвостов гистонов была построена исходная модель с «прямыми» хвостами на основе кристаллической структуры НКЧ без хвостов (Рисунок 40 А). Хвосты гистонов положительно заряжены, в связи с чем происходит их конденсация из исходно вытянутого состояния на поверхность нуклеосомной ДНК. Конденсация происходит на временах 10-100 нс и приводит к формированию более компактных конформаций хвостов, т.е., уменьшению радиуса гирации. На Рисунке 40 Б приведен профиль динамики изменения радиуса гирации наиболее длинного хвоста нуклеосомы – хвоста гистона Н3, на котором видно, что точное время конденсации варьируется между повторностями, однако во всех случаях 100 нс обеспечивают установление равновесия. Далее, в приведенном анализе будут использоваться траектории с исключенными начальными 100 нс. Распределение конформаций хвостов по радиусу гирации в равновесной динамике (Рисунок 40 В) демонстрирует значительную вариативность конформаций для более длинных хвостов (N-хвосты Н3, Н2В и Н4) в сравнении с короткими хвостами (N- и С-хвосты Н2А). Также из распределения для длинных хвостов можно выделить отдельные состояния с большей или меньшей компактностью; на Рисунке 40 Г приведем примеры кадров МД с разными по компактности конформациями N-хвоста Н3.

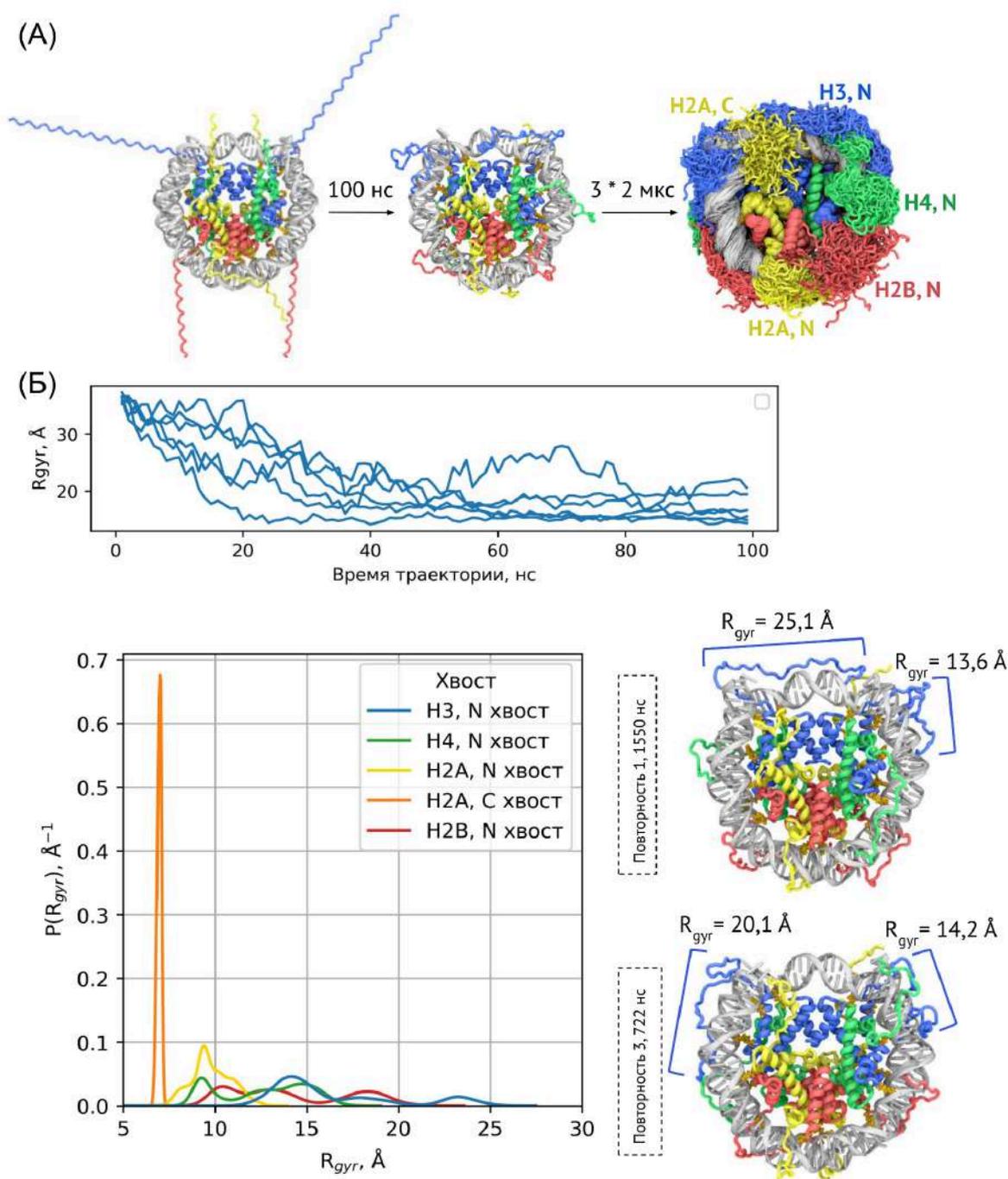


Рисунок 40. Обзор динамики неупорядоченных хвостов гистонов в составе НКЧ. (А) Визуализация исходной структуры НКЧ с хвостами, примера конформации спустя 100 нс моделирования и обзор динам НКЧ с хвостами в виде наложения кадров МД (без учета первых 100 нс траекторий). (Б) Профиль изменения радиуса гирации N-хвоста гистона H3 в течение первых 100 нс моделирования. Приведены профили для трех независимых траекторий МД; проксимальная и дистальная копии гистонов в составе НКЧ анализировались независимо. (В) Распределение радиуса гирации хвостов в равновесной части

траекторий. (Г) Примеры кадров траектории МД с указанием мгновенных величин радиуса гирации N-хвоста гистона НЗ.

Конденсация хвостов на нуклеосомную ДНК в течение первых 100 нс динамики приводит к увеличению числа контактов между хвостами и ДНК (Рисунок 41 А), однако на временах до 500 нс происходит дальнейший рост числа контактов хвостов, связанное с исследованием конформационного пространства хвостами и оптимизацией их взаимодействия с ДНК. В результате конденсации, неупорядоченные гистоновые хвосты формируют 56% всех контактов между ДНК и белком в нуклеосоме (Рисунок 41 Б). В целом, гистоны формируют большинство контактов с сахаро-фосфатным остовом ДНК, (59% и 24% контактов с фосфатами и сахарами ДНК, соответственно). Со стороны гистонов, большинство контактов формируют а.о. аргинина и лизина (Рисунок 41 В), что подтверждает преимущественно электростатическую природу ДНК-гистоновых взаимодействий. Неупорядоченные хвосты гистонов также взаимодействуют и с атомами азотистых оснований ДНК, т.е. с малой и большой бороздкой (в сопоставимом соотношении, Рисунок 41 Б); остатки глобулярного домена формируют контакты с бороздками ДНК значительно реже (1,5% контактов) и представлены в основном взаимодействием боковой цепи аргинина с малой бороздкой. В таких взаимодействиях также активно участвуют а.о. аргинина и лизина, при этом лизин не демонстрирует преференции к малой или большой бороздке, в то время как аргинин формирует значительно больше контактов с малой бороздкой, чем с большой (Рисунок 41 Г).

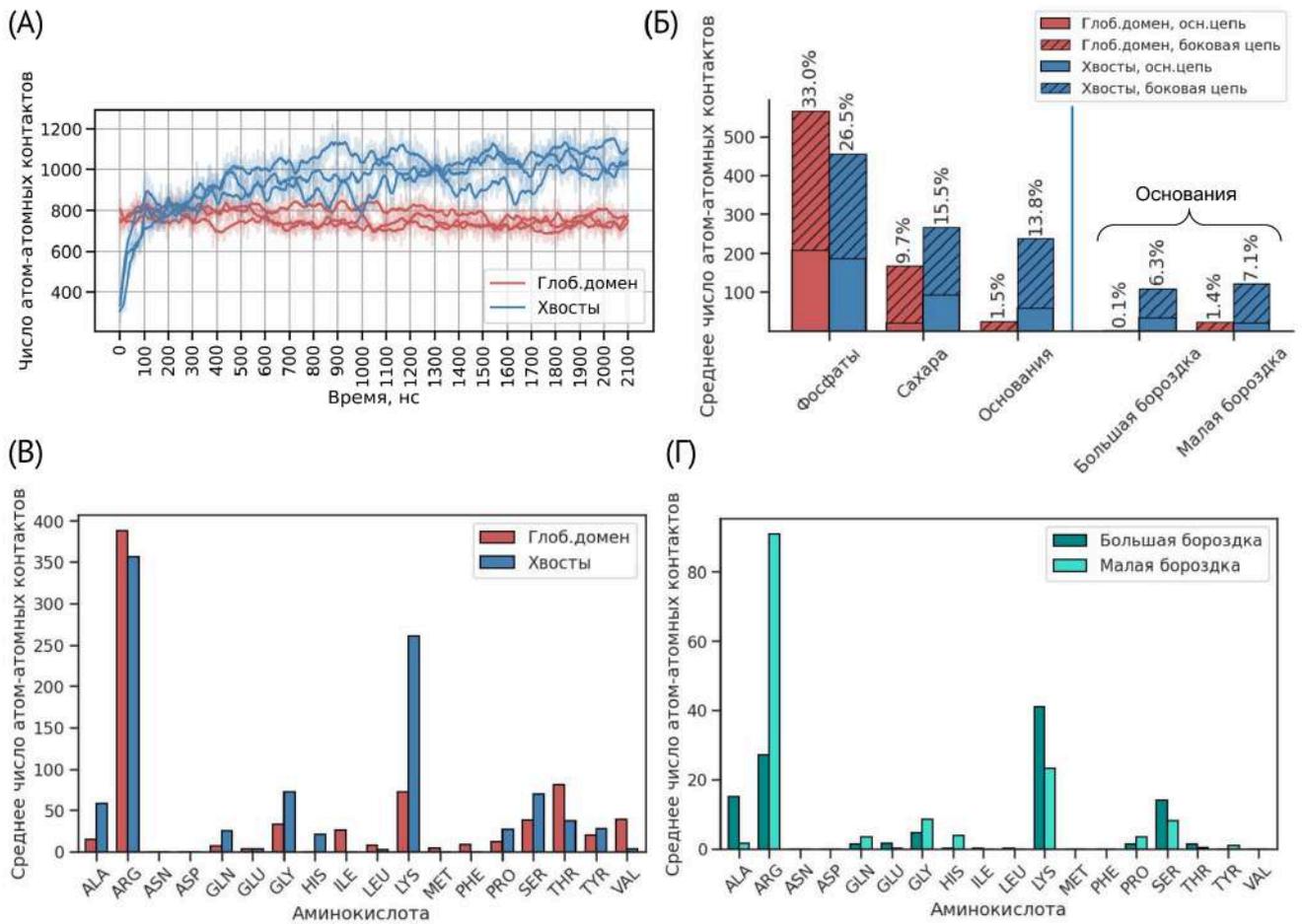


Рисунок 41. Анализ ДНК-гистоновых контактов. (А) Динамика изменения числа контактов глобулярного домена и хвостов гистонов с ДНК в МД траекториях. Прозрачные линии соответствуют мгновенным значениям, яркие линии отображают усредненные фильтром Савицкого-Голея значения с окном усреднения 25 нс. Три профиля соответствуют трем повторностям расчета. (Б) Соотношение групп контактов, формируемых глобулярным доменом и хвостами гистонов с разными частями нуклеотидов ДНК. (В) Соотношение групп контактов, формируемых разными аминокислотными остатками глобулярного домена и хвостов гистонов с ДНК. Соотношение групп контактов, формируемых разными аминокислотными остатками гистонов с малой и большой бороздками ДНК. (Г) Соотношение групп контактов, формируемых разными аминокислотными остатками гистонов с малой и большой бороздками ДНК.

7.1.2. Анализ конформационного ансамбля хвостов

В МД расчетах неупорядоченные гистоновые хвосты сохраняют свою неупорядоченность и принимают широкий ансамбль конформаций, формируя широкий диапазон положений контактов с ДНК (Рисунок 42 А). Частоты появления контактов в разных сайтах нуклеосомной ДНК отличаются; наименее часто формируются контакты с хвостами в сайтах $SHL \pm 5.5$ - ± 6 (Рисунок 42 Б) и на диаде ($SHL 0$). Самый широкий конформационный состав наблюдается для N-хвоста гистона H3 (Рисунок 42 В), формирующего контакты и с областью входа/выхода из нуклеосомы ($SHL \pm 6$ - ± 7) и с внутренними сайтами нуклеосомы ($SHL 0$ - ± 2). Это достигается длиной хвоста (43 п.н.) и положением в нуклеосоме области перехода между хвостами и глобулярной частью, локализованной между двумя витками супервитка ДНК. Также между двумя витками супервитка ДНК выходит и N-хвост гистона H2В, формирующий контакты с внешним полувитком суперспирали ($SHL \pm 4$ - $\pm 5,5$) и с рядом расположенным участком внутреннего полувитка ($SHL \pm 2$ - ± 4) (Рисунок 42 А,В).

N-хвост гистона H4 формирует контакты с ДНК в сайтах $SHL \pm 1$ - $\pm 3,5$, взаимодействует с одним (внутренним) витком ДНК. Наиболее глубоким сайтом, формирующим контакты с H4 хвостом, является сайт $SHL +0,5$ (третья повторность). Также только с одним витком ДНК взаимодействует и N-хвост гистона H2А, формирующий взаимодействия с сайтом $SHL \pm 3,5$ - $\pm 4,5$.

C-хвост гистона H2А локализован в области входа\выхода из нуклеосомы и взаимодействует с сайтом $SHL \pm 6$ - ± 7 . Этот хвост также может взаимодействовать с соседним витком ДНК в сайте $SHL 0$ - $\pm 0,5$, однако, в отличие от длинных хвостов H3 и H2В, взаимодействие с соседними витками суперспирали происходит не одновременно (Рисунок 43). Это связано с маленькой длиной ста (10 а.о.) и выражается в переходах между двумя состояниями (на диоде и на входе/выходе) в субмикросекундном масштабе.

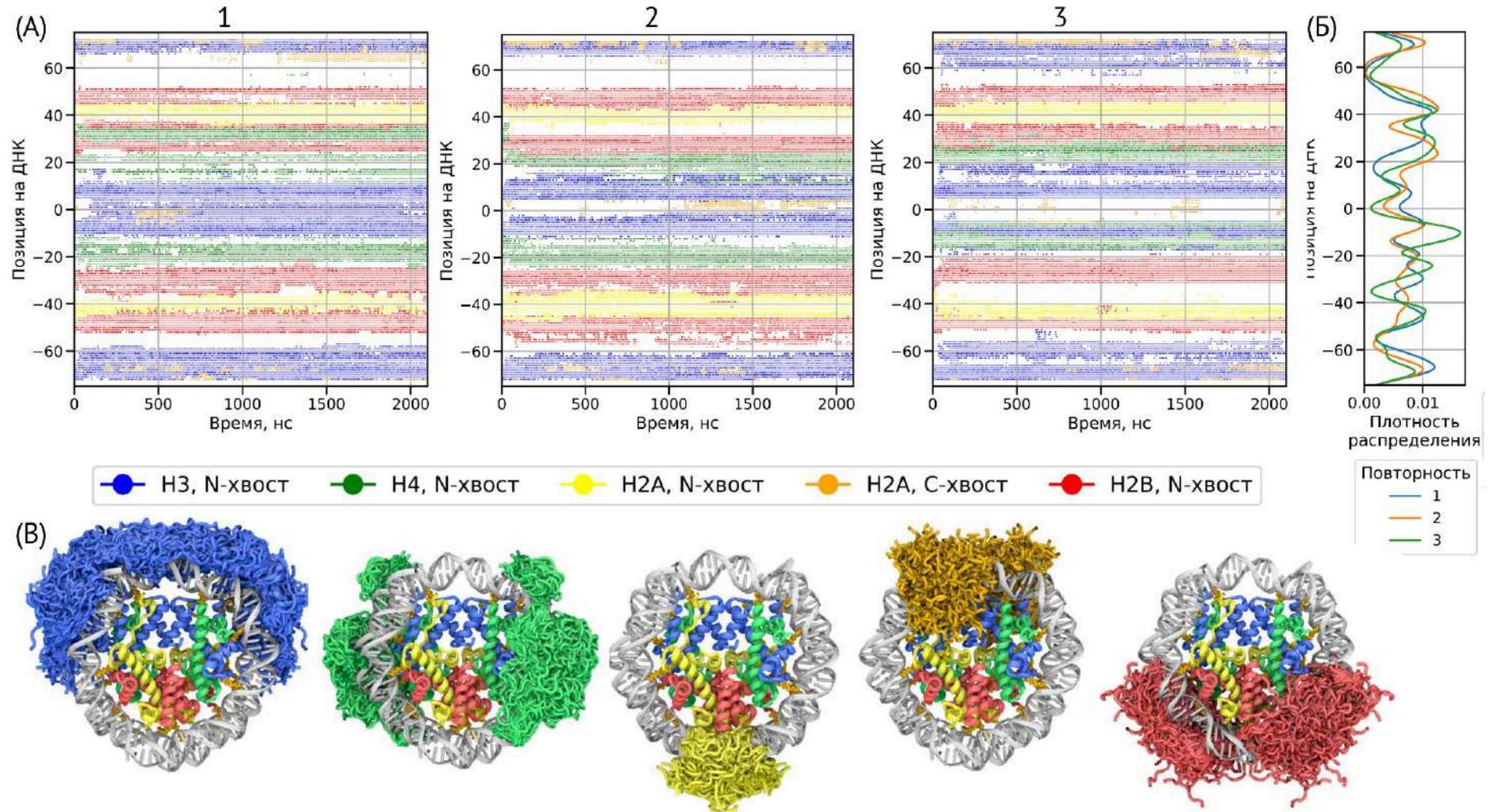


Рисунок 42. Положение хвостов на нуклеосомной ДНК. (А) Динамика положений ДНК-гистоновых контактов на нуклеосомной ДНК. (Б) Плотность распределения положений ДНК-гистоновых контактов на нуклеосомной ДНК. (В) Визуализация областей пространства, в которых находились атомы гистоновых хвостов в ходе МД.

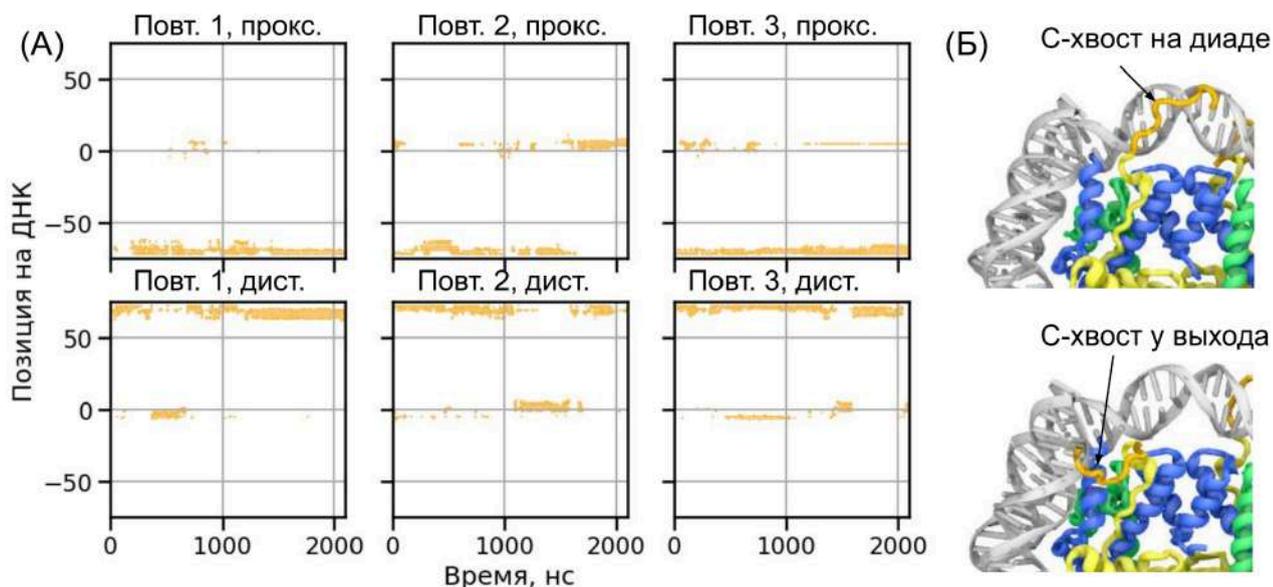


Рисунок 43. Динамика переходов между альтернативными конформациями С-хвоста гистона Н2А в МД траекториях. (А) Динамика положений контактов между хвостом и ДНК. (Б) Репрезентативные кадры МД, иллюстрирующие альтернативные состояния С-хвоста Н2А.

7.2. Обсуждение

В ряде работ по моделированию МД нуклеосом с хвостами была показана быстрая конденсация хвостов на нуклеосомную и линкерную ДНК в силу электростатического притяжения [42,43,60,168]. Контакты между хвостами гистонов и ДНК охарактеризованы как нечеткие (fuzzy interactions) и представлены в виде короткоживущих подвижных контактов [120]. Тем не менее, в МД расчетах показана возможность «заякоривания» хвостов в бороздках ДНК через боковые цепи остатков аргинина [42,168,60,120] и лизина [42,168,60]. Согласно представленным результатам, взаимодействие лизина с малой и большой бороздками ДНК происходит равновероятно, в то время как аргинин демонстрирует преференцию к взаимодействию с малой бороздкой. Важно отметить, что корректность описания взаимодействий а.о. хвостов гистонов с бороздками ДНК является дискуссионным вопросом (раздел 1.2.3). В отличие от хвостов, остатки глобулярного ядра мало взаимодействуют с основаниями, т.е. кор

не участвует в узнавании последовательности ДНК, а разная способность формирования стабильных нуклеосом на разных последовательностях связана с механистическими свойствами ДНК [237].

Локализация хвостов и их способ взаимодействия с ДНК обуславливает их роль в нуклеосоме. N-хвосты гистонов H3 и H2B выходят из нуклеосомного ядра между двумя витками суперспирали ДНК и взаимодействуют одновременно с двумя удаленными по последовательности сайтами ДНК. Вероятно, это обуславливает их ключевую роль в обеспечении термостабильности нуклеосом [203]. N-хвосты гистонов H2A и H4, напротив, формируют контакты только с одним витком суперспирали ДНК. В то же время показано, что удаление N-хвостов гистонов H4 и H2A приводит к нарушению распределения частот встречаемости определенных пар нуклеотидов в разных сайтах нуклеосом в хроматине [47], т.е. эти хвосты важны для позиционирования нуклеосом.

Большое число контактов хвостов с ДНК и неупорядоченная структура делают трудным исследование доступного конформационного ансамбля хвостов, что особенно критично для длинных хвостов (N-хвосты H3 и H2B). Хорошо работает стратегия рандомизации стартовых структур, которую реализовали авторы работы Peng et al. [60]. В своем исследовании авторы провели расчеты МД длиной в сумме 65 мкс и использовали подходящий для моделирования хвостов протокол моделирования (силовое поле Amber ff19SB и модель воды OPC). В траекториях авторы выделили переходы между связанным и несвязанным (с сохранением малого числа контактов с ДНК) состояниями хвоста и охарактеризовали кинетику таких переходов. Предполагается, что кинетика переходов между связанным и несвязанным состоянием хвостов определяет кинетику связывания эффекторных белков с хвостами гистонов. Аналогичную модель представили в работе Ohtomo et al. [238], где из МД расчетов и HSQC спектров (метод ЯМР спектроскопии) предположили существование двух состояний для N-хвостов гистонов H2A и H2B – «в контакте» (contact) и «сниженный контакт» (reduced contact) состояния хвостов с ДНК.

В приведенных выше результатах конформационный ансамбль анализировался не с точки зрения динамики изменения числа контактов между ДНК и гистонами, а с точки зрения положения этих контактов на нуклеосомной ДНК. В траекториях длиной 2 мкс мы наблюдали разные состояния связывания хвостов в разных повторностях, и для длинных хвостов (Н3, Н2В и Н4) мы не наблюдали переходов между этими состояниями в траектории МД. Аналогичное исследование конформационного пространства гистоновых хвостов проводили авторы работы [239]. Отметим, что некоторые состояния, такие как хвост гистона Н3 на диаде (Рисунок 40 Г, верхний кадр), не были обнаружены авторами исследования; соответственно, вопрос полноты исследованного конформационного ансамбля остается открытым. Другие примеры из числа описанных в результатах состояний, такие как взаимодействия в сайте SHL -5,5 (Н2В во второй повторности и Н3 в третьей повторности), являются единично наблюдаемыми, что также может свидетельствовать о недостаточной эффективности сканирования конформационного пространства для этих хвостов.

Конформационный ансамбль N-хвоста гистона Н4 был ранее подробно исследован в цикле работ, выполненных методом МД и ЯМР[120,127,128]. В работах авторы показали две возможные ориентации хвоста (к диаде и от диады), что согласуется с полученным в наших расчетах ансамблем конформаций N-хвоста гистона Н4.

Заключение

Диссертационная работа посвящена исследованию динамики белков-гистонов и их комплексов с ДНК – нуклеосом и тетрасом – методом МД моделирования с использованием экспериментальных данных и данных об известных структурах из открытых баз данных. Полученные результаты позволили выявить ключевые динамические и структурные особенности ДНК-гистоновых комплексов и предлагают механистическое объяснение ряда фундаментальных процессов в хроматине (Рисунок 44).

Основным результатом работы является демонстрация значительной внутренней пластичности глобулярных доменов гистонов, которая играет важную роль в обеспечении стабильности и функционально значимой динамики нуклеосом. Исследование динамики отдельных димеров гистонов (Н2А-Н2В и Н3-Н4) выявило наличие общей для них собственной моды изгиба. Эта мода, по-видимому, является универсальным динамическим свойством белков, взаимодействующих через структурный мотив «рукопожатие».

Было установлено, что пластичность гистонического октамера является необходимым условием для релаксации дефектов кручения и скольжения нуклеосомной ДНК. Показано, что степень изгиба димера Н2А-Н2В зависит от наличия дефектов кручения ДНК. Процесс релаксации дефектов кручения ДНК требует изгиба α 2-спирали гистона Н2А в сторону центра нуклеосомы, что обеспечивается изгибовой пластичностью димера. Пластичность гистонов важна для поддержания стабильности нуклеосомы, так как участвует в восстановлении контактов с ДНК, утерянных в процессе откручивания.

В ходе исследования была детально охарактеризована структурная динамика вариантных форм гистона Н2А (Н2А.Z и Н2А.J), что позволило объяснить различия в стабильности и функциональных свойствах нуклеосом, их содержащих. Для L1-петель канонического Н2А и его вариантов было показано существование альтернативных конформаций, между которыми происходят

динамические переходы. Кинетика этих переходов определяется специфическими аминокислотными остатками как самой L1-петли, так и N-конца прилегающей α 2-спирали. В частности, динамика L1-петель H2A.J оказывает прямое влияние на формирование контактов между двумя димерами H2A-H2B в составе нуклеосомы. На примере H2A.Z продемонстрировано, что аминокислотная последовательность гистона способна влиять на степень изгиба всего димера H2A-H2B. Этот эффект служит механистическим обоснованием большей доступности ДНК в H2A.Z-содержащих нуклеосомах и, как следствие, сниженной стабильности, что согласуется с их известной ролью в маркировании транскрипционно-активных участков генома.

Отдельный блок работы был посвящен изучению динамики тетрасом. Установлено, что тетрасомы являются значительно более динамичными структурами, чем полные нуклеосомы. Для них характерны динамические процессы спонтанной потери и восстановления контактов между ДНК и гистонами (тетрасомный аналог откручивания ДНК), что усиливает подвижность как самой ДНК, так и её сайтов связывания на гистоновом тетрамере. В работе описаны две основные характеристические моды движений глобулярного домена тетрамера: 1) «открытие-закрытие» и 2) скручивание вдоль оси супервитка ДНК. Вторая мода, в частности, обуславливает гибкость тетрамера, связанную с изменением степени суперспирализации ДНК, и лежит в основе наблюдаемого динамического перехода между правозакрученной и левозакрученной суперспирализацией ДНК в рамках тепловых колебаний.

Выявленные динамические свойства тетрасом имеют важное функциональное значение. Полученные данные позволяют предположить, что образование тетрасом является не просто промежуточным этапом разборки нуклеосом, но может играть самостоятельную регуляторную роль. Высокая подвижность тетрасомной ДНК, как было показано коллегами, создает более слабый барьер для транскрипции РНК-полимеразой II, чем интактные нуклеосомы.

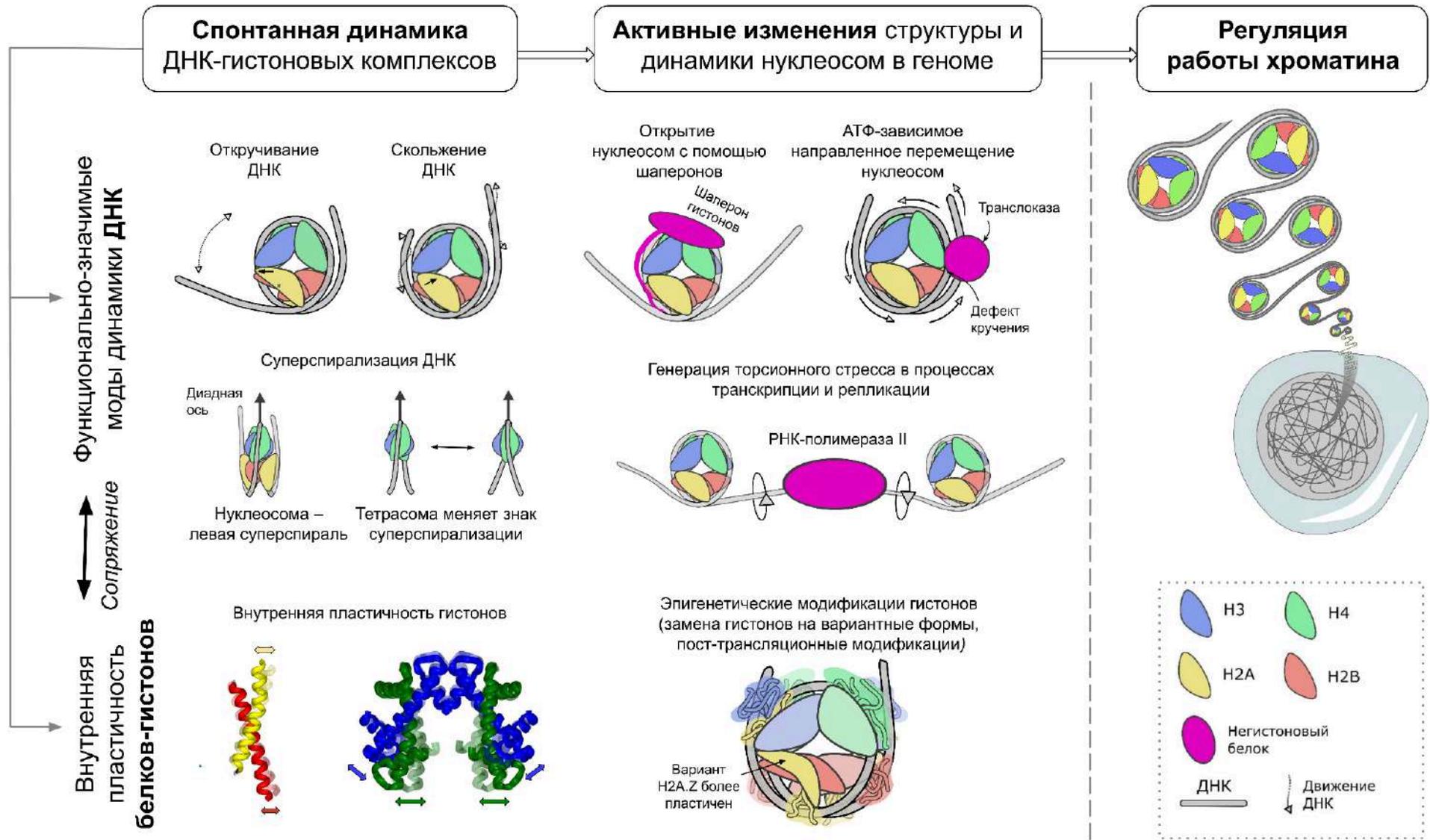


Рисунок 44. Схематическое представление динамических мод ДНК-гистоновых комплексов и их роли в хроматине.

Проведенное исследование вносит существенный вклад в понимание молекулярных механизмов пластичности и динамики ДНК-гистоновых комплексов. Установление связи между аминокислотной последовательностью гистонов, конформационной динамикой их ключевых элементов, механическими свойствами ДНК и структурными свойствами нуклеосом (стабильность, доступность ДНК) позволяет перейти от статического структурного описания к механистической модели организации хроматина. Полученные результаты открывают перспективы для дальнейшего изучения, в том числе для направленного дизайна мутантных форм гистонов и прогнозирования влияния генетических вариаций в гистонах и ДНК на процессы, протекающие в хроматине.

Выводы работы:

1. В компьютерном моделировании равновесной динамики нуклеосом реализована динамика функционально важных мод: откручивание и скольжение нуклеосомной ДНК.
2. Определены параметры внутренней пластичности димеров гистонов H2A-H2B и H3-H4. Установлено, что ключевой модой их динамики является изгиб $\alpha 2$ -спиралей, образующих мотив «рукопожатие». Амплитуда и среднее значение изгиба различаются у свободных димеров и димеров в составе нуклеосомы.
3. Обнаружена связь пластичности димера гистонов H2A-H2B с динамикой ДНК. Показано, что скольжение ДНК требует изгиба димера в сторону центра нуклеосомы. Изгиб димера в сторону от центра нуклеосомы способствует восстановлению контактов с ДНК при обратном прикручивании после её откручивания.
4. Установлено, что аминокислотная последовательность гистонов влияет на их пластичность. Для вариантного гистона H2A.Z показана повышенная гибкость $\alpha 2$ -спирали и смещение конформационного равновесия в области N-конца $\alpha 2$ -спирали. Для вариантного гистона H2A.J показано, что замена S40A позволяет L1-петле гистона переключаться в альтернативную

конформацию, повышающую стабильность взаимодействий между гистонами в нуклеосоме.

5. Охарактеризованы структура и динамика тетрасом. Показано, что потеря димеров H2A-H2B приводит к значительному разворачиванию ДНК и усилению динамики тетрамера гистонов. Выявлены характерные моды динамики тетрамера («раскрытие» и «скручивание»). Установлено, что ДНК в тетрасоме характеризуется пониженной отрицательной суперспирализацией и способна к переходам в состояние с положительной суперспирализацией в рамках тепловых флуктуаций, что обусловлено пластичностью глобулярного домена гистонов H3 и H4.

Благодарности

Автор выражает благодарность:

научному руководителю Алексею Константиновичу Шайтану за обучение, постановку научных задач, обсуждение полученных результатов, помощь в подготовке текстов работ и презентаций докладов, а также за возможность работать на кафедре биоинженерии в группе интегративной биологии;

Григорию Алексеевичу Армееву за обучение, помощь в проведении совместной работы, техническое сопровождение на всем протяжении совместной работы, а также за предоставление результатов анализа ДНК в структурах нуклеосом, депонированных в базе данных PDB (включен в результаты Главы 4);

сотрудникам и преподавателям кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ за обучение, предоставление возможности выполнять научные исследования;

студентам, аспирантам и сотрудникам кафедры биоинженерии за помощь в выполнении задач, обсуждение научных результатов и поддержку;

сотрудникам научных групп под руководством профессора Василия Михайловича Студитского и профессора Shi Xiangyan за проведение совместных исследований и обсуждение научных задач, а также за предоставление данных, включенных в результаты Главы 6;

к.ф.-м.н. Ольге Олеговне Лебеденко за предоставление протоколов моделирования, используемых в Главе 7, а также за обсуждение проблемы моделирования неупорядоченных хвостов гистонов;

Никите Александровичу Косариму за предоставление траекторий МД, используемых в анализе раздела 5.1.2.

Работа поддержана грантами Российского научного фонда № 18-74-10006 (микросекундная МД нуклеосом), № 23-74-10012 (моделирование динамики хвостов гистонов) и № 19-74-30003 (МД тетрасом), а также в рамках соглашения с Министерством науки и высшего образования Российской Федерации № 075-15-2024-539 от 24.04.2024 по теме: «Эпигенетика как основа для разработки

новых стратегий лечения болезней» (моделирование нуклеосом с вариантными гистонами). Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова и суперкомпьютера «МГУ-270» МГУ имени М.В. Ломоносова.

Список сокращений

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

а.о. – аминокислотный остаток

п.н. – пара нуклеотидов

ПТМ – посттрансляционные модификации белков

МД – молекулярная динамика

НКЧ – нуклеосомная коровая частица

Диада – ось псевдосимметрии второго порядка

SHL – super helix location, положение на супервитке нуклеосомно ДНК относительно диады

СКН – система координат нуклеосомы

СКД – система координат димера

хвосты (гистонов) – внутренне неупорядоченные N- и C-концевые участки гистонов

Pol II – РНК-полимераза II

IDP – intrinsically disordered proteins, внутренне неупорядоченные белки

IDR – intrinsically disordered regions, внутренне неупорядоченные участки белков

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

РСА – рентгеноструктурный анализ

КриоЭМ – криоэлектронная микроскопия

АСМ – атомно-силовая микроскопия

FRET – Forster (fluorescence) resonance energy transfer, Ферстеровский резонансный перенос энергии (флуоресценции)

мкс – микросекунда

нс – наносекунда

RMSF – root-mean square fluctuations, среднеквадратичные флуктуации (положений атомов в траектории)

RMSD – root-mean-squared deviations, среднеквадратичное смещение атомов (в сравнении структур/кадров траектории МД)

Список литературы

1. Van Holde K. E. Chromatin. New York, NY: Springer, 1989.
2. Разин С. В., Ульянов С. В. Хроматин и эпигенетика. Лаборатория знаний. 2026. 240 с.
3. Kornberg R. D. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA // Science. American Association for the Advancement of Science, 1974. Т. 184, № 4139. С. 868–871.
4. Olins A. L., Olins D. E. Spheroid chromatin units (v bodies) // Science. American Association for the Advancement of Science, 1974. Т. 183, № 4122. С. 330–332.
5. Zhou K., Gaullier G., Luger K. Nucleosome structure and dynamics are coming of age // Nat. Struct. Mol. Biol. 2019. Т. 26, № 1. С. 3–13.
6. 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: 6648 // Nature. 1997/09/26 изд. Macmillan Magazines Ltd., 1997. Т. 389, № 6648. С. 251–260.
7. Armeev G. A., Gribkova A. K., Shaytan A. K. Nucleosomes and their complexes in the cryoEM era: Trends and limitations // Front. Mol. Biosci. 2022. Т. 9. С. 1070489.
8. Onufriev A. V., Schiessel H. The nucleosome: from structure to function through physics // Curr. Opin. Struct. Biol. 2019. Т. 56. С. 119–130.
9. Seal R. L., Denny P., Bruford E. A., Gribkova A. K., Landsman D., Marzluff W. F., McAndrews M., Panchenko A. R., Shaytan A. K., Talbert P. B. A standardized nomenclature for mammalian histone genes // Epigenetics Chromatin. 2022. Т. 15, № 1. С. 34.
10. Bowman G. D., Poirier M. G. Post-translational modifications of histones that influence nucleosome dynamics // Chem. Rev. 2015. Т. 115, № 6. С. 2274–2295.
11. Cheng L.-Q., Zhang Z.-Q., Chen H.-Z., Liu D.-P. Epigenetic regulation in cell senescence // J. Mol. Med. 2017. Т. 95, № 12. С. 1257–1268.
12. Wang K., Liu H., Hu Q., Wang L., Liu J., Zheng Z., Zhang W., Ren J., Zhu F., Liu G.-H. Epigenetic regulation of aging: implications for interventions of aging and diseases // Signal Transduct. Target. Ther. 2022. Т. 7, № 1. С. 374.

13. Smeeth D., Beck S., Karam E. G., Pluess M. The role of epigenetics in psychological resilience // *Lancet Psychiatry*. 2021. T. 8, № 7. C. 620–629.
14. Alameda L., Trotta G., Quigley H., Rodriguez V., Gadelrab R., Dwir D., Dempster E., Wong C. C. Y., Forti M. D. Can epigenetics shine a light on the biological pathways underlying major mental disorders? // *Psychol. Med.* 2022. T. 52, № 9. C. 1645–1665.
15. Nacev B. A., Feng L., Bagert J. D., Lemiesz A. E., Gao J., Soshnev A. A., Kundra R., Schultz N., Muir T. W., Allis C. D. The expanding landscape of «oncohistone» mutations in human cancers // *Nature*. 2019. T. 567, № 7749. C. 473–478.
16. Espiritu D., Gribkova A. K., Gupta S., Shaytan A. K., Panchenko A. R. Molecular Mechanisms of Oncogenesis through the Lens of Nucleosomes and Histones // *J. Phys. Chem. B. American Chemical Society*, 2021. T. 125, № 16. C. 3963–3976.
17. Matsumoto S., Horikoshi N., Takizawa Y., Kurumizaka H. Chromatin structure related to oncogenesis // *Cancer Sci.* 2023. C. cas.15850.
18. Armeev G. A., Gribkova A. K., Pospelova I., Komarova G. A., Shaytan A. K. Linking chromatin composition and structural dynamics at the nucleosome level // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2019. T. 56. C. 46–55.
19. Nodelman I. M., Bowman G. D. Biophysics of Chromatin Remodeling // *Annu. Rev. Biophys.* 2021. T. 50. C. 73–93.
20. Shi D., Huang Y., Bai C. Studies of the Mechanism of Nucleosome Dynamics: A Review on Multifactorial Regulation from Computational and Experimental Cases // *Polymers*. 2023. T. 15, № 7. C. 1763.
21. Mansisidor A. R., Risca V. I. Chromatin accessibility: methods, mechanisms, and biological insights // *Nucleus*. 2022. T. 13, № 1. C. 238–278.
22. Soman A., Korolev N., Nordenskiöld L. Telomeric chromatin structure // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2022. T. 77. C. 102492.
23. Sundaram R., Vasudevan D. Structural Basis of Nucleosome Recognition and Modulation // *BioEssays*. 2020. T. 42, № 9. C. 1900234.
24. Bai Y., Zhou B.-R. Structures of Native-like Nucleosomes: One Step Closer

- toward Understanding the Structure and Function of Chromatin // *J. Mol. Biol.* 2021. T. 433, № 6. C. 166648.
25. Musselman C. A., Kutateladze T. G. Visualizing Conformational Ensembles of the Nucleosome by NMR // *ACS Chem. Biol.* 2022. T. 17, № 3. C. 495–502.
26. Onoa B., Díaz-Celis C., Cañari-Chumpitaz C., Lee A., Bustamante C. Real-Time Multistep Asymmetrical Disassembly of Nucleosomes and Chromatosomes Visualized by High-Speed Atomic Force Microscopy // *ACS Cent. Sci.* 2024. T. 10, № 1. C. 122–137.
27. Ackermann B. E., Debelouchina G. T. Emerging Contributions of Solid-State NMR Spectroscopy to Chromatin Structural Biology // *Front. Mol. Biosci.* 2021. T. 8. C. 741581.
28. Valieva M. E., Armeev G. A., Kudryashova K. S., Gerasimova N. S., Shaytan A. K., Kulaeva O. I., McCullough L. L., Formosa T., Georgiev P. G., Kirpichnikov M. P., Studitsky V. M., Feofanov A. V. Large-scale ATP-independent nucleosome unfolding by a histone chaperone // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2016. T. 23, № 12. C. 1111–1116.
29. Shi X., Zhai Z., Chen Y., Li J., Nordenskiöld L. Recent Advances in Investigating Functional Dynamics of Chromatin // *Front. Genet.* 2022. T. 13. C. 870640.
30. Das S. K., Huynh M. T., Gao J., Sengupta B., Yadav S. P., Lee T.-H. Methods to investigate nucleosome structure and dynamics with single-molecule FRET // *Methods.* 2023. T. 215. C. 17–27.
31. Chen Y., Tokuda J. M., Topping T., Meisburger S. P., Pabit S. A., Gloss L. M., Pollack L. Asymmetric unwrapping of nucleosomal DNA propagates asymmetric opening and dissociation of the histone core // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences*, 2017. T. 114, № 2. C. 334–339.
32. Mauney A. W., Muthurajan U. M., Luger K., Pollack L. Solution structure(s) of trinucleosomes from contrast variation SAXS // *Nucleic Acids Res.* 2021. T. 49, № 9. C. 5028–5037.
33. Shaytan A. K., Xiao H., Armeev G. A., Wu C., Landsman D., Panchenko A. R. Hydroxyl-radical footprinting combined with molecular modeling identifies unique features of DNA conformation and nucleosome positioning // *Nucleic Acids Res.*

Oxford University Press, 2017. T. 45, № 16. C. 9229–9243.

34. Shaytan A. K., Xiao H., Armeev G. A., Gaykalova D. A., Komarova G. A., Wu C., Studitsky V. M., Landsman D., Panchenko A. R. Structural interpretation of DNA–protein hydroxyl-radical footprinting experiments with high resolution using HYDROID // *Nat. Protoc.* 2018. T. 13, № 11. C. 2535–2556.

35. Díaz-Celis C., Cañari-Chumpitaz C., Sosa R. P., Castillo J. P., Zhang M., Cheng E., Chen A. Q., Vien M., Kim J., Onoa B., Bustamante C. Assignment of structural transitions during mechanical unwrapping of nucleosomes and their disassembly products: 33 // *Proc. Natl. Acad. Sci. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2022. T. 119, № 33. C. e2206513119.

36. Gaire S., Fabian R. L., Adhikari R., Tuma P. L., Pegg I. L., Sarkar A. Micromechanical Study of Hyperacetylated Nucleosomes Using Single Molecule Transverse Magnetic Tweezers // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. T. 24, № 7. C. 6188.

37. Chen P., Li G., Li W. Nucleosome Dynamics Derived at the Single-Molecule Level Bridges Its Structures and Functions // *JACS Au*. 2024. T. 4, № 3. C. 866–876.

38. Melters D. P., Dalal Y. Nano-Surveillance: Tracking Individual Molecules in a Sea of Chromatin // *J. Mol. Biol.* 2021. T. 433, № 6. C. 166720.

39. Morioka S., Sato S., Horikoshi N., Kujirai T., Tomita T., Baba Y., Kakuta T., Ogoshi T., Puppulin L., Sumino A., Umeda K., Kodera N., Kurumizaka H., Shibata M. High-Speed Atomic Force Microscopy Reveals Spontaneous Nucleosome Sliding of H2A.Z at the Subsecond Time Scale // *Nano Lett.* 2023. T. 23, № 5. C. 1696–1704.

40. Vasudevan D., Chua E. Y. D., Davey C. A. Crystal Structures of Nucleosome Core Particles Containing the ‘601’ Strong Positioning Sequence // *J. Mol. Biol.* 2010. T. 403, № 1. C. 1–10.

41. Davey C. A., Sargent D. F., Luger K., Maeder A. W., Richmond T. J. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution // *J. Mol. Biol.* 2002. T. 319, № 5. C. 1097–1113.

42. 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 // *J. Mol. Biol.* 2016. T. 428, № 1. C. 221–237.

43. 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. T. 12.

44. Wang D., Ulyanov N. B., Zhurkin V. B. Sequence-dependent Kink-and-Slide deformations of nucleosomal DNA facilitated by histone arginines bound in the minor groove // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2010. T. 27, № 6. C. 843–859.

45. Cui F., Zhurkin V. B. Distinctive sequence patterns in metazoan and yeast nucleosomes: implications for linker histone binding to AT-rich and methylated DNA // *Nucleic Acids Res.* 2009. T. 37, № 9. C. 2818–2829.

46. Struhl K., Segal E. Determinants of nucleosome positioning // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013. T. 20, № 3. C. 267–273.

47. Nikitina T., Guiblet W. M., Cui F., Zhurkin V. B. Histone N-tails modulate sequence-specific positioning of nucleosomes // *J. Biol. Chem.* 2025. T. 301, № 2. C. 108138.

48. Liu C.-P., Yu Z., Xiong J., Hu J., Song A., Ding D., Yu C., Yang N., Wang M., Yu J., Hou P., Zeng K., Li Z., Zhang Z., Zhang X., Li W., Zhang Z., Zhu B., Li G., Xu R.-M. Structural insights into histone binding and nucleosome assembly by chromatin assembly factor-1: 6660 // *Science*. 2023. T. 381, № 6660. C. eadd8673.

49. Nozawa K., Takizawa Y., Pierrakeas L., Sogawa-Fujiwara C., Saikusa K., Akashi S., Luk E., Kurumizaka H. Cryo-electron microscopy structure of the H3-H4 octasome: A nucleosome-like particle without histones H2A and H2B: 45 // *Proc. Natl. Acad. Sci. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2022. T. 119, № 45. C. e2206542119.

50. Kurumizaka H., Kujirai T., Takizawa Y. Contributions of Histone Variants in Nucleosome Structure and Function // *J. Mol. Biol.* 2021. T. 433, № 6. C. 166678.

51. Bilokapic S., Strauss M., Halic M. Structural rearrangements of the histone octamer translocate DNA // *Nat. Commun. Springer US*, 2018. T. 9, № 1.

52. Sinha K. K., Gross J. D., Narlikar G. J. Distortion of histone octamer core promotes nucleosome mobilization by a chromatin remodeler // *Science*. 2017. T. 355,

№ 6322. C. eaaa3761.

53. Sanulli S., Trnka M. J., Dharmarajan V., Tibble R. W., Pascal B. D., Burlingame A. L., Griffin P. R., Gross J. D., Narlikar G. J. HP1 reshapes nucleosome core to promote phase separation of heterochromatin: 7782 // *Nature*. Nature Publishing Group, 2019. T. 575, № 7782. C. 390–394.
54. Bilokapic S., Strauss M., Halic M. Histone octamer rearranges to adapt to DNA unwrapping // *Nat. Struct. Mol. Biol.* Springer US, 2018. T. 25, № 1. C. 101–108.
55. 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.* 2020. T. 3, № 1. C. 639.
56. Li S., Shu J., Rober J. C., Macklem A., Espiritu D., Debnath T., Tian S., Tian D., Aristizabal M. J., Panchenko A. R. Deciphering Allosteric Modulation of Cancer-Associated Histone Missense Mutations // *J. Mol. Biol.* 2025. C. 169180.
57. Onyema A. C., DiForte C., Patel R., Poget S. F., Loverde S. M. Structural and Thermodynamic Impact of Oncogenic Mutations on the Nucleosome Core Particle. 2025.
58. Millán-Zambrano G., Burton A., Bannister A. J., Schneider R. Histone post-translational modifications — cause and consequence of genome function // *Nat. Rev. Genet.* 2022. T. 23, № 9. C. 563–580.
59. Ding X., Lin X., Zhang B. Stability and folding pathways of tetra-nucleosome from six-dimensional free energy surface // *Nat. Commun.* 2021. T. 12, № 1. C. 1091.
60. Peng Y., Li S., Onufriev A., Landsman D., Panchenko A. R. Binding of regulatory proteins to nucleosomes is modulated by dynamic histone tails: 1 // *Nat. Commun.* Nature Publishing Group, 2021. T. 12, № 1. C. 5280.
61. Shabane P. S., Onufriev A. V. Significant compaction of H4 histone tail upon charge neutralization by acetylation and its mimics, possible effects on chromatin structure // *J. Mol. Biol.* 2021. T. 433, № 6. C. 166683.
62. Oishi T., Hatazawa S., Kujirai T., Kato J., Kobayashi Y., Ogasawara M., Akatsu M., Ehara H., Sekine S., Hayashi G., Takizawa Y., Kurumizaka H. Contributions of histone tail clipping and acetylation in nucleosome transcription by RNA polymerase II

// *Nucleic Acids Res.* 2023. T. 51, № 19. C. 10364–10374.

63. Gibson B. A., Doolittle L. K., Schneider M. W. G., Jensen L. E., Gamarra N., Henry L., Gerlich D. W., Redding S., Rosen M. K. Organization of Chromatin by Intrinsic and Regulated Phase Separation // *Cell*. 2019. T. 179, № 2. C. 470-484.e21.

64. Fillion G. J., Van Bommel J. G., Braunschweig U., Talhout W., Kind J., Ward L. D., Brugman W., De Castro I. J., Kerkhoven R. M., Bussemaker H. J., van Steensel B. Systematic Protein Location Mapping Reveals Five Principal Chromatin Types in *Drosophila* Cells // *Cell*. 2010. T. 143, № 2. C. 212–224.

65. Van Der Velde A., Fan K., Tsuji J., Moore J. E., Purcaro M. J., Pratt H. E., Weng Z. Annotation of chromatin states in 66 complete mouse epigenomes during development // *Commun. Biol.* 2021. T. 4, № 1. C. 239.

66. Merkuri F., Rothstein M., Simoes-Costa M. Histone lactylation couples cellular metabolism with developmental gene regulatory networks // *Nat. Commun.* 2024. T. 15, № 1. C. 90.

67. Al-Kachak A., Maze I. Post-translational modifications of histone proteins by monoamine neurotransmitters // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2023. T. 74. C. 102302.

68. Lehmann K., Felekyan S., Kühnemuth R., Dimura M., Tóth K., Seidel C. A. M., Langowski J. Dynamics of the nucleosomal histone H3 N-terminal tail revealed by high precision single-molecule FRET // *Nucleic Acids Res.* 2020. C. gkz1186.

69. Das S. K., Kumar A., Hao F., Cutter DiPiazza A. R., Fang H., Lee T.-H., Hayes J. J. Histone H3 Tail Modifications Alter Structure and Dynamics of the H1 C-Terminal Domain Within Nucleosomes // *J. Mol. Biol.* 2023. T. 435, № 19. C. 168242.

70. Liu N., Peterson C. L., Hayes J. J. SWI/SNF- and RSC-Catalyzed Nucleosome Mobilization Requires Internal DNA Loop Translocation within Nucleosomes // *Mol. Cell. Biol.* 2011. T. 31, № 20. C. 4165–4175.

71. Talbert P. B., Henikoff S. Histone variants at a glance // *J. Cell Sci.* 2021. T. 134, № 6. C. jcs244749.

72. Fedulova A. S., Armeev G. A., Romanova T. A., Singh-Palchevskaia L., Kosarim N. A., Motorin N. A., Komarova G. A., Shaytan A. K. Molecular dynamics simulations of nucleosomes are coming of age // *WIREs Comput. Mol. Sci.* 2024. T. 14, № 4. C.

e1728.

73. Zhou M., Dai L., Li C., Shi L., Huang Y., Guo Z., Wu F., Zhu P., Zhou Z. Structural basis of nucleosome dynamics modulation by histone variants H2A.B and H2A.Z.2.2 // *EMBO J.* 2021. T. 40, № 1.
74. Peng J., Yuan C., Hua X., Zhang Z. Molecular mechanism of histone variant H2A.B on stability and assembly of nucleosome and chromatin structures // *Epigenetics Chromatin.* 2020. T. 13, № 1. C. 28.
75. Kohestani H., Wereszczynski J. Effects of H2A.B incorporation on nucleosome structures and dynamics // *Biophys. J. Elsevier*, 2021. T. 120, № 8. C. 1498–1509.
76. Kono H., Sakuraba S., Ishida H. Free energy profile for unwrapping outer superhelical turn of CENP-A nucleosome // *Biophys. Physicobiology.* 2019. T. 16, № 0. C. 337–343.
77. Singhpalchevsk L., Shaytan A. K. Diversity of H2A Histones and Their Effect on Nucleosome Structural Properties // *Mosc. Univ. Biol. Sci. Bull.* 2023. T. 78, № 4. C. 212–218.
78. Horikoshi N., Arimura Y., Taguchi H., Kurumizaka H. Crystal structures of heterotypic nucleosomes containing histones H2A.Z and H2A // *Open Biol. The Royal Society*, 2016. T. 6, № 6. C. 160127.
79. Bowerman S., Hickok R. J., Wereszczynski J. Unique Dynamics in Asymmetric macroH2A-H2A Hybrid Nucleosomes Result in Increased Complex Stability // *J. Phys. Chem. B.* 2019. T. 123, № 2. C. 419–427.
80. Colino-Sanguino Y., Clark S. J., Valdes-Mora F. The H2A.Z-nucleosome code in mammals: emerging functions // *Trends Genet. TIG.* 2021. C. S0168-9525(21)00287-0.
81. Hardy S., Jacques P.-É., Gévry N., Forest A., Fortin M.-È., Laflamme L., Gaudreau L., Robert F. The Euchromatic and Heterochromatic Landscapes Are Shaped by Antagonizing Effects of Transcription on H2A.Z Deposition // *PLoS Genet.* / под ред. Lieb J. D. 2009. T. 5, № 10. C. e1000687.
82. Ranjan A., Wang F., Mizuguchi G., Wei D., Huang Y., Wu C. H2A histone-fold and DNA elements in nucleosome activate SWR1-mediated H2A.Z replacement in budding yeast // *eLife.* 2015. T. 4, № JUNE 2015. C. 1–11.

83. Kosarim N. A., Fedulova A. S., Shariafetdinova A. S., Armeev G. A., Shaytan A. K. Molecular Dynamics Simulations of Nucleosomes Containing Histone Variant H2A.J // *Int. J. Mol. Sci.* 2024. T. 25, № 22. C. 12136.
84. Tanaka H., Sato S., Koyama M., Kujirai T., Kurumizaka H. Biochemical and structural analyses of the nucleosome containing human histone H2A.J // *J. Biochem. (Tokyo)*. 2020. T. 167, № 4. C. 419–427.
85. Lai W. K. M., Pugh B. F. Understanding nucleosome dynamics and their links to gene expression and DNA replication // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* Nature Publishing Group, 2017. T. 18, № 9. C. 548–562.
86. Wu C., Wong Y.-C., Elgin S. C. R. The chromatin structure of specific genes: II. Disruption of chromatin structure during gene activity // *Cell*. Elsevier BV, 1979. T. 16, № 4. C. 807–814.
87. Cole H. A., Ocampo J., Iben J. R., Chereji R. V., Clark D. J. Heavy transcription of yeast genes correlates with differential loss of histone H2B relative to H4 and queued RNA polymerases // *Nucleic Acids Res.* 2014. T. 42, № 20. C. 12512–12522.
88. Tan Z. Y., Cai S., Noble A. J., Chen J. K., Shi J., Gan L. Heterogeneous non-canonical nucleosomes predominate in yeast cells in situ // *eLife*. 2023. T. 12. C. RP87672.
89. Chromatin Assembly *In Vitro* with Purified Recombinant ACF and NAP-1 // *Methods in Enzymology*. Elsevier, 2003. C. 499–515.
90. Belotserkovskaya R., Reinberg D. Facts about FACT and transcript elongation through chromatin // *Curr. Opin. Genet. Dev.* Elsevier BV, 2004. T. 14, № 2. C. 139–146.
91. Sauer P. V., Gu Y., Liu W. H., Mattioli F., Panne D., Luger K., Churchill M. E. Mechanistic insights into histone deposition and nucleosome assembly by the chromatin assembly factor-1 // *Nucleic Acids Res.* 2018. T. 46, № 19. C. 9907–9917.
92. Kulaeva O. I., Hsieh F.-K., Chang H.-W., Luse D. S., Studitsky V. M. Mechanism of transcription through a nucleosome by RNA polymerase II // *Biochim. Biophys. Acta*. 2013. T. 1829, № 1. C. 76–83.
93. Tyagi M., Imam N., Verma K., Patel A. K. Chromatin remodelers: We are the

drivers!! // *Nucleus*. 2016. T. 7, № 4. C. 388–404.

94. Zhang W., Feng J., Li Q. The replisome guides nucleosome assembly during DNA replication // *Cell Biosci*. 2020. T. 10, № 1. C. 37.

95. Öztürk M. A., De M., Cojocaru V., Wade R. C. Chromatosome Structure and Dynamics from Molecular Simulations // *Annu. Rev. Phys. Chem.* 2020. T. 71. C. 101–119.

96. Chang H.-W., Pandey M., Kulaeva O. I., Patel S. S., Studitsky V. M. Overcoming a nucleosomal barrier to replication // *Sci. Adv.* 2016. T. 2, № 11. C. e1601865.

97. Chang H.-W., Kulaeva O. I., Shaytan A. K., Kibanov M., Kuznedelov K., Severinov K. V., Kirpichnikov M. P., Clark D. J., Studitsky V. M. Analysis of the mechanism of nucleosome survival during transcription // *Nucleic Acids Res.* 2014. T. 42, № 3. C. 1619–1627.

98. Böhm V., Hieb A. R., Andrews A. J., Gansen A., Rocker A., Tóth K., Luger K., Langowski J. Nucleosome accessibility governed by the dimer/tetramer interface // *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press, 2011. T. 39, № 8. C. 3093–3102.

99. Hsieh F.-K., Kulaeva O. I., Patel S. S., Dyer P. N., Luger K., Reinberg D., Studitsky V. M. Histone chaperone FACT action during transcription through chromatin by RNA polymerase II // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013. T. 110, № 19. C. 7654–7659.

100. Ordu O., Lusser A., Dekker N. H. DNA Sequence Is a Major Determinant of Tetrasome Dynamics // *Biophys. J.* 2019. T. 117, № 11. C. 2217–2227.

101. Sheinin M. Y., Li M., Soltani M., Luger K., Wang M. D. Torque modulates nucleosome stability and facilitates H2A/H2B dimer loss // *Nat. Commun.* Springer Science and Business Media LLC, 2013. T. 4, № 1.

102. Read C. M., Baldwin J. P., Crane-Robinson C. Structure of subnucleosomal particles. Tetrameric (H3/H4)₂ 146 base pair DNA and hexameric (H3/H4)₂(H2A/H2B)₁ 146 base pair DNA complexes // *Biochemistry.* American Chemical Society (ACS), 1985. T. 24, № 16. C. 4435–4450.

103. Dong F., Van Holde K. E. Nucleosome positioning is determined by the (H3-H4)₂ tetramer. // *Proc. Natl. Acad. Sci. Proceedings of the National Academy of Sciences,*

1991. T. 88, № 23. C. 10596–10600.

104. Banks D. D., Gloss L. M. Equilibrium Folding of the Core Histones: the H3–H4 Tetramer Is Less Stable than the H2A–H2B Dimer // *Biochemistry*. American Chemical Society (ACS), 2003. T. 42, № 22. C. 6827–6839.

105. Bowman A., Ward R., El-Mkami H., Owen-Hughes T., Norman D. G. Probing the (H3-H4) 2 histone tetramer structure using pulsed EPR spectroscopy combined with site-directed spin labelling // *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press (OUP), 2010. T. 38, № 2. C. 695–707.

106. Rychkov G. N., Ilatovskiy A. V., Nazarov I. B., Shvetsov A. V., Lebedev D. V., Konev A. Y., Isaev-Ivanov V. V., Onufriev A. V. Partially Assembled Nucleosome Structures at Atomic Detail // *Biophys. J.* 2017/01/01 изд. Biophysical Society, 2017. T. 112, № 3. C. 460–472.

107. 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 Res.* 2021. T. 49, № 8. C. 4750–4767.

108. Portillo-Ledesma S., Li Z., Schlick T. Genome modeling: From chromatin fibers to genes // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2023. T. 78. C. 102506.

109. Jung J., Nishima W., Daniels M., Bascom G., Kobayashi C., Adedoyin A., Wall M., Lappala A., Phillips D., Fischer W., Tung C.-S., Schlick T., Sugita Y., Sanbonmatsu K. Y. Scaling molecular dynamics beyond 100,000 processor cores for large-scale biophysical simulations // *J. Comput. Chem.* 2019. T. 40, № 21. C. 1919–1930.

110. Woods D. C., Wereszczynski J. Elucidating the influence of linker histone variants on chromatosome dynamics and energetics // *Nucleic Acids Res.* 2020. T. 48, № 7. C. 3591–3604.

111. Brandani G. B., Tan C., Takada S. The kinetic landscape of nucleosome assembly: A coarse-grained molecular dynamics study // *PLOS Comput. Biol.* / под ред. Micheletti C. 2021. T. 17, № 7. C. e1009253.

112. Lequieu J., Schwartz D. C., de Pablo J. J. In silico evidence for sequence-dependent nucleosome sliding // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2017. T. 114, № 44. C. E9197–E9205.

113. Huertas J., Woods E. J., Collepardo-Guevara R. Multiscale modelling of chromatin organisation: Resolving nucleosomes at near-atomistic resolution inside genes // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2022. T. 75. C. 102067.
114. Rahman A. Correlations in the Motion of Atoms in Liquid Argon // *Phys. Rev. American Physical Society*, 1964. T. 136, № 2A. C. A405–A411.
115. Abriata L. A., Dal Peraro M. Assessment of transferable forcefields for protein simulations attests improved description of disordered states and secondary structure propensities, and hints at multi-protein systems as the next challenge for optimization // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2021. T. 19. C. 2626–2636.
116. CHARMM : The Energy Function and Its Parameterization // *Encyclopedia of Computational Chemistry*. 1-е изд. Wiley, 1998.
117. Uversky V. N., Oldfield C. J., Dunker A. K. Intrinsically Disordered Proteins in Human Diseases: Introducing the D² Concept // *Annu. Rev. Biophys.* 2008. T. 37, № 1. C. 215–246.
118. Cornell W. D., Cieplak P., Bayly C. I., Gould I. R., Merz K. M., Ferguson D. M., Spellmeyer D. C., Fox T., Caldwell J. W., Kollman P. A. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules // *J. Am. Chem. Soc.* 1995. T. 117, № 19. C. 5179–5197.
119. D.A. Case, H.M. Aktulga, K. Belfon, I.Y. Ben-Shalom, J.T. Berryman, S.R. Brozell, F.S. Carvalho, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, G.A. Cisneros, V.W.D. Cruzeiro, T.A. Darden, N. Forouzes, M. Ghazimirsaeed, G. Giambasu, T. Giese, M.K. Gilson, H. Gohlke, A.W. Goetz, J. Harris, Z. Huang, S. Izadi, S.A. Izmailov, K., Kasavajhala, M.C. Kaymak, I. Kolosvary, A. Kovalenko, T. Kurtzman, T.S. Lee, P. Li, Z. Li, C. Lin, J. Liu, T. Luchko, R. Luo, M. Machado, M. Manathunga, K.M. Merz, Y. Miao, O. Mikhailovskii, G. Monard, H., Nguyen, K.A. O’Hearn, A. Onufriev, F. Pan, S. Pantano, A. Rahnamoun, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, S. Schott-Verdugo, A. Shajan, J. Shen, C.L. Simmerling, N.R. Skrynnikov, J. Smith, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, J. Wang, X. Wu, Y. Wu, Y. Xiong, Y. Xue, D.M. York, C. Zhao, Q. Zhu, and P.A. Kollman. Amber 2025. University of California, San Francisco, 2025.
120. 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. T. 60, № 12. C. 6480–6487.

121. Tian C., Kasavajhala K., Belfon K. A. A., Raguette L., Huang H., Miguez 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. T. 16, № 1. C. 528–552.

122. Huang J., Rauscher S., Nawrocki G., Ran T., Feig M., de Groot B. L., Grubmüller H., MacKerell A. D. CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins // *Nat. Methods.* 2017. T. 14, № 1. C. 71–73.

123. Song D., Luo R., Chen H.-F. The IDP-Specific Force Field *ff14IDPSFF* Improves the Conformer Sampling of Intrinsically Disordered Proteins // *J. Chem. Inf. Model.* 2017. T. 57, № 5. C. 1166–1178.

124. 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. American Chemical Society*, 2015. T. 119, № 16. C. 5113–5123.

125. Shabane P. S., Izadi S., Onufriev A. V. General Purpose Water Model Can Improve Atomistic Simulations of Intrinsically Disordered Proteins // *J. Chem. Theory Comput. American Chemical Society*, 2019. T. 15, № 4. C. 2620–2634.

126. Yoo J., Aksimentiev A. New tricks for old dogs: improving the accuracy of biomolecular force fields by pair-specific corrections to non-bonded interactions // *Phys. Chem. Chem. Phys. The Royal Society of Chemistry*, 2018. T. 20, № 13. C. 8432–8449.

127. Lebedenko O. O., Salikov V. A., Izmailov S. A., Podkorytov I. S., Skrynnikov N. R. Using NMR diffusion data to validate MD models of disordered proteins: Test case of N-terminal tail of histone H4 // *Biophys. J.* 2024. T. 123, № 1. C. 80–100.

128. Sun W., Lebedenko O. O., Salguero N. G., Shannon M. D., Zandian M., Poirier M. G., Skrynnikov N. R., Jaroniec C. P. Conformational and Interaction Landscape of Histone H4 Tails in Nucleosomes Probed by Paramagnetic NMR Spectroscopy // *J. Am. Chem. Soc.* 2023. T. 145, № 46. C. 25478–25485.

129. Sarthak K., Winogradoff D., Ge Y., Myong S., Aksimentiev A. Benchmarking

Molecular Dynamics Force Fields for All-Atom Simulations of Biological Condensates // *J. Chem. Theory Comput.* 2023. T. 19, № 12. C. 3721–3740.

130. Love O., Galindo-Murillo R., Zgarbová M., Šponer J., Jurečka P., Cheatham T. E. Assessing the Current State of Amber Force Field Modifications for DNA—2023 Edition // *J. Chem. Theory Comput.* 2023. T. 19, № 13. C. 4299–4307.

131. Pérez A., Marchán I., Svozil D., Sponer J., Cheatham T. E., Laughton C. A., Orozco M. Refinement of the AMBER Force Field for Nucleic Acids: Improving the Description of α/γ Conformers // *Biophys. J.* 2007. T. 92, № 11. C. 3817–3829.

132. Ivani I., Dans P. D., Noy A., Pérez A., Faustino I., Hospital A., Walther J., Andrio P., Goñi R., Balaceanu A., Portella G., Battistini F., Gelpí J. L., González C., Vendruscolo M., Laughton C. A., Harris S. A., Case D. A., Orozco M. Parmbsc1: a refined force field for DNA simulations // *Nat. Methods.* Nature Publishing Group, 2016. T. 13, № 1. C. 55–58.

133. Zgarbová M., Šponer J., Otyepka M., Cheatham T. E., Galindo-Murillo R., Jurečka P. Refinement of the Sugar–Phosphate Backbone Torsion Beta for AMBER Force Fields Improves the Description of Z- and B-DNA // *J. Chem. Theory Comput.* 2015. T. 11, № 12. C. 5723–5736.

134. Zgarbová M., Šponer J., Jurečka P. Z-DNA as a Touchstone for Additive Empirical Force Fields and a Refinement of the Alpha/Gamma DNA Torsions for AMBER // *J. Chem. Theory Comput.* 2021. T. 17, № 10. C. 6292–6301.

135. Liebl K., Zacharias M. Tumuc1: A New Accurate DNA Force Field Consistent with High-Level Quantum Chemistry // *J. Chem. Theory Comput.* 2021. T. 17, № 11. C. 7096–7105.

136. Strelnikov I. A., Kovaleva N. A., Klinov A. P., Zubova E. A. C–B–A Test of DNA Force Fields // *ACS Omega.* 2023. T. 8, № 11. C. 10253–10265.

137. Dans P. D., Balaceanu A., Pasi M., Patelli A. S., Petkevičiūtė D., Walther J., Hospital A., Bayarri G., Lavery R., Maddocks J. H., Orozco M. The static and dynamic structural heterogeneities of B-DNA: extending Calladine–Dickerson rules // *Nucleic Acids Res. Oxford Academic*, 2019. T. 47, № 21. C. 11090–11102.

138. Ehrlich L., Mükkel C., Chirico G., Langowski J. A Brownian dynamics model for

the chromatin fiber // *Bioinformatics*. 1997. T. 13, № 3. C. 271–279.

139. Beard D. A., Schlick T. Computational Modeling Predicts the Structure and Dynamics of Chromatin Fiber // *Structure*. 2001. T. 9, № 2. C. 105–114.

140. Schlick T., Perišić O. Mesoscale simulations of two nucleosome-repeat length oligonucleosomes // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2009. T. 11, № 45. C. 10729.

141. Sharma S., Ding F., Dokholyan N. V. Multiscale Modeling of Nucleosome Dynamics // *Biophys. J.* 2007. T. 92, № 5. C. 1457–1470.

142. Korolev N., Lyubartsev A. P., Nordenskiöld L. Computer Modeling Demonstrates that Electrostatic Attraction of Nucleosomal DNA is Mediated by Histone Tails // *Biophys. J.* 2006. T. 90, № 12. C. 4305–4316.

143. Yang Y., Lyubartsev A. P., Korolev N., Nordenskiöld L. Computer Modeling Reveals that Modifications of the Histone Tail Charges Define Salt-Dependent Interaction of the Nucleosome Core Particles // *Biophys. J.* 2009. T. 96, № 6. C. 2082–2094.

144. Li W., Dou S.-X., Xie P., Wang P.-Y. Brownian dynamics simulation of directional sliding of histone octamers caused by DNA bending // *Phys. Rev. E*. 2006. T. 73, № 5. C. 051909.

145. Voltz K., Trylska J., Tozzini V., Kurkal-Siebert V., Langowski J., Smith J. Coarse-grained force field for the nucleosome from self-consistent multiscaling // *J. Comput. Chem.* 2008. T. 29, № 9. C. 1429–1439.

146. Wocjan T., Klenin K., Langowski J. Brownian Dynamics Simulation of DNA Unrolling from the Nucleosome // *J. Phys. Chem. B*. 2009. T. 113, № 9. C. 2639–2646.

147. Bishop T. C. Molecular Dynamics Simulations of a Nucleosome and Free DNA // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2005. T. 22, № 6. C. 673–685.

148. Ponomarev S. Y., Putkaradze V., Bishop T. C. Relaxation dynamics of nucleosomal DNA // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2009. T. 11, № 45. C. 10633.

149. Ruscio J. Z., Onufriev A. A Computational Study of Nucleosomal DNA Flexibility // *Biophys. J.* 2006. T. 91, № 11. C. 4121–4132.

150. Roccatano D., Barthel A., Zacharias M. Structural flexibility of the nucleosome core particle at atomic resolution studied by molecular dynamics simulation //

Biopolymers. 2007. T. 85, № 5–6. C. 407–421.

151. Materese C. K., Savelyev A., Papoian G. A. Counterion atmosphere and hydration patterns near a nucleosome core particle // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. T. 131, № 41. C. 15005–15013.

152. Huertas J., Cojocaru V. Breaths, Twists, and Turns of Atomistic Nucleosomes // *J. Mol. Biol.* 2020. C. 166744.

153. Niina T., Brandani G. B., Tan C., Takada S. Sequence-dependent nucleosome sliding in rotation-coupled and uncoupled modes revealed by molecular simulations // *PLOS Comput. Biol.* 2017. T. 13, № 12. C. e1005880.

154. Park S., Brandani G. B., Ha T., Bowman G. D. Bi-directional nucleosome sliding by the Chd1 chromatin remodeler integrates intrinsic sequence-dependent and ATP-dependent nucleosome positioning // *Nucleic Acids Res.* 2023. T. 51, № 19. C. 10326–10343.

155. Wu H., Dalal Y., Papoian G. A. Binding Dynamics of Disordered Linker Histone H1 with a Nucleosomal Particle // *J. Mol. Biol.* 2021. T. 433, № 6. C. 166881.

156. Brandner A., Schüller A., Melo F., Pantano S. Exploring DNA dynamics within oligonucleosomes with coarse-grained simulations: SIRAH force field extension for protein-DNA complexes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018. T. 498, № 2. C. 319–326.

157. Bae S., Oh I., Yoo J., Kim J. S. Effect of DNA Flexibility on Complex Formation of a Cationic Nanoparticle with Double-Stranded DNA // *ACS Omega.* 2021. T. 6, № 29. C. 18728–18736.

158. Lee E. H., Hsin J., Sotomayor M., Comellas G., Schulten K. Discovery Through the Computational Microscope // *Structure.* 2009. T. 17, № 10. C. 1295–1306.

159. Sinha S., Pindi C., Ahsan M., Arantes P. R., Palermo G. Machines on Genes through the Computational Microscope // *J. Chem. Theory Comput.* 2023. T. 19, № 7. C. 1945–1964.

160. Polach K. J., Widom J. Mechanism of Protein Access to Specific DNA Sequences in Chromatin: A Dynamic Equilibrium Model for Gene Regulation // *J. Mol. Biol.* 1995. T. 254, № 2. C. 130–149.

161. Li G., Levitus M., Bustamante C., Widom J. Rapid spontaneous accessibility of nucleosomal DNA // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004/12/08 изд. 2005. Т. 12, № 1. С. 46–53.
162. Luger K. Dynamic nucleosomes // *Chromosome Res.* 2006. Т. 14, № 1. С. 5–16.
163. Gansen A., Felekyan S., Kühnemuth R., Lehmann K., Tóth K., Seidel C. A. M., Langowski J. High precision FRET studies reveal reversible transitions in nucleosomes between microseconds and minutes // *Nat. Commun.* 2018. Т. 9, № 1. С. 1–13.
164. Brandani G. B., Gopi S., Yamauchi M., Takada S. Molecular dynamics simulations for the study of chromatin biology // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2022. Т. 77. С. 102485.
165. Kono H., Sakuraba S., Ishida H. Free energy profiles for unwrapping the outer superhelical turn of nucleosomal DNA // *PLOS Comput. Biol.* / под ред. Panchenko A. R. R. 2018. Т. 14, № 3. С. e1006024.
166. Chien F.-T., Van Noort J. 10 Years of Tension on Chromatin: Results from Single Molecule Force Spectroscopy // *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2009. Т. 10, № 5. С. 474–485.
167. Ishida H., Kono H. Torsional stress can regulate the unwrapping of two outer half superhelical turns of nucleosomal DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2021. Т. 118, № 7. С. e2020452118.
168. Huertas J., Schöler H. R., Cojocaru V. Histone tails cooperate to control the breathing of genomic nucleosomes // *PLOS Comput. Biol.* / под ред. MacKerell A. 2021. Т. 17, № 6. С. e1009013.
169. Winogradoff D., Aksimentiev A. Molecular Mechanism of Spontaneous Nucleosome Unraveling // *J. Mol. Biol.* 2019. Т. 431, № 2. С. 323–335.
170. Li S., Peng Y., Landsman D., Panchenko A. R. DNA methylation cues in nucleosome geometry, stability and unwrapping // *Nucleic Acids Res.* 2022. Т. 50, № 4. С. 1864–1874.
171. Becker P. B. Nucleosome sliding: facts and fiction // *EMBO J.* 2002. Т. 21, № 18. С. 4749–4753.
172. Mueller-Planitz F., Klinker H., Becker P. B. Nucleosome sliding mechanisms: new twists in a looped history // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013/09/07 изд. 2013. Т. 20, №

9. C. 1026–1032.

173. Clapier C. R., Iwasa J., Cairns B. R., Peterson C. L. Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017. T. 18, № 7. C. 407–422.

174. Flaus A., Owen-Hughes T. Dynamic Properties of Nucleosomes during Thermal and ATP-Driven Mobilization // *Mol. Cell. Biol.* 2003. T. 23, № 21. C. 7767–7779.

175. Saha A., Wittmeyer J., Cairns B. R. Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006. T. 7, № 6. C. 437–447.

176. Bowman G. D., Deindl S. Remodeling the genome with DNA twists // *Science.* 2019. T. 366, № 6461. C. 35–36.

177. Lorch Y., Davis B., Kornberg R. D. Chromatin remodeling by DNA bending, not twisting // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005. T. 102, № 5. C. 1329–1332.

178. Brandani G. B., Takada S. Chromatin remodelers couple inchworm motion with twist-defect formation to slide nucleosomal DNA // *PLoS Comput. Biol. Public Library of Science*, 2018. T. 14, № 11. C. e1006512.

179. Brandani G. B., Niina T., Tan C., Takada S. DNA sliding in nucleosomes via twist defect propagation revealed by molecular simulations // *Nucleic Acids Res.* 2018. T. 46, № 6. C. 2788–2801.

180. Chakraborty K., Kang M., Loverde S. M. Molecular Mechanism for the Role of the H2A and H2B Histone Tails in Nucleosome Repositioning // *J. Phys. Chem. B. American Chemical Society*, 2018. T. 122, № 50. C. 11827–11840.

181. Berman H. M. *The Protein Data Bank* // *Nucleic Acids Res. Oxford University Press (OUP)*, 2000. T. 28, № 1. C. 235–242.

182. Webb B., Sali A. *Protein Structure Modeling with MODELLER* // *Protein Structure Prediction* / под ред. Kihara D. New York, NY: Springer New York, 2014. C. 1–15.

183. 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. T. 1–2. C. 19–25.

184. 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.* American Chemical Society, 2015. T. 11, № 8. C. 3696–3713.
185. Jorgensen W. L., Chandrasekhar J., Madura J. D., Impey R. W., Klein M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water // *J. Chem. Phys.* 1983. T. 79, № 2. C. 926–935.
186. Joung I. S., Cheatham T. E. Determination of Alkali and Halide Monovalent Ion Parameters for Use in Explicitly Solvated Biomolecular Simulations // *J. Phys. Chem. B.* American Chemical Society (ACS), 2008. T. 112, № 30. C. 9020–9041.
187. Bussi G., Donadio D., Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling // *J. Chem. Phys.* American Institute of Physics, 2007. T. 126, № 1. C. 014101.
188. Parrinello M., Rahman A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method // *J. Appl. Phys.* American Institute of Physics, 1981. T. 52, № 12. C. 7182–7190.
189. Voevodin V. V., Antonov A. S., Nikitenko D. A., Shvets P. A., Sobolev S. I., Sidorov I. Y., Stefanov K. S., Voevodin V. V., Zhumatiy S. A. Supercomputer Lomonosov-2: Large Scale, Deep Monitoring and Fine Analytics for the User Community: 2 // *Supercomput. Front. Innov.* 2019. T. 6, № 2. C. 4–11.
190. Lu X.-J., Olson W. K. 3DNA: a software package for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic acid structures // *Nucleic Acids Res.* 2003. T. 31, № 17. C. 5108–5121.
191. Kato H., Jiang J., Zhou B.-R., Rozendaal M., Feng H., Ghirlando R., Xiao T. S., Straight A. F., Bai Y. A conserved mechanism for centromeric nucleosome recognition by centromere protein CENP-C // *Science*. 2013/06/01 изд. 2013. T. 340, № 6136. C. 1110–1113.
192. Schrodinger. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8. 2015.
193. Ef P., Td G., Cc H., Gs C., Dm G., Ec M., Te F. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis [Электронный ресурс] // *Journal of computational chemistry.* *J Comput Chem*, 2004. T. 25, № 13. URL:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15264254/> (дата обращения: 10.09.2020).

194. Wakamori M., Fujii Y., Suka N., Shirouzu M., Sakamoto K., Umehara T., Yokoyama S. Intra- and inter-nucleosomal interactions of the histone H4 tail revealed with a human nucleosome core particle with genetically-incorporated H4 tetra-acetylation // *Sci. Rep.* 2015. T. 5, № 1. C. 17204.

195. Berendsen H. J. C., Postma J. P. M., van Gunsteren W. F., DiNola A., Haak J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath // *J. Chem. Phys.* 1984. T. 81, № 8. C. 3684–3690.

196. Gowers R. J., Linke M., Barnoud J., Reddy T. J. E., Melo M. N., Seyler S. L., Domański J., Dotson D. L., Buchoux S., Kenney I. M., Beckstein O. MDAAnalysis: A Python Package for the Rapid Analysis of Molecular Dynamics Simulations // *Proc. 15th Python Sci. Conf.* 2016. C. 98–105.

197. Myers-Turnbull D., Bliven S. E., Rose P. W., Aziz Z. K., Youkharibache P., Bourne P. E., Prlić A. Systematic Detection of Internal Symmetry in Proteins Using CE-Symm // *J. Mol. Biol.* 2014. T. 426, № 11. C. 2255–2268.

198. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: visual molecular dynamics // *J. Mol. Graph.* 1996. T. 14, № 1. C. 33–38, 27–28.

199. Nguyen H., Case D. A., Rose A. S. NGLview—interactive molecular graphics for Jupyter notebooks // *Bioinformatics* / под ред. Valencia A. 2018. T. 34, № 7. C. 1241–1242.

200. Kabsch W., Sander C. Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features // *Biopolymers.* 1983. T. 22, № 12. C. 2577–2637.

201. Skrajna A., Goldfarb D., Kedziora K. M., Cousins E. M., Grant G. D., Spangler C. J., Barbour E. H., Yan X., Hathaway N. A., Brown N. G., Cook J. G., Major M. B., McGinty R. K. Comprehensive nucleosome interactome screen establishes fundamental principles of nucleosome binding // *Nucleic Acids Res.* 2020. T. 48, № 17. C. 9415–9432.

202. 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: 20 // *Int. J. Mol. Sci. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 2023. T. 24, № 20. C. 15194.

203. Iwasaki W., Miya Y., Horikoshi N., Osakabe A., Taguchi H., Tachiwana H., Shibata T., Kagawa W., Kurumizaka H. Contribution of histone N-terminal tails to the structure and stability of nucleosomes // *FEBS Open Bio*. 2013. T. 3. C. 363–369.

204. Ferreira H., Somers J., Webster R., Flaus A., Owen-Hughes T. Histone Tails and the H3 α N Helix Regulate Nucleosome Mobility and Stability // *Mol. Cell. Biol*. 2007. T. 27, № 11. C. 4037–4048.

205. Li Z., Kono H. Distinct Roles of Histone H3 and H2A Tails in Nucleosome Stability // *Sci. Rep*. 2016. T. 6, № 1. C. 31437.

206. De Bruin L., Tompitak M., Eslami-Mossallam B., Schiessel H. Why Do Nucleosomes Unwrap Asymmetrically? // *J. Phys. Chem. B*. 2016. T. 120, № 26. C. 5855–5863.

207. Ngo T. T. M., Zhang Q., Zhou R., Yodh J. G., Ha T. Asymmetric Unwrapping of Nucleosomes under Tension Directed by DNA Local Flexibility // *Cell*. Elsevier, 2015. T. 160, № 6. C. 1135–1144.

208. Bednar J., Furrer P., Katritch V., Stasiak A., Dubochet J., Stasiak A. Determination of DNA Persistence Length by Cryo-electron Microscopy. Separation of the Static and Dynamic Contributions to the Apparent Persistence Length of DNA // *J. Mol. Biol*. 1995. T. 254, № 4. C. 579–594.

209. Lowary P. T., Widom J. New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning // *J. Mol. Biol*. 1998. T. 276, № 1. C. 19–42.

210. Li S., Wei T., Panchenko A. R. Histone variant H2A.Z modulates nucleosome dynamics to promote DNA accessibility: 1 // *Nat. Commun. Nature Publishing Group*, 2023. T. 14, № 1. C. 769.

211. Khatua P., Tang P. K., Ghosh Moulick A., Patel R., Manandhar A., Loverde S. M.

Sequence Dependence in Nucleosome Dynamics // *J. Phys. Chem. B. American Chemical Society (ACS)*, 2024. T. 128, № 13. C. 3090–3101.

212. Natsume R., Eitoku M., Akai Y., Sano N., Horikoshi M., Senda T. Structure and function of the histone chaperone CIA/ASF1 complexed with histones H3 and H4 // *Nature*. 2007. T. 446, № 7133. C. 338–341.

213. Shaytan A. K., Landsman D., Panchenko A. R. Nucleosome adaptability conferred by sequence and structural variations in histone H2A-H2B dimers // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2015/03/04 изд. 2015. T. 32. C. 48–57.

214. Kniazeva A. S., Armeev G. A., Shaytan A. K. H2A-H2B Histone Dimer Plasticity and Its Functional Implications // *Cells*. 2022. T. 11, № 18. C. 2837.

215. Fenley A. T., Anandakrishnan R., Kidane Y. H., Onufriev A. V. Modulation of nucleosomal DNA accessibility via charge-altering post-translational modifications in histone core // *Epigenetics Chromatin. BioMed Central*, 2018. T. 11, № 1. C. 11.

216. Sueoka T., Hayashi G., Okamoto A. Regulation of the Stability of the Histone H2A–H2B Dimer by H2A Tyr57 Phosphorylation // *Biochemistry*. 2017. T. 56, № 36. C. 4767–4772.

217. Wei S., Falk S. J., Black B. E., Lee T.-H. A novel hybrid single molecule approach reveals spontaneous DNA motion in the nucleosome // *Nucleic Acids Res.* 2015. T. 43, № 17. C. e111.

218. Chakravarthy S., Patel A., Bowman G. D. The basic linker of macroH2A stabilizes DNA at the entry/exit site of the nucleosome // *Nucleic Acids Res.* 2012. T. 40, № 17. C. 8285–8295.

219. Chakravarthy S., Luger K. The Histone Variant Macro-H2A Preferentially Forms «Hybrid Nucleosomes» // *J. Biol. Chem. Elsevier BV*, 2006. T. 281, № 35. C. 25522–25531.

220. Bowerman S., Wereszczynski J. Effects of MacroH2A and H2A.Z on Nucleosome Dynamics as Elucidated by Molecular Dynamics Simulations // *Biophys. J. Biophysical Society*, 2016. T. 110, № 2. C. 327–337.

221. Bhattacharya S., Reddy D., Jani V., Gadewal N., Shah S., Reddy R., Bose K., Sonavane U., Joshi R., Gupta S. Histone isoform H2A1H promotes attainment of

- distinct physiological states by altering chromatin dynamics // *Epigenetics Chromatin*. BioMed Central, 2017. T. 10, № 1. C. 1–19.
222. Frouws T. D., Barth P. D., Richmond T. J. Site-Specific Disulfide Crosslinked Nucleosomes with Enhanced Stability // *J. Mol. Biol.* 2018. T. 430, № 1. C. 45–57.
223. Lewis T. S., Sokolova V., Jung H., Ng H., Tan D. Structural basis of chromatin regulation by histone variant H2A.Z // *Nucleic Acids Res.* 2021. T. 49, № 19. C. 11379–11391.
224. Sato S., Takizawa Y., Hoshikawa F., Dacher M., Tanaka H., Tachiwana H., Kujirai T., Iikura Y., Ho C.-H., Adachi N., Patwal I., Flaus A., Kurumizaka H. Cryo-EM structure of the nucleosome core particle containing *Giardia lamblia* histones // *Nucleic Acids Res.* 2021. T. 49, № 15. C. 8934–8946.
225. Shi X., Fedulova A. S., Kotova E. Y., Maluchenko N. V., Armeev G. A., Chen Q., Prasanna C., Sivkina A. L., Feofanov A. V., Kirpichnikov M. P., Nordensköld L., Shaytan A. K., Studitsky V. M. Histone tetrasome dynamics affects chromatin transcription // *Nucleic Acids Res.* 2025. T. 53, № 8. C. gkaf356.
226. Nizovtseva E. V., Clauvelin N., Todolli S., Polikanov Y. S., Kulaeva O. I., Wengrzynek S., Olson W. K., Studitsky V. M. Nucleosome-free DNA regions differentially affect distant communication in chromatin // *Nucleic Acids Res.* 2017. T. 45, № 6. C. 3059–3067.
227. Shi X. Unveiling structural and dynamical features of chromatin using NMR spectroscopy // *Magn. Reson. Lett.* 2024. C. 200153.
228. Nurse N. P., Jimenez-Useche I., Smith I. T., Yuan C. Clipping of flexible tails of histones H3 and H4 affects the structure and dynamics of the nucleosome // *Biophys J.* 2013. T. 104, № 5. C. 1081–1088.
229. Wang J. C. DNA topoisomerases: why so many? // *J. Biol. Chem.* 1991. T. 266, № 11. C. 6659–6662.
230. Segura J., Joshi R. S., Díaz-Ingelmo O., Valdés A., Dyson S., Martínez-García B., Roca J. Intracellular nucleosomes constrain a DNA linking number difference of -1.26 that reconciles the Lk paradox // *Nat. Commun.* Springer Science and Business Media LLC, 2018. T. 9, № 1.

231. Hamiche A., Carot V., Alilat M., De Lucia F., O'Donohue M. F., Revet B., Prunell A. Interaction of the histone (H3-H4)₂ tetramer of the nucleosome with positively supercoiled DNA minicircles: Potential flipping of the protein from a left- to a right-handed superhelical form.: 15 // Proc. Natl. Acad. Sci. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. T. 93, № 15. C. 7588–7593.
232. Peterson S., Danowitz R., Wunsch A., Jackson V. NAP1 Catalyzes the Formation of either Positive or Negative Supercoils on DNA on Basis of the Dimer–Tetramer Equilibrium of Histones H3/H4 // Biochemistry. 2007. T. 46, № 29. C. 8634–8646.
233. Vlijm R., Lee M., Lipfert J., Lusser A., Dekker C., Dekker N. H. Nucleosome Assembly Dynamics Involve Spontaneous Fluctuations in the Handedness of Tetrasomes // Cell Rep. 2015. T. 10, № 2. C. 216–225.
234. Hamiche A., Richard-Foy H. The Switch in the Helical Handedness of the Histone (H3-H4)₂ Tetramer within a Nucleoprotein Particle Requires a Reorientation of the H3-H3 Interface // J. Biol. Chem. 1998. T. 273, № 15. C. 9261–9269.
235. Ordu O., Kremser L., Lusser A., Dekker N. H. Modification of the histone tetramer at the H3-H3 interface impacts tetrasome conformations and dynamics // J. Chem. Phys. 2018. T. 148, № 12. C. 123323.
236. Nizovtseva E. V., Todolli S., Olson W. K., Studitsky V. M. Towards quantitative analysis of gene regulation by enhancers // Epigenomics. 2017. T. 9, № 9. C. 1219–1231.
237. Cui F., Zhurkin V. B. Structure-based analysis of DNA sequence patterns guiding nucleosome positioning *in vitro* // J. Biomol. Struct. Dyn. England, 2010. T. 27, № 6. C. 821–841.
238. Ohtomo H., Kurita J., Sakuraba S., Li Z., Arimura Y., Wakamori M., Tsunaka Y., Umehara T., Kurumizaka H., Kono H., Nishimura Y. The N-terminal Tails of Histones H2A and H2B Adopt Two Distinct Conformations in the Nucleosome with Contact and Reduced Contact to DNA // J. Mol. Biol. 2021. T. 433, № 15. C. 167110.
239. Patel R., Loverde S. M. Unveiling the Conformational Dynamics of the Histone Tails Using Markov State Modeling // J. Chem. Theory Comput. 2025. T. 21, № 9. C. 4921–4938.