

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

АРМЕЕВ ГРИГОРИЙ АЛЕКСЕЕВИЧ

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

Специальность 03.01.09
«Математическая биология, биоинформатика»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2018

Работа выполнена на кафедре биоинженерии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Научные руководители: **Шайтан Алексей Константинович**
кандидат физико-математических наук
Шайтан Константин Вольдемарович
доктор физико-математических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Головин Андрей Викторович

доктор химических наук, профессор факультета биоинженерии и биоинформатики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Балабаев Николай Кириллович

кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник Института математических проблем биологии РАН — филиала Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт прикладной математики им. М.В. Келдыша Российской академии наук»

Ефремов Роман Гербертович

доктор физико-математических наук, профессор, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук»

Защита диссертации состоится «__» декабря 2018 г. в 14-00 часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.02 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 24, МГУ, биологический факультет, кафедра биофизики, аудитория «Новая».

E-mail: maristra@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/152610928/>

Автореферат разослан «__» ноября 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



М.Г. Страховская

Общая характеристика работы

Диссертационная работа посвящена моделированию структуры нуклеосом и их комплексов с белками хроматина методами молекулярного моделирования. В работе произведено описание структуры и конформационной динамики нуклеосом, приведено описание разработанных в ходе диссертации методов молекулярного моделирования нуклеосом и обработки экспериментальных данных об эффективности Ферстеровского резонансного переноса энергии и профилей интенсивности перекисного расщепления ДНК. В работе описаны особенности структуры и конформационной динамики нуклеосом, исследованные методом молекулярной динамики. Предложены оригинальные методы молекулярного моделирования для изучения структуры и динамики нуклеосом на основании экспериментальных данных. Предложен метод поиска нуклеотидных последовательностей, удовлетворяющих конформации ДНК в комплексах нуклеосом с белками хроматина. Разработанные методы применены для построения моделей комплекса нуклеосомы с линкерным гистоном, компактных динуклеосом, нуклеосом с гистоновым вариантом CenH3, а также предложены модели разворачивания нуклеосом гистоновым шапероном FACS.

Актуальность работы

Нуклеосомы являются основным структурным элементом хроматина и отвечают не только за компактизацию, но и за регуляцию процессов транскрипции, репарации и репликации ДНК. Нуклеосомы - весьма переменные объекты, их состав может значительно различаться, гистоны могут подвергаться посттрансляционным модификациям. Гистоны одного типа могут иметь значительные различия в последовательности и длине, такие подтипы называют гистоновыми вариантами. Разнообразие гистонов при их высокой консервативности свидетельствует о высокой функциональной значимости различных гистоновых вариантов. Изменение гистонового состава нуклеосом, связывание с белками хроматина изменяет не только структуру нуклеосом, но и их динамические свойства, которые во многом определяют компактизацию и доступность хроматина для взаимодействий с белками ядра клетки.

Понимание молекулярных основ функционирования хроматина затруднено в связи с ограниченностью экспериментальных методик в определении параметров

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

Так как прямое изучение структуры и динамики крупных нуклеосомных комплексов на данный момент затруднено, для получения информации об их структуре, подвижности можно использовать набор косвенных подходов. С одной стороны, нуклеосомы можно изучать методом молекулярной динамики (МД) и сопоставлять результаты моделирования с экспериментальными данными. Третья глава диссертации посвящена исследованию конформационных перестроений внутри нуклеосом методом МД. С другой стороны можно создавать молекулярные модели на основании набора различных результатов экспериментов. Такой подход в последние годы получил название интегративного моделирования (*integrative modeling*) и реализован в ряде специализированных программ (Russel et al. 2012), однако на данный момент существующее программное обеспечение непригодно для создания молекулярных моделей комплексов ДНК-белок в полуавтоматическом режиме. По этой причине, разработка методов построения моделей нуклеосом в комплексе с белками на основании разнообразных косвенных методов определения структуры является весьма актуальной. Четвертая глава работы посвящена описанию разработанных методов молекулярного моделирования, основанных на интеграции экспериментальных данных в процесс моделирования (ИММ - интегративных методов моделирования), и их применения для изучения структуры и динамики нуклеосом.

Другой актуальной проблемой современной науки является воспроизводимость экспериментов и воспроизводимость протоколов обработки экспериментальных данных. Одним из способов решения данной проблемы является обеспечение доступа к программному обеспечению и протоколам обработки данных.

По этой причине, исходные коды ПО, разработанного в ходе выполнения диссертации, опубликованы и доступны для научного сообщества.

Цель диссертационной работы

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

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

1. Исследовать ключевые моды структурной динамики нуклеосом методами полноатомной молекулярной динамики.
2. Разработать метод молекулярного моделирования нуклеосом на основании данных об эффективности Ферстеровского резонансного переноса энергии (spFRET), анализа профилей гидроксильного расщепления ДНК, а также данных о локальной жесткости ДНК.
3. Используя разработанный метод, изучить конфигурации различных комплексов нуклеосом, а именно: изучить комплексы нуклеосом с линкерными гистонами, изучить перестроения в нуклеосомах при их связывании с гистоновым шапероном FACT; изучить структуру компактных динуклеосом.

Основные положения, выносимые на защиту:

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

Научная новизна

Работа посвящена актуальной теме исследования структуры и динамики хроматина. Работа хроматина в целом определяет функциональное состояние клетки,

а нарушения его упаковки и функционирования влекут за собой серьезные последствия. Изучение принципов устройства хроматина, а также белков, влияющих на его функции, необходимо для поиска новых мишеней для создания лекарственных препаратов.

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

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

Теоретическая и практическая значимость работы

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

Степень достоверности и апробация результатов

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

- «Microscopy and Microanalysis», США, 2018;

- «The 43th FEBS Congress», Прага, Чехия, 2018;
- «5th International Congress on Microscopy & Spectroscopy (INTERM 2018)», Oludeniz, Турция, 2018;
- «Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2018»», Москва, Россия, 2018;
- «Cold Spring Harbor Laboratory international meeting on “THE PARP FAMILY & ADP-RIBOSYLATION”», Cold Spring Harbor Laboratory, США, 2018;
- «Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB'17)», Москва, Россия, 2017;
- «Российская международная конференция по криоэлектронной микроскопии RICSEM-2017», Москва, Россия, 2017;
- «Chromatin and Epigenetics», Гейдельберг, Германия, 2017;
- «Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology "Genomic instability and DNA repair"», Санта Фе, США, 2017;
- «Первый Российский кристаллографический конгресс», Москва, Россия, 2016;
- «Biophysical Society 60th Annual Meeting», Los Angeles, США, 2016;

Публикации

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

Личный вклад автора

Автором созданы и подготовлены к моделированию модели нуклеосом и их комплексов. Автором созданы программные коды для анализа и визуализации результатов исследования динамики нуклеосом методом молекулярной динамики. Автору принадлежит идея и реализация программ для обработки данных spFRET, измеренных на микроскопе Zeiss LSM 710, программ для создания молекулярных моделей нуклеосом и их комплексов. Автором произведены измерения всех необходимых корректировочных коэффициентов для расчета расстояний spFRET, создан графический интерфейс и часть алгоритма программы для анализа и предсказания профилей гидроксильного футпринтинга HYDROID [6].

Эксперименты по измерению spFRET от исследуемых объектов проведены сотрудниками группы исследования регуляции транскрипции кафедры биоинженерии (в частности измерения spFRET в работах [1,3]). Измерения профилей гидроксильного футпринтинга нуклеосом с гистоновым вариантом CenH3 произведены сотрудниками лаборатории биохимии и молекулярной биологии Национального института рака, Национальных институтов здоровья США (в частности измерения в работе [5]).

Структура и объем диссертации

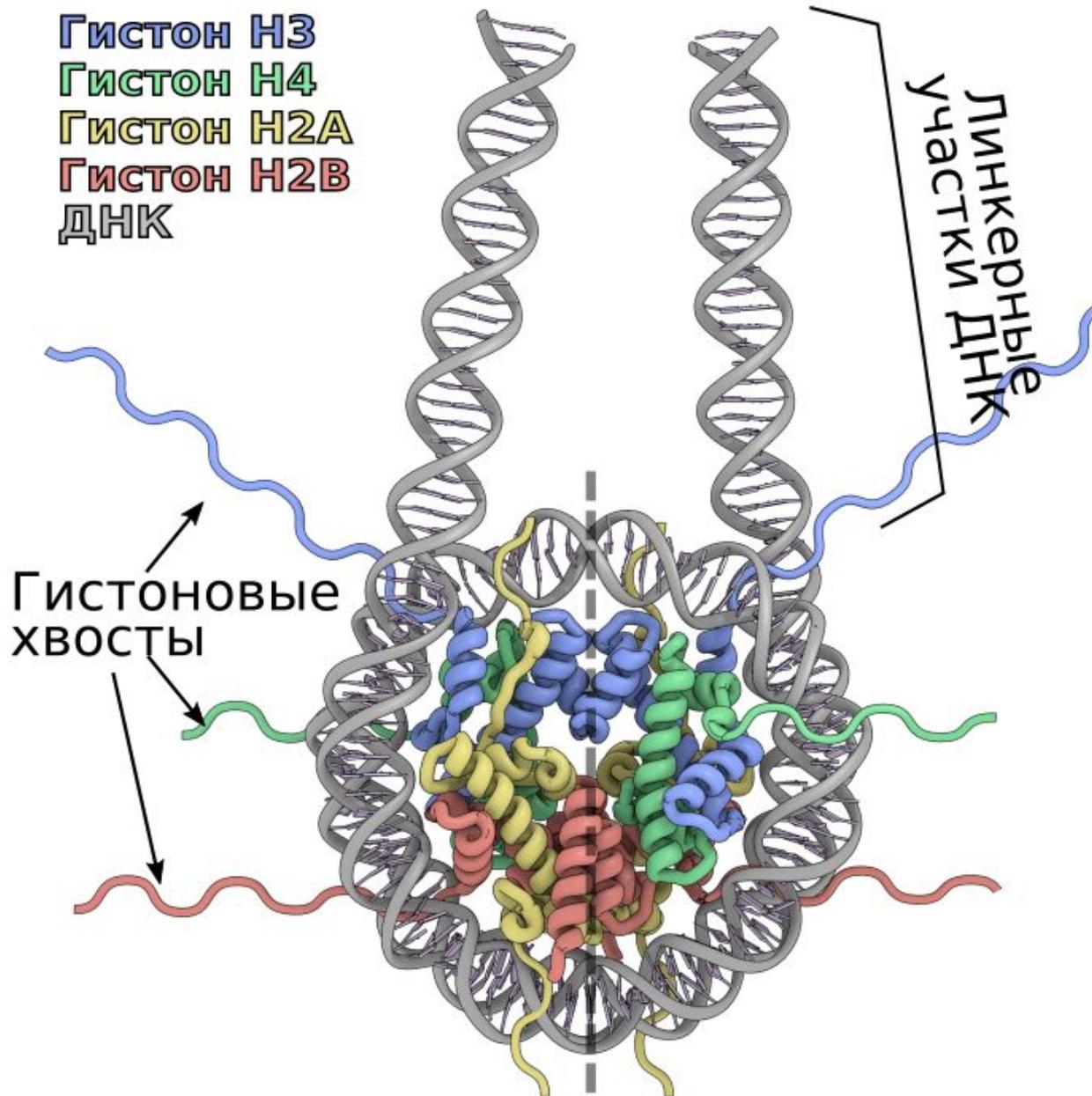
Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения. Полный объем диссертации составляет 99 страниц с 28 рисунками. Список литературы содержит 118 наименований.

Содержание работы

Во **введении** обоснована актуальность исследований, проводимых в рамках диссертационной работы, определены цели и задачи работы, сформулирована научная новизна и практическая значимость полученных результатов.

В **первой главе** произведено описание структуры нуклеосом и классификация структурной подвижности нуклеосом. Приведены основные факторы, влияющие на структуру нуклеосом. Приводится обзор методов моделирования нуклеосом, а также подходов к интегративному моделированию нуклеосом.

В разделе 1.1 представлено подробное описание особенностей структуры нуклеосом (Рис.1).



Диадная ось симметрии

Рисунок 1. Визуализация нуклеосомы, ДНК и белок отображены в виде вторичной структуры. Визуализация построена по структуре с кодом 1KX5 банка данных PDB (Davey et al. 2002).

Приводится классификация обнаруженных на данный момент мод структурной подвижности нуклеосом (Рис.2), приводится описание их функциональной роли.

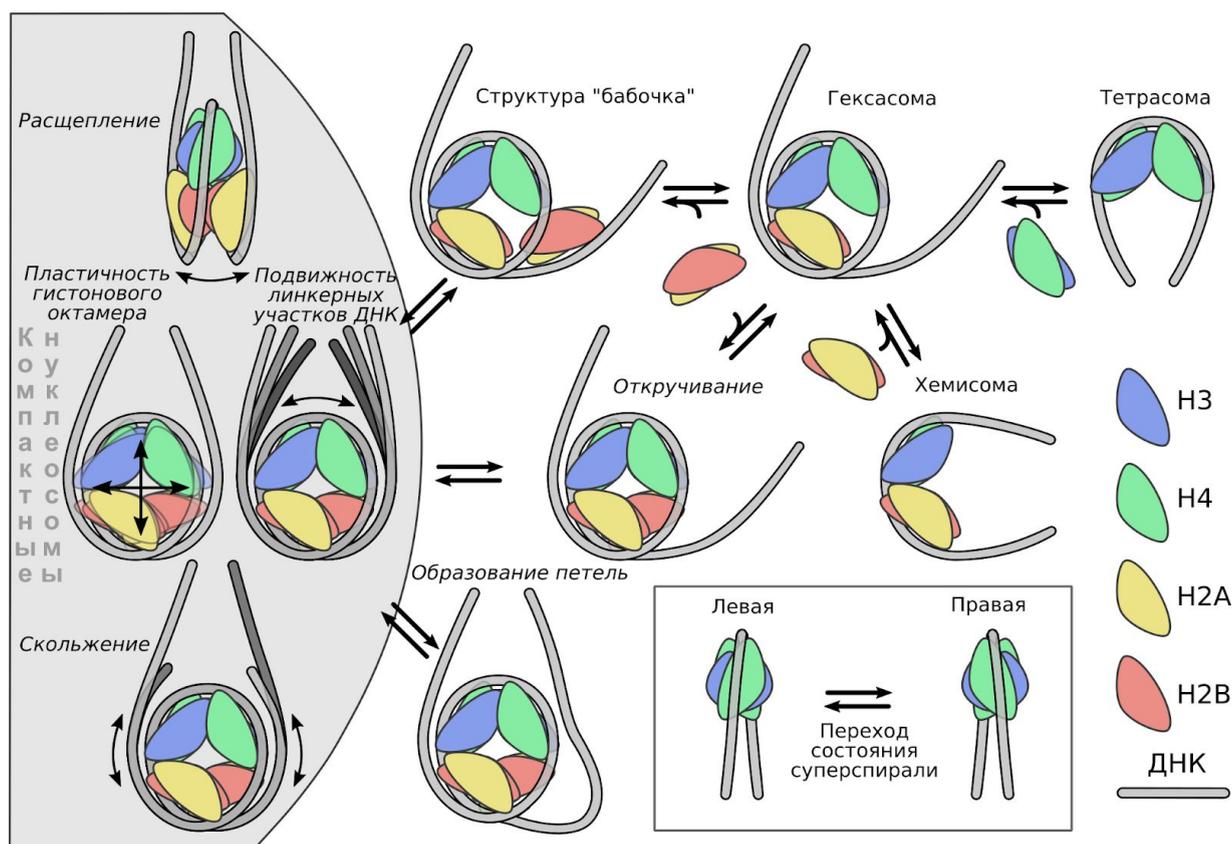


Рисунок 2. Интермедиаты и моды динамики нуклеосом.

Приведено описание набора факторов, которые изменяют аспекты структуры и конформационной динамики нуклеосом.

В разделе 1.2 приведены известные на данный момент результаты исследований нуклеосом при помощи МД.

В разделе 1.3 приводится описание концепции интегративного метода моделирования (ИММ). ИММ позволяет строить молекулярные модели, используя данные, полученные в независимых экспериментах, которые по одиночке несут недостаточно информации для определения трехмерной структуры.

В разделе 1.4 приведено общее описание метода измерения эффективности Ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET). Приведены примеры подходов к измерению эффективности spFRET от одиночных молекул. Описаны подходы к определению расстояний между флуоресцентными метками по данным эффективности spFRET.

В разделе 1.5 приведено описание метода определения контактов ДНК с белком - гидроксильного футпринтинга.

Во **второй главе** представлено описание методов молекулярной динамики, в том числе в применении к моделированию нуклеосом. Приводится описание разработанного в диссертации метода моделирования нуклеосом. Приводится описание технических аспектов измерения эффективности Ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET), а также измерения корректировочных коэффициентов, необходимых для определения парных расстояний между флуорофорами.

В разделе 2.1 приводится описание молекулярных моделей нуклеосом, исследованных методом молекулярной динамики. Приводятся основные параметры протоколов моделирования.

В разделе 2.2 приводится описание разработанного метода молекулярного моделирования нуклеосом и их комплексов. В частности, приводится метод расчета энергии деформации ДНК, которая рассчитывалась из обобщенных переменных, описывающих конфигурацию ДНК (Рис.3).

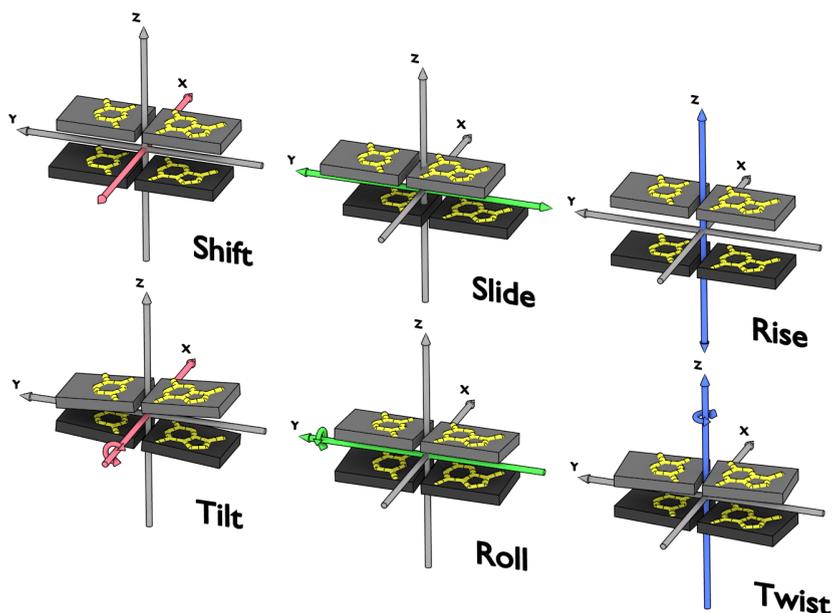


Рисунок 3. Визуальное представление геометрических характеристик шагов между соседними нуклеотидными парами (показаны в виде параллелепипедов) ДНК.

Приводится объяснение подхода к учету величин, измеренных методом spFRET, для построения молекулярных моделей по наборам парных расстояний. Описан подход к учету данных гидроксильного футпринтинга, а также приводится общая схема разработанного метода (Рис.4).

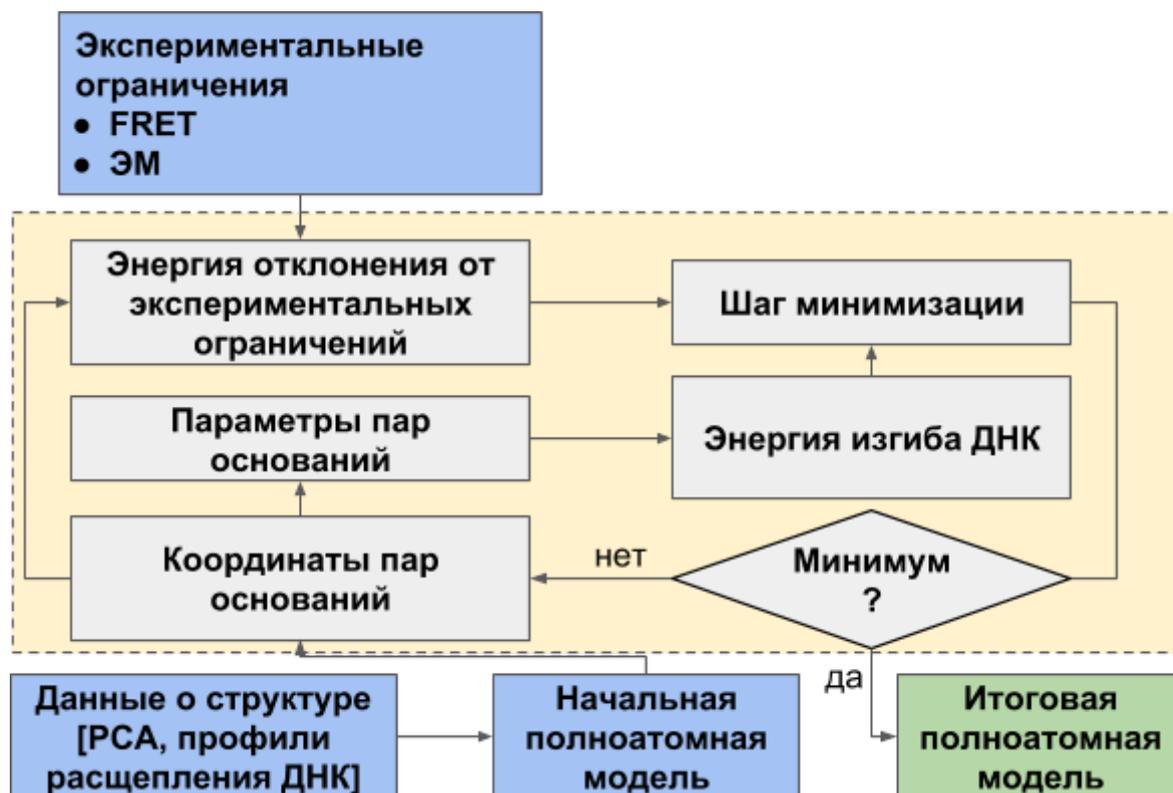


Рисунок 4. Схема работы алгоритма моделирования ДНК по данным FRET. Программная библиотека получает на вход начальные структуры в формате PDB, из данных футпринтинга выбираются нуклеотидные пары, не связанные с гистонами и другими белками. По результатам измерений методом spFRET определяются расстояния между парами меток. Алгоритм итеративно оптимизирует координаты выбранных нуклеотидных пар таким образом, чтобы привести их геометрию в соответствие с результатами spFRET, соблюдая при этом ограничения, связанные с жесткостью ДНК.

В разделе 2.3 приводится описание методов измерения spFRET от нуклеосом, меченных флуорофорами Cy3 и Cy5, а также приводится описание измерений, необходимых для определения квантовых выходов флуорофоров, фактора детекции микроскопа и ферстеровского радиуса пары флуорофоров. Данные измерения необходимы для точного определения расстояния между флуоресцентными метками.

Третья глава посвящена описанию результатов исследования конформационной динамики нуклеосом, полученных при помощи метода МД.

В разделе 3.1 показано, что в ходе моделирования МД в течение 1 мкс молекулярная модель нуклеосомы стабильна и в целом мало изменяет свою форму

(Рис.5.), при этом подвижность ДНК сильно выше, чем подвижность гистонов, что соответствует относительным величинам В-факторов в кристаллических структурах.

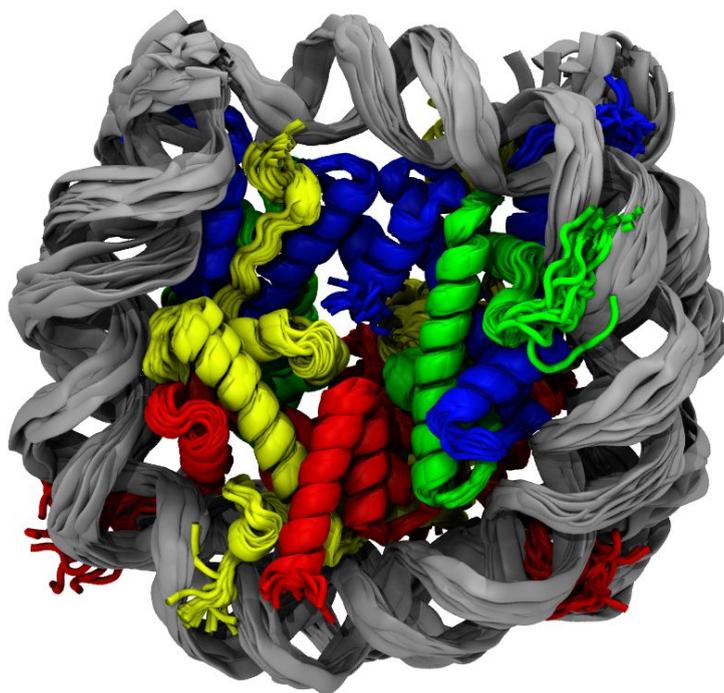


Рисунок 5. Визуализация 10 наложенных друг на друга структур свободной динамики нуклеосомы, гистоны и ДНК отображены в виде вторичной структуры.

Показано, что несмотря на стабильность нуклеосом и плотную упаковку гистонов в димеры, октамер гистонов упакован рыхло и содержит в себе большое количество молекул воды (Рис.6 слева). Наименьшее количество молекул воды (в среднем 63 молекулы) характерно для контакта димеров гистонов H3-H4, формирующих тетрамер – нуклеосомное ядро, в то время как остальные контакты димеров содержат приблизительно одинаковое количество молекул воды (Рис.6 справа). Большое число молекул воды на участке взаимодействия димеров гистонов свидетельствует о менее плотном контакте, что не противоречит экспериментальным данным, так как гистоны H2A-H2B удаляются из нуклеосомы легче всего. Результаты опубликованы в работах [7, 8]

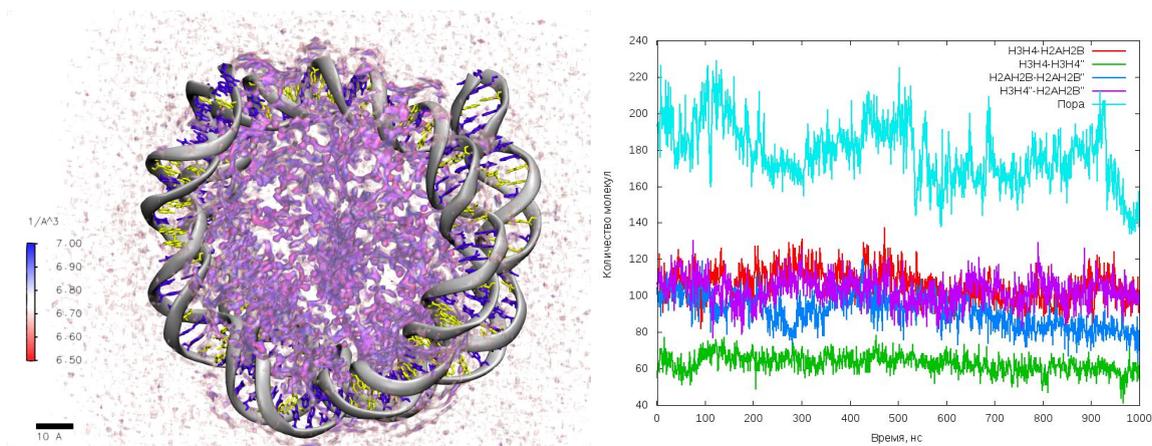


Рисунок 6. Слева: визуализация распределения плотности воды в нуклеосоме по объему расчетной ячейки. Для наглядности справа гистоны не показаны. Справа: график зависимости числа молекул воды в нуклеосоме от времени моделирования. Гистоновые контакты показаны цветами, красным – контакт первой пары димеров H3-H4 и H2A-H2B, фиолетовым – контакт второй пары димеров H3-H4 и H2A-H2B, синим – контакт двух димеров H2AH2B, зеленым – контакт димеров гистонов H3H4. Голубым цветом показано число молекул воды в нуклеосомной поре.

В разделе 3.2 приведены результаты изучения динамических мод в нуклеосомах методом МД.

Движение расщепления нуклеосом. Методом анализа ковариаций координат атомов в траектории МД было показано наличие в нуклеосоме крупномасштабного движения “расщепления” нуклеосомы (Рис.7). Относительно недавно было показано, что такое движение происходит в нуклеосомах спонтанно (Ngo and Ha 2015), однако из данной работы остается неясным, происходит ли во время движения перестроение на уровне гистонового октамера, так как в работе применялись флуоресцентные метки на ДНК. Обнаружение такой подвижности в траектории МД, свидетельствует о том, что в процесс расщепления нуклеосом вовлечен гистоновый октамер.

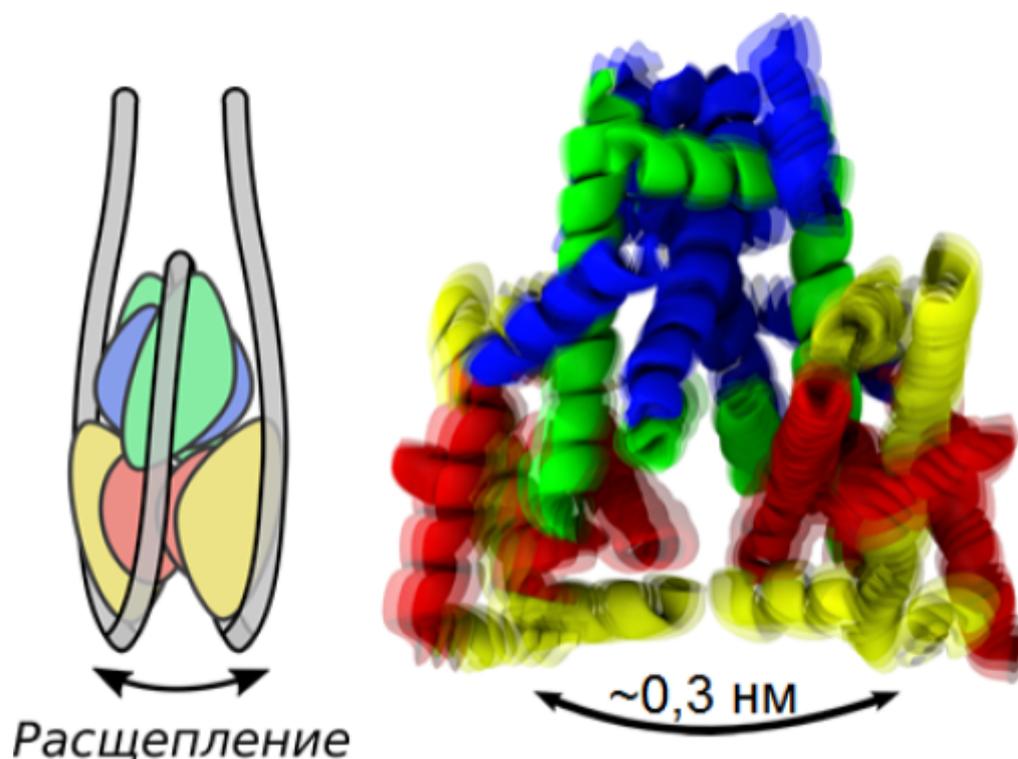


Рисунок 7. Слева - схема изменений в структуре, происходящих в ходе движения расщепления нуклеосомы. Справа - визуализация движений вдоль наиболее амплитудного собственного вектора, полученного методом ковариационного анализа. Показаны 3 наложенные структуры, построенные при минимальном, среднем и максимальном значениях собственного вектора.

Откручивание ДНК от нуклеосомы. Процесс спонтанного откручивания ДНК от нуклеосомы происходит на временах порядка 100 мс (Li et al. 2005), что делает его недоступным для изучения методом молекулярной динамики. По этой причине, при моделировании полноатомной МД нуклеосомы в течение 1 мкс откручивания ДНК от гистонов обнаружено не было. Однако, на данном временном промежутке было показано образование асимметричной укладки ДНК в областях входа и выхода из нуклеосомы (Рис.8 А). Интересно, что в работе (Bilokapic, Strauss, and Halic 2018) похожая конфигурация ДНК была показана методом крио-ЭМ (Рис.8 Б). Изменения в геометрии в данной области может приводить к значительному изменению геометрии линкерного участка ДНК, изменяя степень компактизации ДНК в хроматиновых фибриллах. Тот факт, что геометрия ДНК изменяется асимметрично, может быть связан с асимметрией последовательности ДНК (Eslami-Mossallam, Schiessel, and van

Noort 2016), и влиять на прохождение РНК полимеразы II сквозь нуклеосомы (Bondarenko et al. 2006). Результаты данной части работы опубликованы в [4, 10].

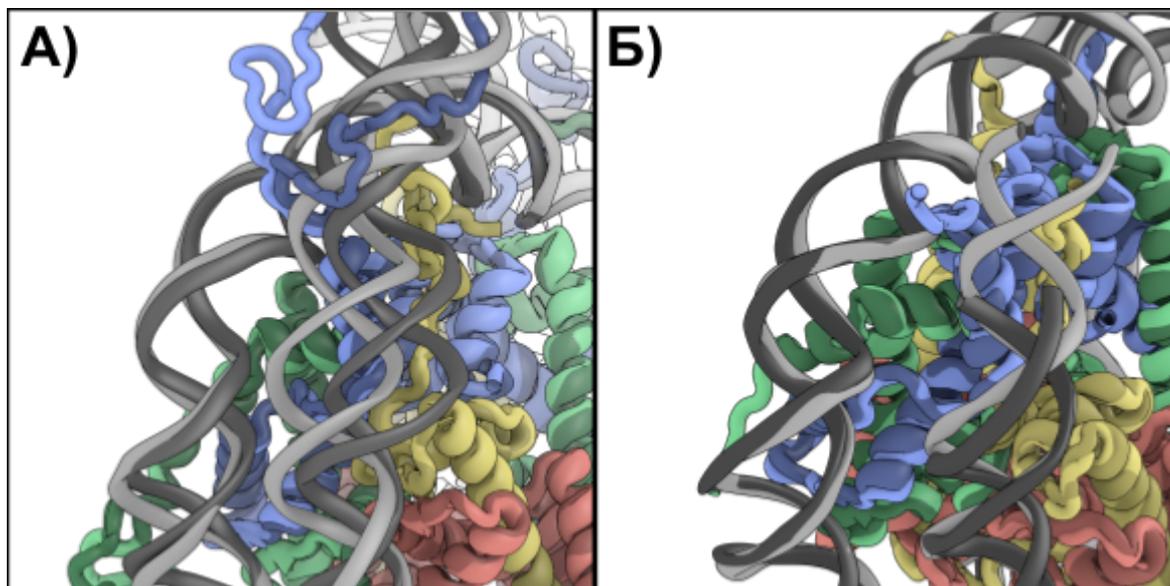


Рисунок 8. А) отличие начальной структуры ДНК (показана светло-серым) от структуры с “выпячиванием”, наблюдаемым в ходе свободной молекулярной динамики (показана темно-серым). Б) отличие канонической структуры ДНК (показана светло-серым) от структуры с “выпячиванием”, показанной методом крио-ЭМ в работе (Bilokapic, Strauss, and Halic 2018). Цветовая нотация гистонов аналогична Рис.1. [4, 10]

Так как за время моделирования не было обнаружено состояний нуклеосом с открученной ДНК, для дальнейшего исследования были созданы нуклеосомы с искусственно открученной на 20 н.п. ДНК. Было показано, что время возвращения ДНК из открученного состояния значительно зависит от времени релаксации ионного окружения на этапе подготовки системы: после короткой релаксации системы (1 нс), нуклеосома мгновенно возвращалась в конфигурацию, близкую к исходной (наблюдаемой в кристалле). Длительная релаксация (10 нс) ионного окружения при фиксированной ДНК приводила к тому, что на протяжении 50 нс свободной динамики нуклеосома не возвращалась в исходную конфигурацию. Одной из возможных причин такого поведения является перераспределение зарядов на поверхности гистонов. На графике В) Рис.9 показано изменение квадрупольного момента, образуемого гистоновыми зарядами вдоль оси, перпендикулярной плоскости супервитка ДНК. Характер изменения квадрупольного момента отличается

от характера изменения распределения катионов (Рис.9 А, Б): квадрупольный момент изменяется медленнее и за 1 нс не успевает достичь значений, которых он достигает за 10 нс. Таким образом, для сборки нуклеосомы требуется не только эффективное экранирование зарядов на поверхности ДНК, но и определенная конфигурация зарядов на поверхности гистонов, что свидетельствует о необходимости изменения конформации гистоновых димеров при откручивании ДНК. Данный факт был недавно показан методом крио-ЭМ в работе (Bilokapic, Strauss, and Halic 2018). Результаты данной части работы опубликованы в [2].

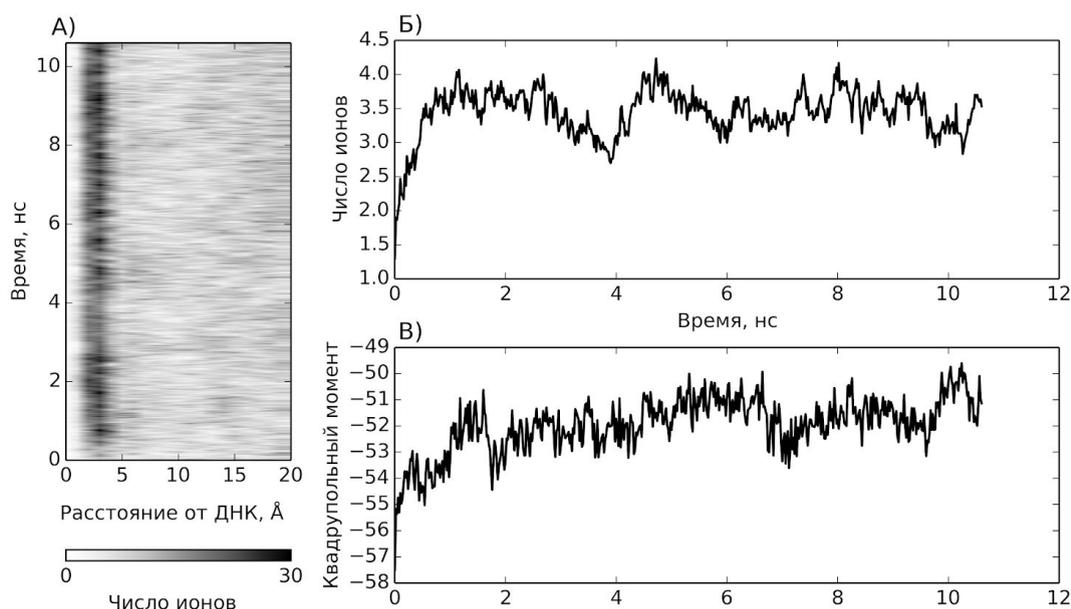


Рисунок 9. А) Карта изменения распределения ионов во время релаксации растворителя вокруг спрямленного участка ДНК. Б) График зависимости количества ионов, находящихся на расстоянии менее 1 нм от ДНК, от времени релаксации системы. В) График изменения квадрупольного электрического момента гистонов, рассчитанного вдоль оси, перпендикулярной плоскости супервитка нуклеосомы, во время релаксации системы [2].

Подвижность линкерных участков ДНК. Для изучения подвижности областей линкерной ДНК в нуклеосоме была создана полноатомная молекулярная модель, с длиной линкерных участков - 20 н.п. Модель была создана путем удлинения ДНК в кристаллической структуре. В ходе моделирования МД в течение 1 мкс линкерные участки оказались значительно подвижнее, чем участки ДНК, связанные с гистонами.

Усредненная по траектории МД конфигурация ДНК значительно отличается от начальной структуры: наблюдаемые в траектории МД флуктуации конформации линкерных участков ДНК замечают область пространства в форме конуса с углом раствора порядка $\pm 45^\circ$. При этом не было обнаружено значительной корреляции между конформацией линкеров. Моделирование этой же системы при высокой ионной силе (1 М NaCl) привело к тому, что линкеры в среднем сблизились, что свидетельствует о влиянии электростатического экранирования зарядов ДНК на конформацию линкерной области и согласуется с измерениями эффективности FRET, в которых было показано, что с ростом ионной силы, расстояние между линкерными участками ДНК в нуклеосоме падает (Tóth, Brun, and Langowski 2006). Результаты данной части работы опубликованы в [4].

Четвертая глава посвящена описанию разработанного метода молекулярного моделирования нуклеосом и его применения для изучения нуклеосом и их комплексов с белками.

В разделе 4.1 приведено описание применимости и ограничений разработанного метода. Общий алгоритм поиска конфигурации ДНК, отвечающий критериям жесткости нуклеиновой кислоты, расстояниям, полученным из FRET, а также ограничениям, полученным из анализа профилей футпринтинга, показан на Рис.4. Моделирование комплексов хроматина в таком приближении позволяет быстро создавать начальные модели для вписывания в карты электронной плотности, полученные из электронной микроскопии, а также проверять “адекватность” экспериментальных данных и их согласованность со структурами из банков данных.

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

В разделе 4.2 приведен пример использования разработанного метода молекулярного моделирования для оценки зависимости энергии деформации ДНК от нуклеотидной последовательности для известных комплексов нуклеосом с линкерным гистоном (ЛГ). Для определения зависимости типа связывания ЛГ от нуклеотидной последовательности линкерной ДНК была рассчитана разница

деформационных энергий линкерных участков ДНК между двумя разными моделями связывания - на диаде (НД) и вне диады (ВД) для всех возможных последовательностей линкерных участков ДНК (Рис.10 А). Как видно из Рис.10 Б, большинство позиций в последовательностях нуклеотидов линкерных участков ДНК не значимы для определения геометрии ДНК в рамках моделей НД и ВД, кроме нуклеотидов в позициях -7, -4 и -3. В последовательностях, предпочтительных для модели НД, в этих позициях располагаются А/Т, А/Т, G/C, в то время как для модели ВД более предпочтительны С/G, С/Т, G/Т. Также по разнице в деформационных энергиях были найдены предпочтительные (оптимальные) последовательности линкерной ДНК (для которых энергия изгиба максимально соответствует конформации) для моделей НД (CCGTCCCGTC-ППН-ACGCCGGCGG) и ВД (GACGCCCGAC-ППН-GTGATGCTGC) где ППН - последовательность, позиционирующая нукleosомы. Результаты данной части диссертации опубликованы в [9].

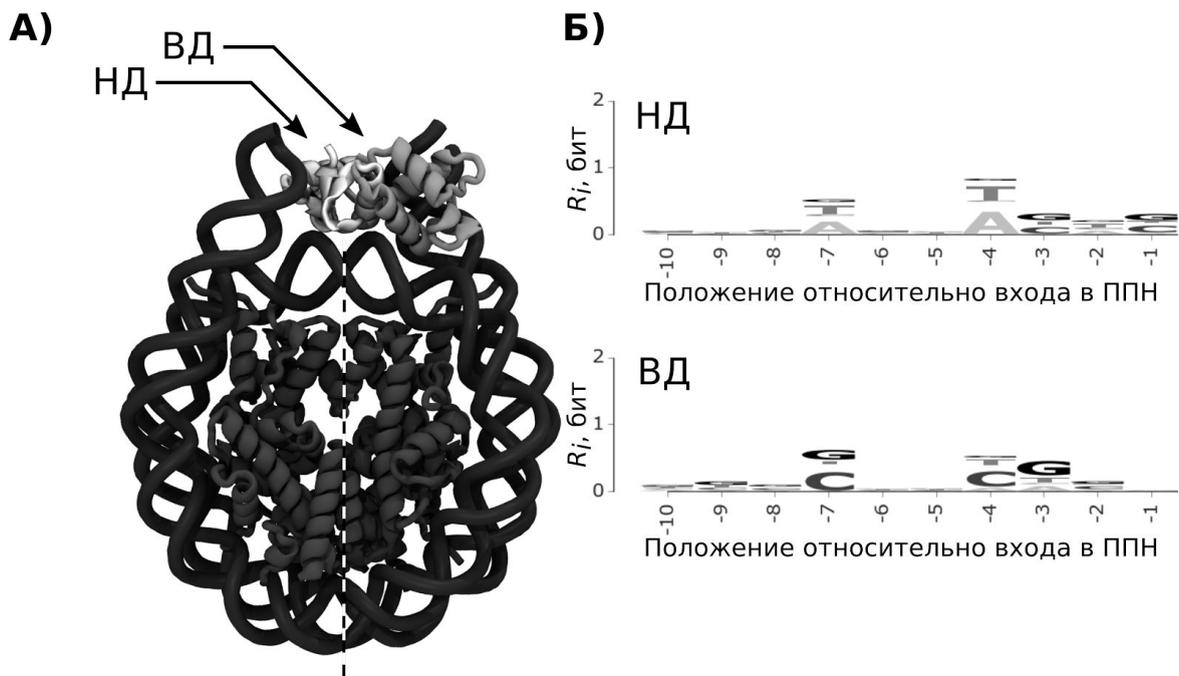


Рисунок 10. А) Внешний вид структуры хроматосомы. Белок и ДНК показаны в виде отображения вторичной структуры. Линкерные гистоны выделены оттенками серого. Диадная ось показана пунктирной линией. Б) Визуализация частоты встречаемости нуклеотидов для последовательностей, склонных к формированию

структуры НД (сверху) и ВД (снизу). Визуализация выполнена в виде логотипов последовательностей [9].

В разделе 4.3 разработанный метод молекулярного моделирования был применен для построения модели ДНК в комплексе нуклеосомы с ЛГ на основании экспериментов по измерению эффективности spFRET. За основу для построения модели была взята кристаллическая структура, к которой были добавлены прямые линкеры в соответствии с последовательностью, что применялась в эксперименте по измерению spFRET. После проведения минимизации геометрии ДНК с ограничениями расстояний из данных FRET была получена асимметричная структура с параллельным расположением линкерных участков ДНК (Рис.11). Полученная модель оказалась схожа по конфигурации линкеров с моделью, построенной в работе (Syed et al. 2010), где структуру хроматосом исследовали методом гидроксильного футпринтинга и электронной микроскопии. Данная часть работы была опубликована в [3].

В разделе 4.4 разработанный метод молекулярного моделирования был применен для построения модели нуклеосомы, содержащей гистоновый вариант CenH3, по данным гидроксильного расщепления ДНК. Благодаря симметричности нуклеосомы, при ее повороте вдоль диадной оси на 180° цепи ДНК меняются местами друг с другом. Эта особенность устройства нуклеосомы приводит к тому, что профили футпринтинга для обеих цепей ДНК должны в точности совпадать вблизи диадной оси. Таким образом, рассчитывая коэффициент корреляции между профилями расщепления обеих цепей ДНК, можно с точностью до 1 н.п. определить положение диады на ДНК, а значит и позицию ДНК относительно гистонов. Для проведения анализа результатов гидроксильного расщепления ДНК была разработана программа HYDROID [6]. Определенное таким методом положение ДНК относительно гистонов отличается на 3 н.п. от положения, определенного ранее (Cole, Howard, and Clark 2011). Благодаря точному определению положения ДНК относительно диады была построена модель нуклеосомы, содержащей вариант гистона CENH3. Результаты данной части работы опубликованы в [5].

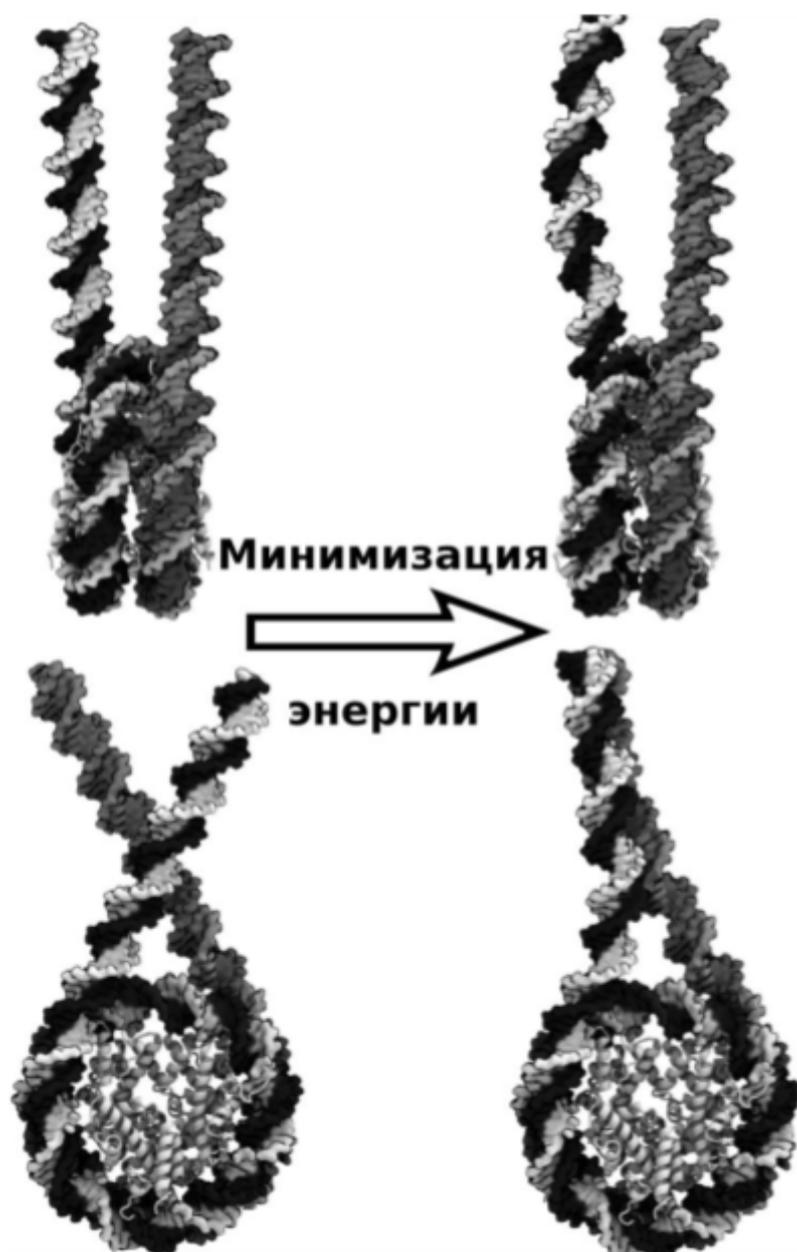


Рисунок 11. Модель изменения конформации ДНК в нуклеосоме при связывании ЛГ. Слева показана начальная модель, основанная на кристаллической структуре, справа показана модель соответствующая набору парных расстояний из измерений методом spFRET [3].

В разделе 4.5 разработанный метод молекулярного моделирования был применен для определения вероятных моделей изменений в нуклеосоме под действием шаперона FACT по данным измерений эффективности spFRET. По данным spFRET для трех пар флуоресцентных меток, расположенных на нуклеосоме, было показано, что FACT вызывает значительные изменения в эффективности переноса энергии между метками [1]. Исходя из измеренного фактора детекции и расчетов

эффективности переноса энергии из молекулярных моделей было показано, что для того, чтобы произошло наблюдаемое в эксперименте изменение эффективности spFRET, от нуклеосомы должно быть откручено суммарно около 100 н.п. ДНК (60 н.п с одной и 40 н.п с другой стороны). Были построены молекулярные модели, соответствующие таким степеням отворота ДНК (Рис.12): модель откручивания ДНК с сохранением гистонового октамера (Рис.12.2), модель откручивания ДНК с образованием структуры “бабочка” (Рис.12.3), модель с образованием двух хемисом (Рис.12.5), а также модель полного разрушения октамера гистонов (Рис.12.4). Все эти модели в равной степени соответствуют наблюдаемым изменениям в эффективности переноса энергии в присутствии гистонового шаперона FАСТ.

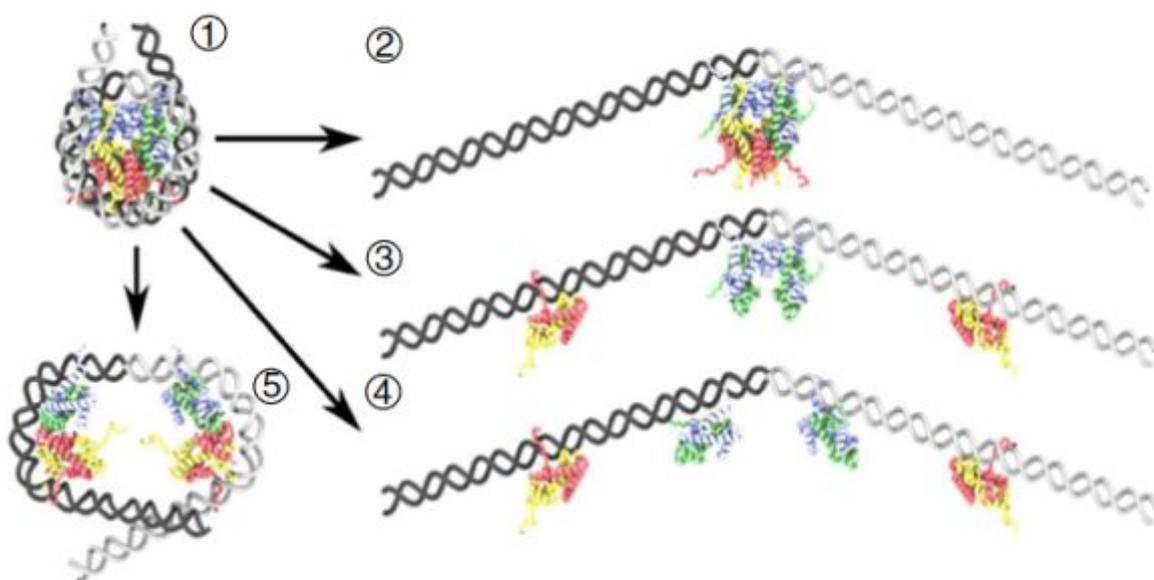


Рисунок 12. Модели разворачивания нуклеосом, вызванного взаимодействием с шапероном FАСТ [1]. Интактные нуклеосомы (1) могут разворачиваться от интактного октамера (2), ДНК может отворачиваться с разрушением (3) или без (4) разрушения интерфейса взаимодействия гистонов Н3–Н3 или путем открытия интерфейса Н3–Н3 без откручивания ДНК (5) с формированием двух хемисом.

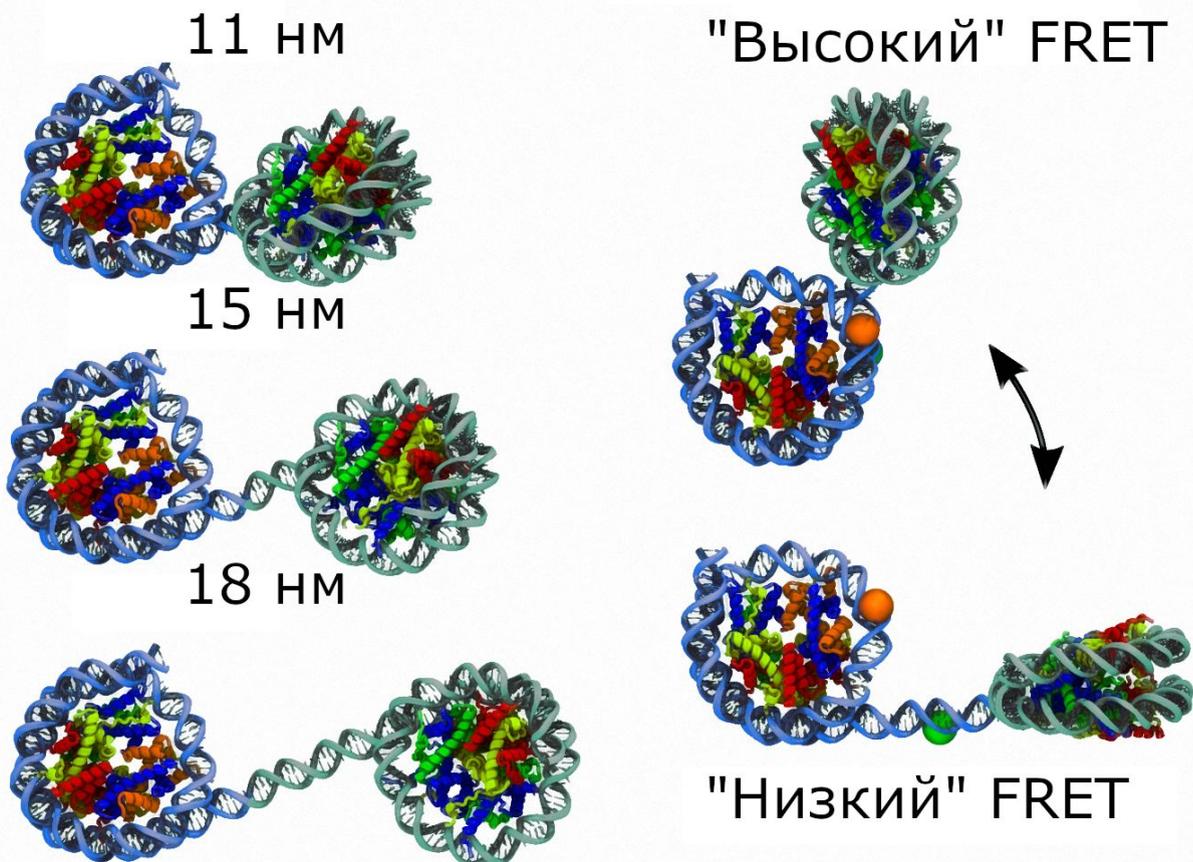


Рисунок 13. Модели динуклеосом. Слева: основные классы, наблюдаемые в ЭМ. Справа: симметричность и асимметричность откручивания может приводить к изменению эффективности FRET.

В разделе 4.6 разработанный метод молекулярного моделирования был применен для определения моделей компактных динуклеосом по данным ЭМ и измерений эффективности spFRET. При моделировании динуклеосом необходимо ввести 3 параметра: длина линкера между областями нуклеосом (отступ), откручивание ДНК от первой нуклеосомы и откручивание от второй нуклеосомы. Исходя из данных ЭМ, для динуклеосом характерны 3 основных состояния (с расстояниями между нуклеосомами 11, 15 и 18 нм). Таким расстояниям соответствует множество комбинаций отступ-откручивание, по этой причине, для уточнения моделей были использованы данные из работы (Engelholm et al. 2009), в которой величина отступа была известна. Согласно моделям, построенным при помощи разработанного нами метода, расстояниям, измеренным в (Engelholm et al. 2009), соответствуют степени откручивания в 17 н.п. Используя данную величину были

определены величины отступа между нуклеосомами: -7, 4 и 15 н.п. для классов 1, 2, и 3 соответственно (Рис.13).

Пятая глава посвящена описанию программного обеспечения, разработанного в ходе работы над диссертацией. В частности:

В ходе выполнения работы была разработана FRETty - программа для анализа данных spFRET. Это программное обеспечение позволяет быстро выполнять вычисление spFRET и визуализацию нескольких наборов данных и имеет интерактивный пользовательский интерфейс (Рис.14). FRETty написан на языке Python и может быть легко модифицирован. Он распространяется в форме установочного файла для Windows 10 и может быть установлен на Mac или GNU / Linux из исходных файлов.

В ходе выполнения работы была реализована программа HYDROID [4]. Алгоритмы, реализованные в данной программе, основаны на идеях, предложенных в более ранних работах. Тем не менее, HYDROID (в отличие от других программ) свободно распространяется через репозиторий ANACONDA и отличается наличием новых подходов, облегчающих задачу анализа профилей гидроксил-радикального расщепления. Для программы также разработан интерактивный пользовательский интерфейс (Рис.15)

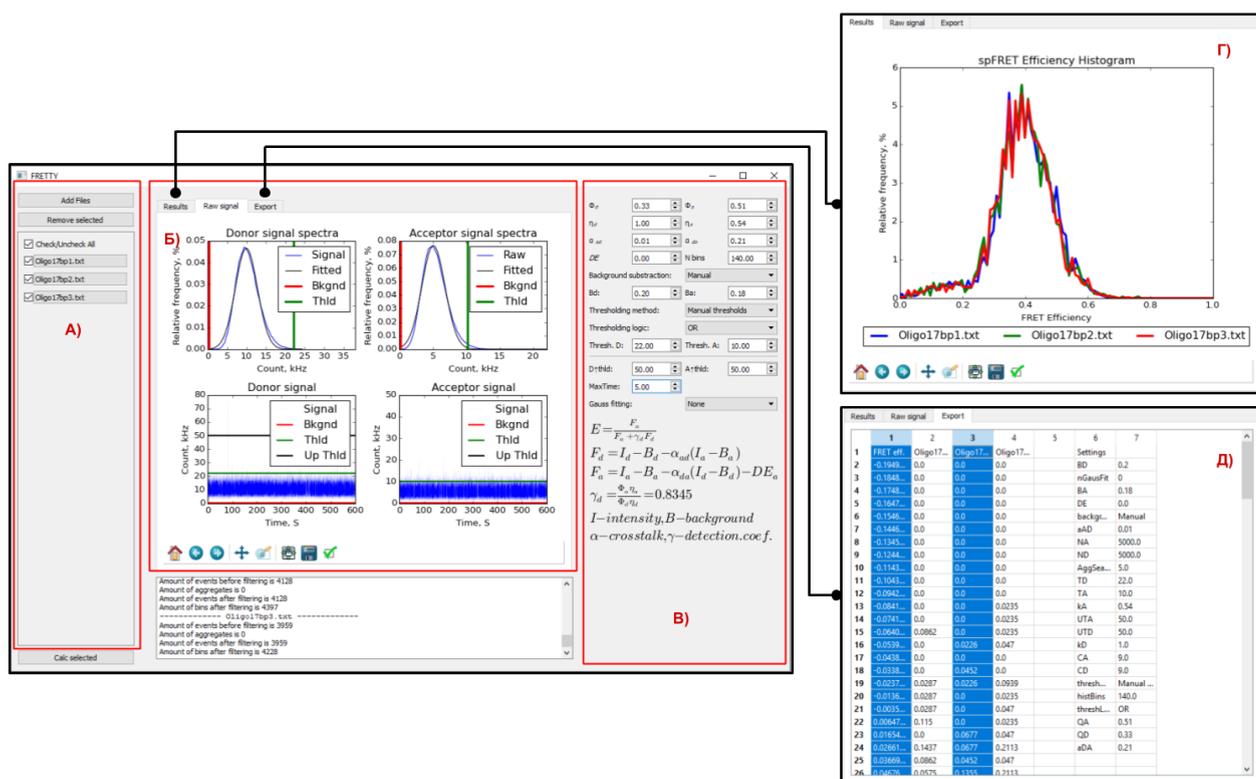


Рисунок 14. Внешний вид интерфейса программы FRETty. А) Список обрабатываемых файлов. Б) Панель просмотра данных. В) Панель настроек и справки. Г) Панель отображения результатов. Д) Панель экспорта результатов.



Рисунок 15. Внешний вид одного из этапов работы программы HYDROID_GUI - программы для анализа профилей гидроксильного футпринтинга ДНК [4].

В **заключении** приведены основные результаты и выводы диссертации:

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

4. Разработанные в диссертации методы и программное обеспечение, объединяющие подходы молекулярного моделирования, анализа данных spFRET и гидроксильного футпринтинга, позволили реконструировать трехмерные структуры ряда нуклеосом и их комплексов. В частности, данными методами:

4.1. Показано, что нуклеосома в комплексе с линкерным гистоном обладает “стеблеобразной” (stem-like) структурой в линкерной области.

4.2. Определено положение ДНК в *in vitro* модели центромерной нуклеосомы третьей хромосомы *S. cerevisiae*.

4.3. Показано, что при связывании нуклеосомы с гистоновым шапероном FАСТ откручивается не менее 100 н.п. ДНК.

4.4. Показано, что компактные динуклеосомы отличаются большей степенью откручивания ДНК, чем одиночные нуклеосомы.

4.5. Показано что энергия деформации ДНК в модели нуклеосомы с линкерным гистоном отличается для разных типов связывания линкерного гистона относительно оси псевдосимметрии нуклеосомы.

**Основные публикации Армеева Григория Алексеевича по теме
диссертации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для
защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 03.01.09 –
математическая биология, биоинформатика:**

1. Valieva ME, Armeev GA, Kudryashova KS, Gerasimova NS, Shaytan AK, Kulaeva OI, McCullough LL, Formosa T, Georgiev PG, Kirpichnikov MP, Studitsky VM, Feofanov AV / Large-scale ATP-independent nucleosome unfolding by a histone chaperone // *Nature Structural & Molecular Biology*. Vol. 23, № 12.: 1111–1116, 2016 — Индексируется WoS и Scopus.
2. Армеев Г.А., Шайтан К.В., Шайтан А.К. / Релаксация структуры нуклеосомы при отворачивании ДНК: исследование методом молекулярной динамики // *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология*.(3): 34-37, 2016 — Индексируется Scopus (перевод на английский).
3. Армеев Г.А., Горковец Т. К., Ефимова Д.А., Шайтан К.В., Шайтан А.К. / Моделирование структуры ДНК-белковых комплексов с использованием экспериментальных данных по резонансному переносу энергии и перекисному окислению // *Вестник Московского университета. Серия 16: Биология*, (1): 35–40, 2016 — Индексируется Scopus (перевод на английский).
4. Shaytan AK, Armeev GA, Goncarenco A, Zhurkin VB, Landsman D, Panchenko AR / Coupling between Histone Conformations and DNA Geometry in Nucleosomes on a Microsecond Timescale: Atomistic Insights into Nucleosome Functions // *Journal of Molecular Biology*. 2016 — Индексируется WoS и Scopus.
5. Shaytan AK, Xiao H, Armeev GA, Wu C, Landsman D, Panchenko AR / Hydroxyl-radical footprinting combined with molecular modeling identifies unique features of dna conformation and nucleosome positioning // *Nucleic Acids Research*. 2017, — Индексируется WoS и Scopus.
6. Shaytan AK, Xiao H, Armeev GA, Gaykalova DA, Komarova GA, Wu C, Studitsky VM, Landsman D, Panchenko AR / Structural interpretation of DNA-protein hydroxyl-radical footprinting experiments with high resolution using HYDROID // *Nature Protocols*. 2018, — Индексируется WoS и Scopus.
7. Армеев Г.А., Шайтан К.В., Шайтан А.К. / Исследование ионного окружения и электрических характеристик нуклеосом методом молекулярной динамики // *Вестник Московского университета. Серия 16: Биология*, (4): 24–28, 2015 — Индексируется Scopus (перевод на английский).
8. Армеев Г.А., Шайтан К.В., Шайтан А.К. / Конформационная подвижность нуклеосомы: исследование методом молекулярной динамики. *Вестник Московского университета. Серия 16: Биология*, (3): 49–54, 2015 — Индексируется Scopus (перевод на английский).
9. Горковец Т.К., Армеев Г.А., Шайтан К.В., Шайтан А.К. / Совместное влияние аминокислотной последовательности гистона H1 и нуклеотидной последовательности днк на структуру хроматосомы: анализ методами молекулярного моделирования // *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология*.73(2): 99-105, 2018. — Индексируется Scopus (перевод на английский).
10. Shaytan AK, Armeev GA, Goncarenco A, Zhurkin VB, Landsman D, Panchenko AR / Trajectories of microsecond molecular dynamics simulations of nucleosomes and nucleosome core particles // *Data in Brief*, 7:1678–1681, 2016 — Индексируется Scopus.