

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА  
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*

Волох Олеся Игоревна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ДНК С ЛИГАНДАМИ МЕТОДАМИ  
КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ И ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ**

Специальность: 03.01.02 – Биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научные руководители:  
доктор физико-математических наук,  
профессор Константин Вольдемарович Шайтан  
доктор биологических наук,  
доцент Ольга Сергеевна Соколова

Москва 2016

## Оглавление

Список сокращений .....	5
Введение.....	6
Цель и задачи исследования.....	6
Научная новизна и практическая значимость работы .....	7
Глава I.....	8
Обзор литературы.....	8
1.1 Физико-химические и структурные особенности ДНК .....	8
Природа взаимодействий ДНК с молекулами-лигандами .....	9
Особенности взаимодействий ДНК с молекулами-лигандами и их роль в регуляции транскрипции .....	9
Реализация генетического материала в эукариотической клетке .....	10
Транскрипция нерибосомных генов.....	11
1.2 Структура хроматина .....	11
Нуклеосома .....	12
РНК-полимеразы .....	13
Механизм транскрипции одиночной РНКПШ, нуклеосомные барьеры .....	15
Молекулярные механизмы преодоления нуклеосомного барьера РНКПШ.....	17
Механизмы транскрипции РНКПШ <i>in vivo</i> .....	20
1.3 Поддержание постоянства генетического материала.....	21
1.4 Факторы, способные приводить к остановке транскрипции .....	22
Остановка транскрипции молекулами-лигандами ДНК .....	22
Роль односторонних разрывов ДНК в остановке транскрипции .....	22
1.5 Методы исследования структурных особенностей макромолекулярных комплексов .....	25
Основы метода Просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) .....	26
Принцип формирования изображений в ПЭМ.....	30
Методы получения ПЭМ изображений .....	32
Контраст изображений.....	34
Определение частотно-контрастной характеристики (ЧКХ).....	36
Элиминирование эффектов частотно-контрастной характеристики (ЧКХ-коррекция) .....	36
Нормализация изображений.....	37
1.6 Трехмерная реконструкция карт электронной плотности из ПЭМ-изображений.....	38
Сборка изображений одиночных частиц .....	39
Статистический анализ и классификация изображений .....	40
Мультиреференсное выравнивание изображений .....	42
Выравнивание в томографии .....	42
Определение ориентации двумерных изображений.....	43
Угловая реконструкция трехмерной структуры .....	45

1.7 Методы компьютерного моделирования и их роль в анализе трехмерных структур .....	49
Методы компьютерного докинга и фиттинга.....	49
Метод молекулярной динамики.....	51
Глава II .....	58
Материалы и методы.....	58
2.1. Материалы .....	58
2.2. Методы .....	59
Подготовка проб для ПЭМ-исследования .....	59
Нанесение проб на сетки для ПЭМ .....	62
Проведение исследований методами ПЭМ .....	62
Проведение расчетов методом молекулярной динамики.....	64
Глава III .....	65
Результаты.....	65
3.1 Исследования ЭК, остановленного в положении активного центра РНКП <i>E. Coli</i> +42 позиции нуклеосом-позиционирующей последовательности .....	65
3D структура ЭК(+42), полученная с использованием метода негативного контрастирования.....	65
Получение 3D структуры ЭК(+42) методом крио-ПЭМ .....	67
3.2 Исследования элонгационного комплекса, остановленного в положении +24 активного центра РНКП <i>E. Coli</i> .....	68
Получение предварительной реконструкции ЭК(+24) с использованием электронной томографии .....	68
Получение 3D структуры ЭК(+24) с использованием метода RCT и негативного контрастирования.....	70
3.3. Применение молекулярно-динамического подхода для исследования влияния введения однонитевого разрыва на механические параметры (жесткость и гибкость) фрагмента ДНК	73
Создание моделей исследуемых структур фрагмента ДНК без однонитевого разрыва и с однонитевым разрывом .....	73
Оценка влияния введения однонитевого разрыва на жесткость ДНК.....	75
Оценка влияния введения однонитевого разрыва на характер стэкинг-взаимодействий в области разрыва ДНК .....	76
Глава IV .....	78
Обсуждение.....	78
4.1. Интерпретация структурных особенностей элонгационного комплекса, остановленного в положении +42 активного центра РНКП <i>E. Coli</i> .....	78
Анализ 3D структуры ЭК, остановленного в положении +42 активного центра РНКП <i>E.</i> <i>Coli</i> , полученной методом крио-ПЭМ.....	79
Анализ 3D структуры ЭК, остановленного в положении +42 активного центра РНКП <i>E. Coli</i> , полученной методом ПЭМ негативного контрастирования.....	80
Сравнение и анализ 3D структур ЭК(+42), полученных методами негативного контрастирования и крио-ПЭМ.....	84

4.2. Влияние одонитевого разрыва ДНК на структурные особенности элонгационного комплекса, остановленного в положении +24 активного центра РНКП <i>E. Coli</i> .....	87
4.3. Оценка влияния введения одонитевого разрыва на механические свойства ДНК.....	94
Заключение .....	99
Выводы .....	100
Благодарности.....	101
Список использованной литературы.....	102
Приложение 1 .....	117
Апробация метода молекулярной динамики для исследования взаимодействий ДНК с лигандами.....	117
Литературный обзор .....	117
Материалы и методы.....	121
Полученные результаты .....	129
Обсуждение и заключение .....	133
Приложение 2 .....	135

## Список сокращений

АМ – актиномицин

АМД – актиномицин Д

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

МД – молекулярная динамика

МФ – микрофотография

НПП – нуклеосом-позиционирующая последовательность

ОКФ – объемная корреляция Фурье, Fourier shell correlation (FSC)

ПААГ – полиакриламидный гель

ПЗС – прибор с зарядовой связью

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

РНК – рибонуклеиновая кислота

РНКП – РНК-полимераза

РСА – рентгеноструктурный анализ

ФРХ – факторы ремоделирования хроматина (хроматин-ремоделирующие факторы)

ЭК – элонгационный комплекс

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

ЧКХ - частотно-контрастная характеристика, contrast transfer function, CTF

CCF – cross correlation function, кросс-корреляционная функция

FACT – FAcilitates Chromatin Transcription – гетеродимерный белковый комплекс, фактор транскрипции и репликации

GTFs – General Transcription Factors, основные факторы транскрипции. Комплекс белковых факторов, необходимый РНКП III для распознавания промотора и инициации транскрипции

OTR – ortogonal tilt reconstruction, реконструкция методом ортогонального конического наклона

PSF – point spread function, функция рассеивания точки

RCT – random conical tilt, случайный конический наклон

SNR – signal to noise ratio, отношение сигнал/шум

## Введение

Реализация генетического материала по схеме ДНК-РНК-белок в клетках эукариот происходит путем транскрипции хроматина ферментами РНК-полимеразами. Механизм транскрипции хроматина РНК-полимеразой II представляет собой консервативный процесс для всех эукариот, характеризующийся строго упорядоченной регулируемой последовательностью нарушений и восстановлений ДНК-гистоновых и гистон-гистоновых взаимодействий. Нарушения процессов ДНК-гистоновых и гистон-гистоновых взаимодействий и необратимая потеря нуклеосом в результате действия различных факторов способны запускать патологические процессы и снижать жизнеспособность клеток, приводя, в частности, к блокировке процессов транскрипции [Marthens et al., 2005; Feser et al., 2010; Ljungman et al., 1992; Enright et al., 1992]. Помимо блокировки транскрипции в естественных условиях из-за нарушений структуры хроматина, существует и направленная блокировка в ходе терапии некоторых заболеваний, связанных с нарушениями пролиферативных процессов в клетках. В связи с этим изучение и понимание деталей процесса и механизмов транскрипции хроматина, где комплекс РНКП с нуклеосомой выступает в качестве мишени для новых лекарств с потенциальным фокусом на терапию возрастных нейродегенеративных патологий и все более широко распространяющихся онкологических заболеваний, представляет собой актуальную задачу не только с позиций фундаментальной науки, но и является одной из важнейших задач с практической точки зрения.

### Цель и задачи исследования

Цель данного исследования - изучить особенности взаимодействия ДНК с лигандами в норме и при нарушении транскрипции.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

- Исследование элонгационных комплексов (ЭК) ДНК-РНКП *E. Coli*-нуклеосома, остановленных в позициях (+24) и (+42) методами электронной микроскопии макромолекул;
- Получение трехмерных структур ЭК и интерпретация карт электронной плотности с использованием методов компьютерного докинга (фиттинга);
- Изучение влияния введения одноцепочечного разрыва в ДНК на структуру ЭК;
- Апробация молекулярно-динамического подхода к исследованию взаимодействий ДНК-лиганд на примере комплексов ДНК с производными актиномицина;
- Изучение влияния введения одностороннего разрыва на механические свойства ДНК методом молекулярной динамики.

## Научная новизна и практическая значимость работы

В данной диссертационной работе с помощью метода электронной микроскопии впервые получены трехмерные структуры двух элонгационных комплексов РНКП *E. Coli*, остановленных в положениях (+24) и (+42) при транскрипции нуклеосомной ДНК; впервые исследовано влияние введения одностороннего разрыва в нематричную цепь ДНК на трехмерную структуру элонгационного комплекса. С помощью метода компьютерного моделирования построены модели возможных трехмерных структур исследуемых комплексов. Методом молекулярной динамики исследовано влияние низкомолекулярных лигандов-интеркаляторов производных актиномицина Д на жесткость ДНК. Показано, что производные актиномицина Д (с введенными модификациями гидроксигруппы и аминогруппы) увеличивают жесткость фрагментов ДНК в структуре комплекса. Так же методом молекулярной динамики оценено влияние введения одностороннего разрыва на механические свойства ДНК: показано уменьшение жесткости в структуре с односторонним разрывом по сравнению с нормальной структурой ДНК.

Полученные результаты имеют практическое значение для изучения регуляции транскрипции и репарации ДНК. Нарушения этих процессов, отвечающих за уровень генной экспрессии, способны приводить к развитию различных заболеваний, в том числе онкологической и нейродегенеративной природы. Результаты работы могут послужить в дальнейшем для разработки новых лекарственных средств, методов диагностики и новых подходов к изучению механизмов и способов профилактики данных патологий.

## Глава I

### Обзор литературы

#### 1.1 Физико-химические и структурные особенности ДНК

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК), представляющая собой полимер четырех вариантов нуклеотидов, в клетке отвечает за хранение, передачу и реализацию наследственной информации, обеспечивающей развитие и функционирование организма благодаря содержанию в ней информации о последовательностях всех клеточных РНК и белков.

Структура цепи ДНК, представляющая у большинства организмов двойную спираль (исключениями являются некоторые вирусы, содержащие одноцепочечную ДНК) обеспечивается за счет ковалентных связей между дезоксирибозой и остатками фосфорной кислоты сахарофосфатного остова, а так же водородных связей между азотистыми основаниями, ориентированными друг против друга по принципу комплементарности. Молекулярная структура ДНК – правозакрученная двойная спираль (рисунок 1) – стабилизируется молекулами воды и ионами металлов.

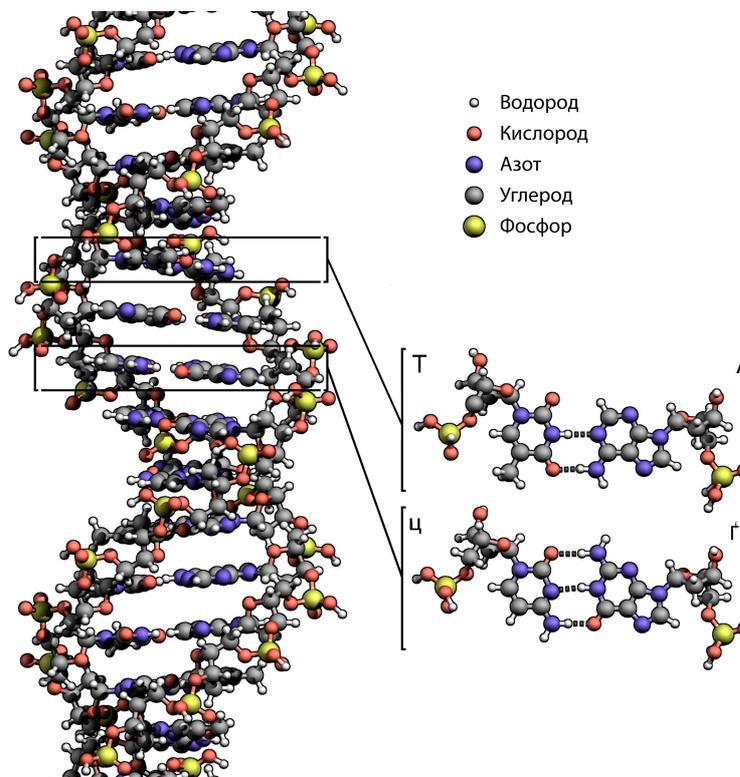


Рисунок 1. Структура ДНК. Отдельно показаны нуклеотидные пары Т – А, Ц – Г, иллюстрирующие принцип комплементарности.

Транскрипция ДНК представляет собой важнейший процесс, обеспечивающий как жизнедеятельность клеток организма, так и передачу генетического материала от клетки к клетке. Регуляция транскрипции обеспечивается постоянными взаимодействиями макромолекулы ДНК с различного рода молекулами и молекулярными комплексами - факторами ремоделирования хроматина. Взаимодействия ДНК с лигандами-регуляторами могут приводить как к облегчению процесса транскрипции, так и к ее блокировке. Кроме того, замедление и остановка транскрипции как *in vivo*, так и *in vitro* может происходить в случае нарушений последовательности ДНК (в частности, однонитевые разрывы), при взаимодействии ДНК с молекулами-блокаторами транскрипции (например, некоторые антибиотики), в условиях дефицита субстрата - нуклеотидов в системе, а так же в ходе преодоления ферментами-полимеразами нуклеосомного барьера. Значимость процессов транскрипции для клеточной жизнедеятельности и метаболизма диктует необходимость понимания структурных характеристик динамических интермедиатов транскрипции.

### **Природа взаимодействий ДНК с молекулами-лигандами**

Взаимодействия ДНК с лигандами любой природы (с ионами, низкомолекулярными молекулами антибиотиков, высокомолекулярными соединениями, такими как ферменты-полимеразы, структурными элементами хроматина - нуклеосомами) обеспечивается взаимодействиями четырех типов:

- Электростатическими (молекулы ДНК являются полианионами, что обеспечивает сильные кулоновские взаимодействия с положительно заряженными лигандами);
- Силами Ван-дер-Ваальса (описываемыми потенциалом Леннард-Джонса);
- Водородными связями (в том числе обеспечивающими упорядоченность молекул ДНК);
- Гидрофобными взаимодействиями (проявляются при стэкинг-взаимодействиях, в том числе с молекулами-интеркаляторами, при образовании надмолекулярной структуры хроматина, при образовании макромолекулярных комплексов с лигандами и т.д.).

### **Особенности взаимодействий ДНК с молекулами-лигандами и их роль в регуляции транскрипции**

В образовании биологически активной структуры нуклеиновых кислот существенное участие принимают низкомолекулярные вещества, такие как ионы металлов и химические соединения различной природы. Некоторые из этих веществ, находясь в микроколичествах в клетке, влияют на структурные характеристики нуклеиновой кислоты (НК), вызывают одно- и двунитевые разрывы в ДНК, блокируют синтез белка и приводят к генетическим аномалиям, нарушая процессы расшифровки и передачи генетической информации (репликацию, транскрипцию и трансляцию) [Благой, 1988]. Эти факторы часто используются при создании

новых лекарственных препаратов противомикробного, противовирусного, противоопухлевого действия.

К биологически-активным веществам, являющимися мутагенами ДНК и канцерогенами, относятся ионы меди, марганца, никеля и некоторых других металлов, они способны вызывать повреждения ДНК, приводящие к нарушению пролиферативных свойств клеток и неконтролируемому делению.

К другому типу молекул-лигандов ДНК относятся низкомолекулярные органические молекулы красителей, антибиотиков и противоопухлевых препаратов, которые по типу взаимодействия можно принципиально разделить на два класса: вещества с преимущественно цепной структурой молекул [Благой, 1988] (при связывании с ДНК укладываются в бороздки на ее поверхности, взаимодействуя с фосфатными группами и атомами оснований) и молекулы-интеркаляторы (встраиваются между парами оснований ДНК, раздвигают их и деформируют структуру двойной спирали). В результате взаимодействий с лигандами происходит изменение физико-химических и механических свойств молекулы ДНК (стабилизация структуры, деформации спирали, изменение ее гибкости, изменение расстояний между азотистыми основаниями), вследствие чего может происходить нарушение взаимодействий ДНК с ферментами – участниками транскрипции, приводя к ее блокировке, что позволяет использовать такие молекулы в терапевтических целях. К таким молекулам-блокаторам транскрипции относятся, например, дистамицин и актиномицин (содержит феноксазиновую группу - интеркалятор).

Структура ядерного хроматина представляет собой комплекс высокомолекулярной ДНК с органическими макромолекулами-лигандами – гистонами и негистоновыми белками. Структурная роль хроматина обеспечивает доступность ДНК ферментным системам клетки, реализуя природный механизм регуляции активности генов; при этом замедление и полная остановка транскрипции может наблюдаться на этапе прохождения фермента-полимеразы через нуклеосому, поэтому она так же может считаться молекулой-регулятором транскрипции ДНК. Так как процессы транскрипции и их регуляция, в том числе с участием разного рода лигандов, лежат в основе жизнедеятельности клетки, исследование особенностей взаимодействия ДНК с лигандами представляют интерес и были выбраны для исследования в рамках данной диссертационной работы.

### **Реализация генетического материала в эукариотической клетке**

Реализация генетического материала в клетке происходит по схеме ДНК – РНК – белок, и включает в себя синтез ряда РНК, служащих либо матрицами для синтеза белка, либо являющихся элементами аппарата белкового синтеза. Процесс синтеза различных типов РНК на

матрице ДНК с участием нескольких типов ферментов РНК-полимераз называется транскрипцией.

Существуют пять типов РНК, различающиеся между собой по функциям, времени жизни и по типу синтезирующей РНК-полимеразы. Информационные РНК (иРНК), они же матричные РНК (мРНК) – самые разнообразные по размеру, строению нуклеотидных последовательностей, самые короткоживущие. Они составляют около 10% от массы всех РНК клетки. иРНК синтезируются при участии фермента РНК-полимеразы II, образующей первичную копию любого гена, кодирующего белок. Так же РНК-полимераза II участвует в синтезе малых ядерных РНК (мяРНК), содержание которых не превышает 5% от общей массы всех РНК в клетке, однако более стабильных и долго живущих. мяРНК в составе рибонуклеопротеидных частиц участвуют в сплайсинге иРНК. Так же мяРНК входят в состав теломераз, сплайсосом и т.д. Рибосомальная РНК (рРНК) и трансферная РНК (тРНК) относятся к аппарату белкового синтеза. рРНК, самые многочисленные в клетке и относительно стабильные, синтезируются ферментом РНК-полимеразы I. Фермент РНК-полимеразы III синтезирует 20 тРНК, тоже относительно стабильные, и одну рРНК (5S РНК). Пятый тип РНК – митохондриальные РНК (митРНК) синтезируются в митохондриях независимо от ядра.

### **Транскрипция нерибосомных генов**

Синтез иРНК при участии РНКП II начинается со стартовой точки транскрипционной единицы и кончается в точке терминации. Образующаяся при этом молекула-транскрипт является предшественником иРНК и подвергается затем дальнейшим модификациям.

Структура эукариотической ДНК гетерогенна и состоит из чередующихся участков – экзонов и интронов. Экзоны содержат кодирующую информацию, которая войдет в состав иРНК. Интроны содержат последовательности, не входящие в состав иРНК. Первичный транскрипт содержит полную копию гена, включает комплементарные копии как экзонов, так и интронов, которые впоследствии вырезаются из первичного транскрипта. Концы фрагментов РНК, комплементарные экзонам, затем сшиваются в ходе процесса сплайсинга с образованием иРНК.

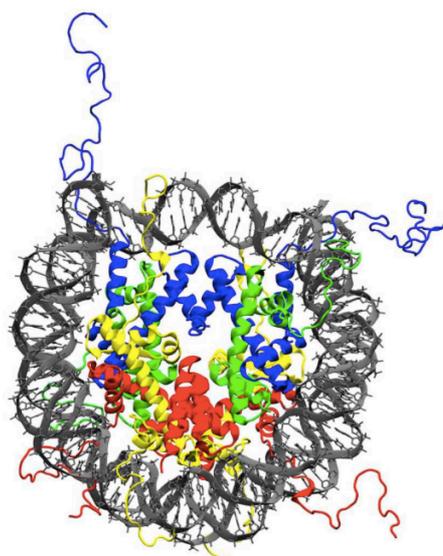
## **1.2 Структура хроматина**

Ядерная ДНК клеток эукариот находится в комплексе с гистоновыми и негистоновыми белками, образуя хроматин. Белки обеспечивают сверхспирализацию и компактизацию ДНК, а также процессы репликации, транскрипции, репарации и рекомбинации. Регуляция перечисленных процессов осуществляется, в том числе, и структурной функцией белков хроматина, а так же хроматин-ремоделирующих факторов (ФРХ) [Clapier&Cairns, 2009; Vignali

et al., 2000], обеспечивающих доступность тех или иных участков ДНК в ходе соответствующих процессов.

### Нуклеосома

Основной структурной единицей хроматина является нуклеосома, состоящая из фрагмента ДНК длиной 146 пар нуклеотидов, образующего 1,75 витка, накрученного на октамер гистонов H2A, H2B, H3 и H4. Гистоновый октамер состоит из центрального тетрамера (H3-H4)<sub>2</sub>, окруженного двумя димерами H2A/H2B (рисунок 2). Пространственная структура нуклеосомы – шайба, или плоский цилиндр диаметром 11 нм и высотой 5,7 нм [Kornberg&Thomas, 1974; Luger et al, 1997]. Структурная целостность данного комплекса обеспечивается межмолекулярными взаимодействиями гистонов: связывание димеров H3-H4 обеспечивается взаимодействиями гистонов H3, а связывание тетрамера (H3-H4)<sub>2</sub> с димерами H2A/H2B – взаимодействиями между H4 и H2B гистонами. Молекулярная масса нуклеосомы составляет около 215 кДа.



**Рисунок 2.** Гистоны H2A выделены желтым, H2B – красным, H3 – синим, H4 – зеленым. Изображены альфа-спирали и N-концы гистонов [Davey et al., 2002].

Длина линкерной ДНК между нуклеосомами составляет в среднем около 60 пар нуклеотидов. К этому участку присоединена молекула гистона H1. Процессы, связанные с изменением состава гистонического октамера («обмен/потеря гистонов») и их модификации, играют существенную роль в контроле экспрессии генов, формировании эпигенетической памяти клетки, регуляции процессов транскрипции и репарации. Особую роль выполняют N-концевые участки, наиболее часто подвергающиеся посттрансляционным модификациям: они практически не структурированы и выходят за границу нуклеосомы, обеспечивая взаимодействия с ДНК и различными белковыми факторами [Arents&Moudrianakis, 1995].

Перестройки хроматина, сборка и разборка нуклеосом сопровождают все процессы, происходящие с участием генетического материала в клетке.

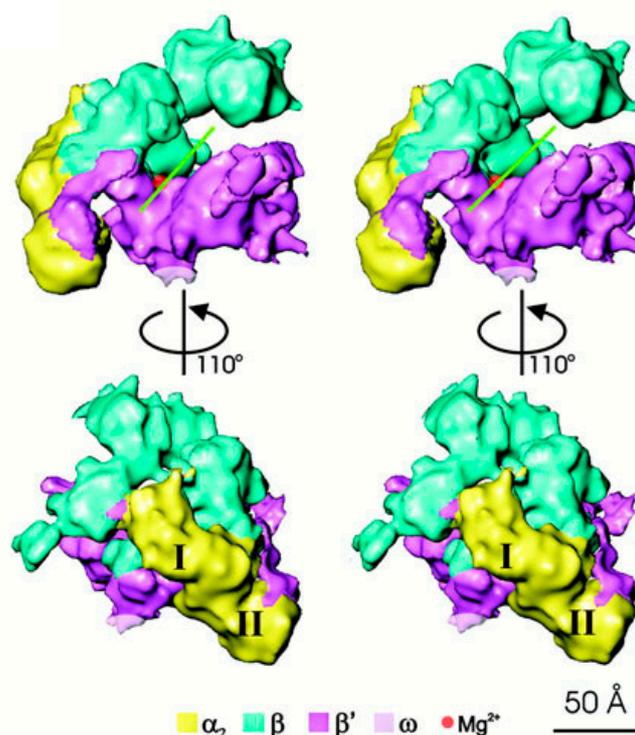
### **РНК-полимеразы**

РНК-полимеразы – мультисубъединичные молекулы-ферменты, синтезирующие РНК по одной из цепей матричной ДНК. У прокариот все типы РНК синтезируются одним ферментом – прокариотической РНК-полимеразой. В эукариотических клетках встречается пять типов РНК. Большой на несколько порядков размер генома, клеточная спецификация и более сложная клеточная организация обуславливают большую специфичность процессов транскрипции, с чем связано существование нескольких типов РНК-полимераз.

ДНК зависимая РНК-полимераза, ключевой фермент процесса транскрипции, является мишенью для многих регуляторных путей, контролирующих экспрессию генов в клетках всех живых организмов.

#### РНК-полимераза *E. Coli*

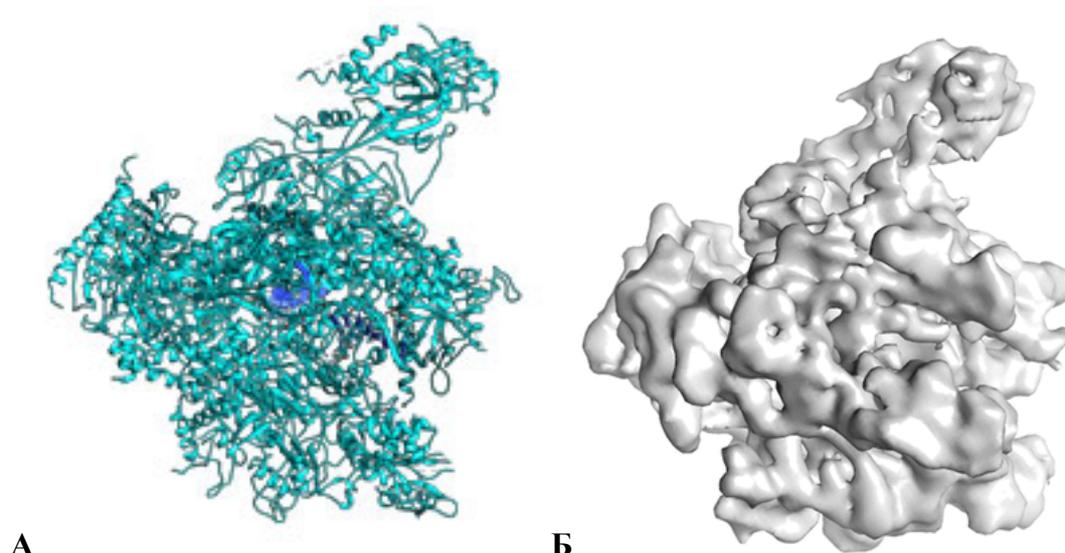
Общая схема строения прослеживается для всех ДНК-зависимых РНК-полимераз прокариот и эукариот. Голоэнзим РНК-полимеразы *E. Coli* состоит из «корового» фермента и сигма-фактора. «Коровый» фермент включает 5 субъединиц ( $\beta\beta'\alpha_2\omega$ ), он обладает каталитической активностью, но не способен распознавать точку начала транскрипции, для этого требуется сигма-фактор [Murakami&Darst, 2003; Jun et al., 2013]. Трехмерная структура корового фермента РНКП *E. Coli*, полученная методом крио-электронной микроскопии, представлена на рисунке 3. Общая архитектура всех существующих к настоящему моменту структур ДНК-зависимых РНК-полимераз оказалась консервативной: область актинового центра внешне напоминает клешню и характеризуется наличием иона магния и консервативными мотивами. На основании кристаллографических данных в 3D-структуре РНК-полимераз выделяют «спиральный мостик» (bridge helix), разделяющий «основной» и «вторичный» каналы (main, secondary channels), «петлю-триггер» для синтеза и отделения РНК (trigger loop) и «переключатели» для размещения ДНК и РНК в активном центре фермента [Fernandez-Tornero et al., 2013; Engel et al., 2013; Cramer et al., 2001; Hirata et al., 2008; Murakami, 2015].



**Рисунок 3.** Трехмерная структура РНКП *E. Coli* (разрешение 11 Å, крио-ПЭМ), слева и справа представлены две идентифицированные конформации. Соответствующие субъединицы отмечены различными цветами:  $\alpha$ -субъединицы желтым (I и II),  $\beta$ -субъединица голубым,  $\beta'$ -субъединица фиолетовым,  $\omega$ -субъединица розовым. Зеленой линией показан «основной» канал [Finn et al., 2000].

### РНК-полимераза II

В зависимости от своего происхождения, эукариотическая РНК-полимераза II состоит из 10-14 субъединиц с молекулярной массой от 10-220 кДа, и характеризуется общей молекулярной массой около 550 кДа. Функциональные домены, соответствующие отдельным субъединицам, функционально и гомологически сходным доменами РНКП *E. Coli*. Существующая кристаллическая структура РНКПIII характеризуется практически атомным разрешением [Meyer et al., 2006; Amarche et al., 2005] (рисунок 4). Для связывания РНК-полимеразы II с промотором и начала транскрипции необходим набор белков – основных факторов транскрипции (GTFs) [Darst et al., 1991; Woychik and Young, 1990]. Пять из них необходимы для транскрипции РНКПIII в системе *in vitro* [Buratowski et al., 1989]. Так как транскрипция РНКПIII *in vitro* сложна технически, в модельных системах вместо нее часто используется РНКП *E. Coli*, так как она характеризуется аналогичным механизмом транскрипции и сходной архитектурой, что и РНКПIII [Kulaeva et al., 2009; Bondarenko et al., 2006; Fu et al., 1999; Mustaev, 2001; Cramer et al., 2001 Sidorenkov et al., 1998; Kireeva et al., 2000, 2002; Gnatt et al., 2001, Walter et al., 2003].



**Рисунок 4.** Трехмерные структуры РНК-полимеразы II (*Saccharomyces cerevisiae*). А – кристаллическая структура с разрешением 3,8 Å [Amarche et al., 2005; PDB 1WCM]; Б – 3D-структура из крио-ПЭМ с разрешением 7,2 Å [Martinez-Rucobo et al., 2015; EMDB EMD-2923].

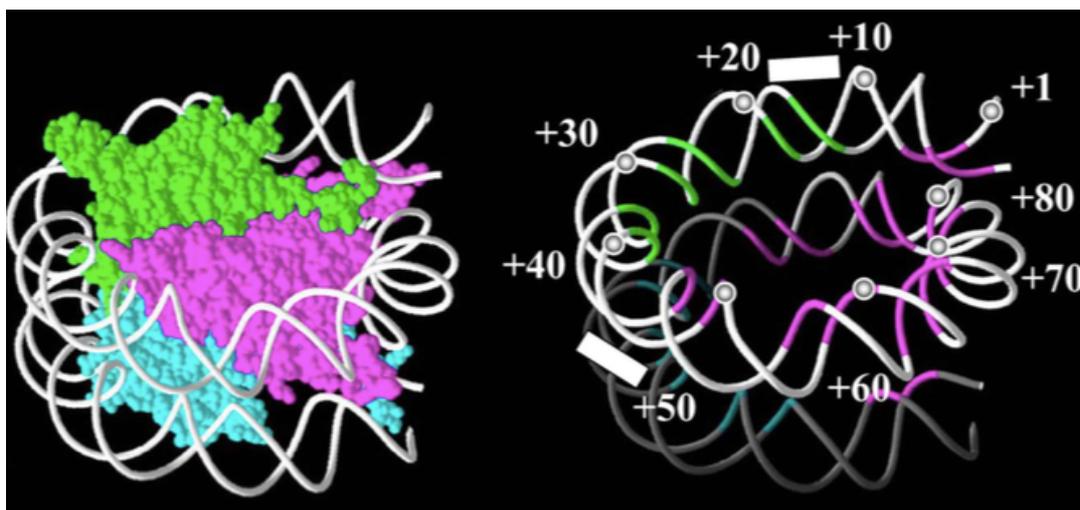
#### **Механизм транскрипции одиночной РНКПШ, нуклеосомные барьеры**

Механизм транскрипции РНКПШ у различных организмов консервативен [Кулаева и др., 2013]. В ходе транскрипции РНКПШ делает полный оборот каждые 10 п.н. вдоль спирали ДНК, продвигаясь через сильно компактизованную структуру хроматина [Кулаева и др., 2013; Gnatt et al. 2001]. Нуклеосомная упаковка хроматина существенно затрудняет доступ ферментов и факторов транскрипции к ДНК, а также движение транскрибирующей РНКПШ [Boeger et al., 2008; Kim&O'Shea, 2008]. Нуклеосома в позиции (+1), с которой сталкивается РНКПШ в начале транскрибируемой области гена, является одним из основных факторов регуляции транскрипции [Weber et al., 2014, Mavrich et al., 2008], столкновение с ней приводит к временному падению скорости транскрипции [Gilchrist et al., 2010]. После преодоления (+1)-нуклеосомного барьера скорость транскрипции возрастает до 3-4 т.п.н./мин., что соответствует скорости транскрипции свободной от гистонов ДНК [Izban&Luce, 1992].

В ходе дальнейшей транскрипции гена преодоление нуклеосомных барьеров может сопровождаться частичным временным нарушением ДНК-гистоновых взаимодействий. При умеренной транскрипции полной потери нуклеосом не наблюдается, однако происходит временное вытеснение димера гистонов H2A/H2B с образованием «гексасомы» [Kireeva et al., 2002], сопровождающееся образованием небольших внутрнуклеосомных петель с последующим восстановлением исходной структуры нуклеосомы до начала следующего акта транскрипции [Кулаева и др., 2013]. Во время транскрипции РНКПШ *in vitro* от 50 до 95%

нуклеосом сохраняются в виде «гексасомы», остающейся на исходной позиции ДНК [Kireeva et al., 2002]. Обмена гистонов H3/H4 при этом не происходит [Thiriet&Hayes, 2005; Dion et al., 2007; Ruflange et al., 2007]. Помимо частичной потери гистонов, транскрипция способна вызывать частичное разворачивание гистонового октамера, приводя к появлению на поверхности нуклеосом на транскрибируемых генах реакционноспособных SH-групп [Chen&Allfrey, 1987; Chen et al., 1991; Prior et al., 1983], что сопровождает ход транскрипции [Chen&Allfrey, 1987; Chen et al., 1991; Walia et al., 1998].

Транскрипция нуклеосомной ДНК сопровождается временным замедлением РНКП ( «паузироваием» в определенных позициях) [Bondarenko et al., 2006]. Два участка «паузирования» находятся в положениях активного центра фермента приблизительно на расстоянии 15 и 45 п.н. от проксимальной к промотору границы нуклеосомной ДНК и независимо от последовательности транскрибируемой ДНК движение РНКП в данных областях замедлено. Предполагаемой причиной возникновения барьеров является существование участков повышенной аффинности гистонов к последовательности ДНК [Bondarenko et al., 2006]. Положение в области  $\sim(+45)$  для большинства последовательностей оказывается наибольшим барьером, определяющим общую скорость транскрипции через нуклеосому [Kireeva et al., 2002; Bondarenko et al., 2006], а высота этого барьера определяется взаимодействиями ДНК-гистон на участке  $(+60)\text{--}(+80)$  нуклеосомной ДНК [Hsieh F.K. et al., 2010]. Кроме того, на высоту  $\sim(+45)$  нуклеосомного барьера влияет введение мутаций в области  $(+85)\text{--}(+95)$ , названной «областью высокой аффинности» (High affinity) [Kulaeva et al., 2009]. Замедление движения происходит в тот момент, когда передняя граница РНКП попадает в область сильных взаимодействий ДНК-гистон (примерно на 10-20 пар нуклеотидов перед активным центром фермента, более 40 п.н. в случае области высокой аффинности). Всего описано три таких участка сильных ДНК-гистоновых взаимодействий  $(+25)\text{--}(+35)$  (предположительно данный участок является причиной замедления РНКП в области  $\sim(+15)$ );  $(+60)\text{--}(+80)$  и  $(+115)\text{--}(+125)$  [Hall et al., 2009], участки картированы на рисунке 5. Наличие участков замедления предполагает возможность существования дополнительного механизма регуляции транскрипции [Кулаева и др., 2013].

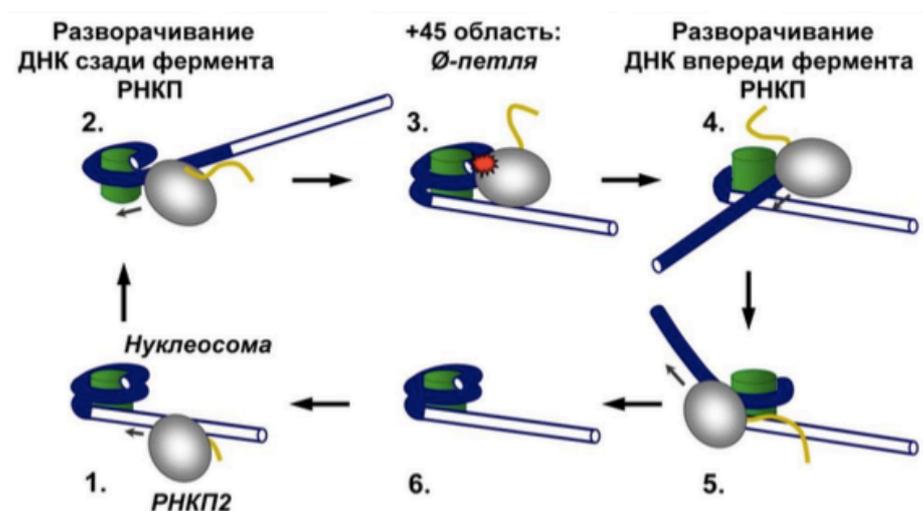


**Рисунок 5.** Изображения нуклеосомы (слева) и нуклеосомной ДНК. На правой части изображения картированы участки высокой аффинности (серые линии), определяющие высоту нуклеосом-специфичных барьеров (отмечены белыми линиями). Гистоны тетрамера нуклеосомы отмечены разными цветами на левой части изображения, на правой аналогичными цветами выделены области взаимодействия соответствующих гистонов с ДНК [Bondarenko et al., 2006].

### **Молекулярные механизмы преодоления нуклеосомного барьера РНКПШ**

Пошаговый механизм прохождения РНКПШ через нуклеосому представляет собой сложный процесс, сопровождающийся многочисленными структурными перестройками. Транскрипция нуклеосомной ДНК РНКПШ сопровождается многочисленными структурными перестройками: временной потерей димера гистонов H2A/H2B, образованием внутринуклеосомных петель и др. Эти процессы до конца не исследованы и требуют дальнейшего пристального изучения с использованием различных методов. В данной работе элонгационные комплексы (ЭК) были выбраны объектами исследования методами электронной микроскопии макромолекул для получения сведений о пространственной структуре формирующихся интермедиатов.

Упрощенная схема транскрипции нуклеосомной ДНК представлена на рисунке 6:



**Рисунок 6. Схема транскрипции нуклеосомной ДНК (пояснения в тексте) [Kulaeva et al., 2009].**

Приближение РНКПШ к нуклеосоме и начальный этап их взаимодействия сопровождается частичным разворачиванием дистального участка ДНК (участка ДНК позади РНКП) от гистонового октамера [Kulaeva et al., 2009] (изображения под номерами 1 и 2 на схеме рисунка 6).

Попадание РНКПШ в барьерные зоны высокой аффинности ДНК и гистонов в областях (+60)-(+80) и (+85)-(+95) сопровождается нарушением взаимодействий ДНК-гистон на этих участках и разворачиванием соответствующих участков ДНК, а так же образованием  $\emptyset$ -петли (нулевой петли) в положении (+49) активного центра РНКПШ (изображение 3 на рисунке 6).  $\emptyset$ -петля представляет собой внутринуклеосомную петлю очень маленького размера, из-за чего она и получила такое название. В комплексе (+49) сохраняются «претранскрипционные» ДНК-гистоновые взаимодействия в областях перед и позади транскрибирующей полимеразы [Кулаева и др., 2013].

Характерными особенностями комплекса с  $\emptyset$ -петлей являются [Kulaeva et al., 2009]:

- 1) Практически полное обращение поверхности РНКПШ в раствор и отсутствие ее пространственного перекрытия с гистоновым октамером нуклеосомы;
- 2) Изгиб дистальной к промотору ДНК под углом  $90^\circ$  в направлении поверхности октамера, облегчающий образование петли;
- 3) Участок ДНК-гистоновых контактов позади РНКП длиной около 20 п.н. (участок, пересекающийся с первой зоной высокой аффинности в нуклеосоме (+25)-(+35)) стабилизирует петлю;
- 4) Образование  $\emptyset$ -петли сопровождается вытеснением участка  $\geq 50$  п.н., дистального по отношению к промотору конца ДНК нуклеосомы, уменьшает область контактов ДНК-гистон

по направлению движения фермента, возможно, облегчая дальнейшее прохождение РНКПШ через нуклеосому (изображение 4 на рисунке 6). В составе вытесняемого участка находится так же регуляторная область НА высокой аффинности (+85)-(95), способная препятствовать вытеснению этого участка длиной 50 п.н., блокируя РНКПШ в положении  $\sim(+45)$ .

Формирование нулевой петли происходит медленно и лимитирует скорость прохождения транскрипции через нуклеосому [Kulaeva et al., 2009]. Структура  $\emptyset$ -петли в положении (+49) обязательно должна сопровождаться вытеснением одного витка нуклеосомной ДНК. Образование петли и вытеснение витка облегчает преодоление барьера РНК-полимеразой (изображение 5 на рисунке 6), после чего происходит восстановление исходной структуры нуклеосомы (изображение 6 на рисунке 6).

В ходе прохождения РНКПШ через нуклеосому  $\emptyset$ -петля формируется по меньшей мере дважды: в положениях (+39) и (+49) [Hsieh F.K. et al., 2010; Kulaeva et al., 2009]. Формирование внутринуклеосомных топологически закрытых петель ДНК приводит к накоплению положительной суперспирализации ДНК впереди РНКП, что может являться причиной разворачивания гистонового октамера в процессе транскрипции [Кулаева и др., 2013]. Перемещение РНКПШ на 1 нуклеотид приводит к ее повороту вокруг оси ДНК приблизительно на  $36^\circ$ ; в результате происходит пространственное столкновение РНКП и гистонового октамера. В комплексе  $\emptyset$ -петли приблизительно 20 п.н. контактов ДНК-гистон заменяются электростатическими взаимодействиями, что обеспечивается присутствием в активном центре РНКПШ области с сильным отрицательным зарядом, локализуемой в непосредственной близости к положительно заряженной области гистонов [Кулаева и др., 2013].

#### Потеря димера H2A/H2B

Потеря (вытеснение) димера гистонов H2A/H2B в ходе преодоления нуклеосомного барьера РНКПШ в положении  $\sim(+45)$  [Kulaeva et al., 2009], связана с формированием  $\emptyset$ -петли и включает в себя согласованное образование ДНК-гистоновых взаимодействий позади РНКП и диссоциацию ДНК от октамера перед РНКП, в результате чего происходит сохранение позиции нуклеосомы во время транскрипции [Kulaeva et al., 2009]. Удаление различных димеров гистонов H2A/H2B имеет функционально противоположные последствия: удаление дистального димера приводит к освобождению дистального к промотору участка нуклеосомной ДНК в раствор и облегчает образование  $\emptyset$ -петли и транскрипцию через нуклеосомный барьер. Удаление же проксимального к промотору димера приводит к удалению ДНК-связывающего сайта позади полимеразы, что вызывает дестабилизацию  $\emptyset$ -петли и остановку РНКПШ [Kulaeva et al., 2009].

### Анализ нуклеосомного барьера в области +(40-50)

Общий уровень экспрессии может определяться преодолением нуклеосомных барьеров в ходе транскрипции хроматина. Наиболее значимыми барьерами являются (+1) нуклеосома и нуклеосомный барьер в +(40-50) проксимальной к промотору области нуклеосомы. Данный барьер является специфичным для нуклеосомы и РНКПШ и обнаруживается у всех организмов от дрожжей до человека [Izban&Luse, 1991; Bondarenko et al., 2006; Kireeva et al., 2005]. Таким образом, область +(40-50) является «универсальным» индивидуальным барьером, который может быть использован в целях генной регуляции на этапе элонгации транскриптов [Bondarenko et al., 2006]. В зависимости от последовательности ДНК, барьер может располагаться в различных позициях области +(40-50), хотя часто он локализован в области близкой к положению  $\sim(+45)$  [Kireeva et al., 2002; Bondarenko et al., 2006]. Модельными объектами исследования транскрипции нуклеосомной ДНК являются моонуклеосомы, ДНК которых представляет собой определенную нуклеосом-позиционирующую последовательность (НПП), характеризующуюся высоким сродством к гистоновому октамеру [Lowary and Widom, 1998; Thastrom et al., 1999]. В основном работают с несколькими НПП, моонуклеосомы с которыми наиболее стабильны *in vitro*: так называемые последовательности 601 и 603 (названия даны по порядковому номеру исследуемой в работе рандомной последовательности) [Lowary and Widom, 1998]. Исследование механизмов преодоления нуклеосомных барьеров в ходе транскрипции представляет интерес, вследствие чего много работ посвящено исследованиям транскрипции моонуклеосом с различными НПП *in vitro*. В нашей работе показано [Gaykalova, Volokh et al., 2015], что для нуклеосом-позиционирующей последовательности 603 преодоление наиболее сильного барьера, расположенного в области +(46-48), сопровождается отбрасыванием обратно (в направлении против хода транскрипции) и остановкой РНКПШ в положении (+42) активного центра. В связи с потенциальным интересом использования данной области в качестве регуляторной, практическое значение имеет понимание молекулярных механизмов образования и преодоления барьера транскрипции в данной области. В данной работе элонгационный комплекс в положении +42 активного центра РНКП *E. Coli* был выбран в качестве объекта исследования методами электронной микроскопии.

### **Механизмы транскрипции РНКПШ *in vivo***

Транскрипция хроматина *in vivo* представляет собой сложный процесс, протекающий с привлечением многих белковых факторов и комплексов, сопровождающийся структурными и биохимическими изменениями. При транскрипции *in vivo* РНКПШ останавливается вскоре после инициации на промоторе [Guenther et al., 2007; Zeitlinger et al., 2007; Mavrich et al., 2008]. Длина вновь синтезируемого транскрипта РНК при этом составляет не более 100 н. [Core&Lis,

2008; Price, 2008; Nechaev&Adelman, 2008; Gilmour, 2009; Adelman, 2012]. (+1)-нуклеосома, расположенная ниже точки начала транскрипции, представляет собой высокий барьер для РНКПШ и может выступать регуляторным элементом. Активация транскрипции и преодоление барьера могут происходить при участии элонгационного фактора TFIIIS, фактора-шаперона гистонов FACT, комплексов ремоделирования хроматина, удалении факторов репрессии DSIF и NELF, двух последовательно идущих РНКП, а также при ацетилировании N-концевых хвостов гистонов. Продолжение транскрипции, происходящее после преодоления нуклеосомного барьера, требует участия АТФ-зависимых факторов ремоделирования хроматина (ФРХ), факторов транскрипции, гистоновых шаперонов и ферментов модификации гистонов [Selth et al., 2010; Wittschieben et al., 1999].

Существуют несколько сценариев транскрипции генов РНКПШ *in vivo*:

- В случае низкого или умеренного уровня транскрипции единичными молекулами РНКПШ процесс сопровождается временным вытеснением димера H2A/H2B и сохранением нуклеосом в виде гексасом, а так же формированием внутринуклеосомных петель. Исходная структура нуклеосом восстанавливается до начала следующего акта транскрипции РНКПШ;
- В случае высокого уровня транскрипции, расстояние между транскрибирующими ферментами РНКПШ сокращается, происходят столкновения с гексасомами и их вытеснение с ДНК и обмен всех гистонов.

### **1.3 Поддержание постоянства генетического материала**

Генетический материал постоянно подвергается воздействиям как внешней, так и внутренней среды, в результате чего появляются повреждения в структуре ДНК. Процессы репарации ДНК направлены на устранение образующихся нарушений, однако в случае некорректной работы системы репарации может происходить накопление нарушений. Накопление нарушений, в свою очередь, ведет к развитию различных патологий, в том числе тяжелых нарушений метаболизма или развитию онкологических заболеваний [Christmann et al., 2003]. Ранее предполагалось, что в упакованной в хроматин ДНК репарация должна сопровождаться временной делокализацией гистонов с участка ДНК. В настоящий момент есть свидетельства в пользу влияния структуры хроматина на репарационный ответ в виде ограничения его распространения, изменения активности ферментов репарации и т.д. [Christmann et al., 2003].

## **1.4 Факторы, способные приводить к остановке транскрипции**

### **Остановка транскрипции молекулами-лигандами ДНК**

Нарушения транскрипции лежат в основе многих патологических процессов, и могут быть следствием нарушения процессов регуляции или накопления мутаций (в частности таких, как однонитевые разрывы ДНК). Часто в терапевтических целях назначаются препараты-блокаторы транскрипции, являющиеся низкомолекулярными лигандами ДНК. Такие молекулы относительно специфически взаимодействуют с молекулой ДНК, меняя ее свойства и препятствуя, таким образом, транскрипции. Как было описано ранее, низкомолекулярные органические лиганды способны благодаря своей структуре взаимодействовать с ДНК (располагаясь в желобе молекулы или интеркалируя между азотистыми основаниями), препятствуя перемещению ферментов-полимераз вдоль цепи, блокируя таким образом процесс транскрипции. Данное свойство широко используется в терапевтической практике и лежит в основе лечения онкологических заболеваний. Примером широко используемого в медицинской практике антибиотика, функционирующего по механизму избирательного подавления синтеза нуклеиновых кислот, является актиномицин.

Взаимодействия с лигандами влияют на механические свойства нуклеиновых кислот. В отдельной части этой работы комплексы ДНК с актиномицином были выбраны в качестве модельных объектов для апробации метода молекулярной динамики в отношении исследования особенностей влияния лигандов на механические свойства ДНК (Приложение 1). Данный подход был избран, так как модельные объекты – комплексы ДНК с производными актиномицина Д представляют собой хорошо изученные системы, что дает возможность сопоставить получаемые результаты вычислительных экспериментов с литературными данными, полученными при исследовании другими методами, для оценки адекватности получаемых значений и информативности исследуемых подходов.

### **Роль однонитевых разрывов ДНК в остановке транскрипции**

Чаще всего при повреждении молекулы ДНК наблюдаются однонитевые разрывы. Они возникают ежедневно под действием внешних и внутренних факторов. Физико-химическими причинами их возникновения являются, как правило, либо спонтанный гидролиз ковалентных связей, либо воздействие активных форм кислорода.

Нарушения процессов клеточного метаболизма могут приводить к накоплению однонитевых разрывов [Bradley&Kohn, 1979; Pogozelski&Tullius, 1998; Wang, 2002; Demple&DeMott, 2002; Hegde et al., 2008], в больших количествах препятствующих процессам транскрипции, репликации и репарации. Некорректное функционирование данных процессов

приводит, в свою очередь, к нарушению процессов клеточного деления и метаболизма, и, как следствие, к потенциальным рискам развития онкологических и нейродегенеративных заболеваний. В активно делящихся клетках накопление однонитевых разрывов может вызывать возникновение двунитевых, влияя на нестабильность генома или приводя к запуску патологических процессов.

Процесс удаления однонитевого разрыва, или эксцизионная репарация, начинается с детекции нарушения. Сенсором однонитевых разрывов служит белок PARP1, присутствующий в клеточном хроматине независимо от наличия повреждений постоянно и в большом количестве [Ludwig et al., 1998]. В норме обнаруженный разрыв легко удаляется по пути эксцизионной репарации [Le Cam et al., 1994; Weinfeld et al., 1997; Caldecott, 2008, 2014] с привлечением белков, восстанавливающих целостность нуклеотидной цепи.

Организация ДНК в надмолекулярные структуры способна защищать ее от разрушающих воздействий. Большие фрагменты нуклеосомной ДНК, становятся недоступными не только для нуклеаз [Noll, 1974; Wigler&Axel, 1976], но и для небольших атакующих агентов, таких как гидроксильные радикалы [Hayes et al., 1990]. В хроматине нуклеосомы являются стабильными структурами, и сохраняются даже при значительных изменениях в структуре ДНК [Odell et al., 2013]. Экранирование ДНК в хроматине, защищающее от взаимодействия со средой, оказывается и негативным фактором, препятствующим сканированию ДНК на предмет нарушений и репарации повреждений. Это может приводить к накоплению большего количества мутаций в участках конденсированного хроматина, по сравнению с активно транскрибируемыми участками [Teytelman et al., 2008; Schuster-Böckler&Lehner, 2012]. Показано, что эффективность репарации PARP1 нуклеосомной ДНК по меньшей мере на порядок ниже, чем участков, свободных от гистонов [Clark et al., 2012]. Некоторые не поддающиеся детекции разрывы обнаруживаются ферментами, перемещающимися вдоль ДНК. Разрывы матричной цепи ДНК блокируют транскрипцию РНКПШ *in vivo* и *in vitro* [Zhou&Doetsch; 1993; Kathe et al., 2004]. Остановка РНКПШ в этом случае служит сигналом для запуска эксцизионной репарации, ассоциированной с транскрипцией. Разрывы, локализованные в нематричной цепи, существенно не влияют на транскрипцию свободной от гистонов ДНК *in vitro* [Belotserkovskii et al., 2013] и эффективно удаляются *in vivo* [Bielas, 2006; Dorazi et al., 2007].

Протекторные свойства ДНК-связывающих белков приводят к тому, что частота возникновения повреждений выше в менее конденсированном хроматине [Strand et al., 2014]. Однако благодаря большей доступности их системам репарации, общий уровень мутаций в них

ниже [Teytelman et al., 2008; Schuster-Böckler&Lehner, 2012]. Следовательно, больше мутаций оказывается в высоко контролируемых генах, что ставит под угрозу строго регулируемые процессы и несет существенный риск развития нарушений, повышая значимость роли транскрипционно-зависимой эксцизионной репарации. Сигналом для ее запуска служит остановка РНКП. В случае умеренно транскрибируемых генов, происходит сохранение нуклеосомы (гексасомы) на ДНК, что обращает внимание на важность понимания процессов транскрипции через нуклеосому и преодоления односторонних разрывов в данной области.

В работе Герасимовой Н. [2015] было показано, что одиночные разрывы нематричной цепи ДНК способны приводить к нуклеосом-специфичной остановке РНКП *E.Coli* после преодоления ферментом участка разрыва, на расстоянии порядка 7-12 п.н. от него. Также были определены три позиции остановок в положениях РНКП (+24), (+34) и (+44), то есть 10-п.н. периодичность. Была выдвинута гипотеза о том, что причиной остановки является формирование внутринуклеосомных петель. Для дальнейшего понимания и большей детализации процессов транскрипции через нуклеосому необходимы структурные данные и моделирование системы *in silico*. Поэтому комплекс (+24) был выбран для исследования методами структурной биологии и молекулярного моделирования. В данной работе модельный элонгационный комплекс (+24) РНКП *E. Coli* с моонуклеосомой был исследован методами электронной микроскопии негативного контрастирования с последующим докингом кристаллографических трехмерных структур в электронную плотность, полученную путем трехмерной реконструкции данных. Методом молекулярной динамики исследовалось влияние введение одностороннего разрыва на механические свойства фрагмента ДНК.

Как следует из представленной выше информации, структурная роль хроматина подразумевает регуляцию всех процессов, связанных с хранением и воспроизведением генетической информации в ядре. РНКП в процессе транскрипции функционирует как макромолекулярная «машина», а для таких структур большое значение имеют функциональная и структурная организация комплексов.

Один из информативных подходов для исследования механизма транскрипции хроматина РНК полимеразой 2 – это остановка комплекса работающей полимеразы в определенном положении на нуклеосомной ДНК во время транскрипции и детальное изучение свойств остановленных комплексов (интермедиатов). Ранее для исследования свойств таких комплексов применяли в основном молекулярно-генетические подходы [Kulaeva et al., 2009]. На сегодняшний день известны кристаллические структуры нуклеосомы [Davey et al., 2002] и РНКП [Armache et al., 2003]. Однако структурные основы формирования нуклеосомного

барьера пока недостаточно исследованы, и элонгационный комплекс РНКП с нуклеосомой не был закристаллизован.

## **1.5 Методы исследования структурных особенностей макромолекулярных комплексов**

Известно, что конформационное состояние белкового комплекса может отражает его функциональную активность [Nguen et al., 2013], поэтому знание пространственных структур макромолекулярных комплексов дает возможность интерпретировать конформационные изменения в молекулах в процессе их функционирования.

Широко используемыми методами изучения структуры и конформационных изменений макромолекул являются РСА, ЯМР, спектроскопические методы и др., однако не все методы позволяют оценить, какая именно часть белка изменила конформацию. Преимуществами метода просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) является возможность исследовать динамику трехмерной структуры (конформационные изменения) с высоким разрешением (вплоть до атомного). Кроме того, метод позволяет работать с маленьким количеством образца и низкой концентрацией исследуемого объекта. Крио-ПЭМ позволяет исследовать образцы в водном окружении в состоянии близком к нативному [Dubochet et al., 1988]. Используя методы трехмерной реконструкции можно получать трехмерные структуры макромолекул на основании анализа данных из ПЭМ.

Метод ПЭМ позволяет работать с большими подвижными макромолекулярными системами, которые к настоящему моменту закристаллизовать не удастся. Примером таких объектов являются элонгационные комплексы (ЭК): они состоят из нескольких макромолекул с суммарной молекулярной массой  $\sim 745$  кДа, а так же характеризуются подвижностью и структурными перестройками. К настоящему моменту информация о пространственной структуре ЭК очень ограничена, а кристаллическая информация доступна только для отдельных нуклеосомы и РНКП. В настоящий момент ПЭМ является основным методом для получения информации об общей структуре элонгационных комплексов и о структурных особенностях нуклеосомного барьера. В данной работе интерпретация полученных методами ПЭМ трехмерных карт производится с использованием методов компьютерного моделирования: компьютерного докинга и фиттинга молекулярных структур в карты электронной плотности.

## Основы метода Просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ)

### Электронная микроскопия макромолекул

К настоящему моменту (2016 г.) с помощью современных методов структурной биологии расшифровано около 119000 атомных структур макромолекул, из которых более 100000 белковых структур ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)). Электронная микроскопия применяется повсеместно, так как это один из относительно быстрых и минимально затратных методов взглянуть на структуру биологического объекта. ПЭМ позволяет исследовать взаимодействия клеток и клеточных органелл с наночастицами, белок-белковые комплексы. Комбинация методов молекулярного моделирования, РСА, докинга позволяют оценивать качество структур и предсказывать структуры аналогичных комплексов. Понимание структуры биологического объекта, в свою очередь, является первым шагом к пониманию принципов его функционирования для оценки возможности дальнейшего его использования для улучшения качества жизни человека – в направленной разработке и модификации лекарств и методов их доставки, в исследованиях новых биомолекулярных взаимодействий для развития новых подходов к терапии и т.д.

### Принцип ПЭМ

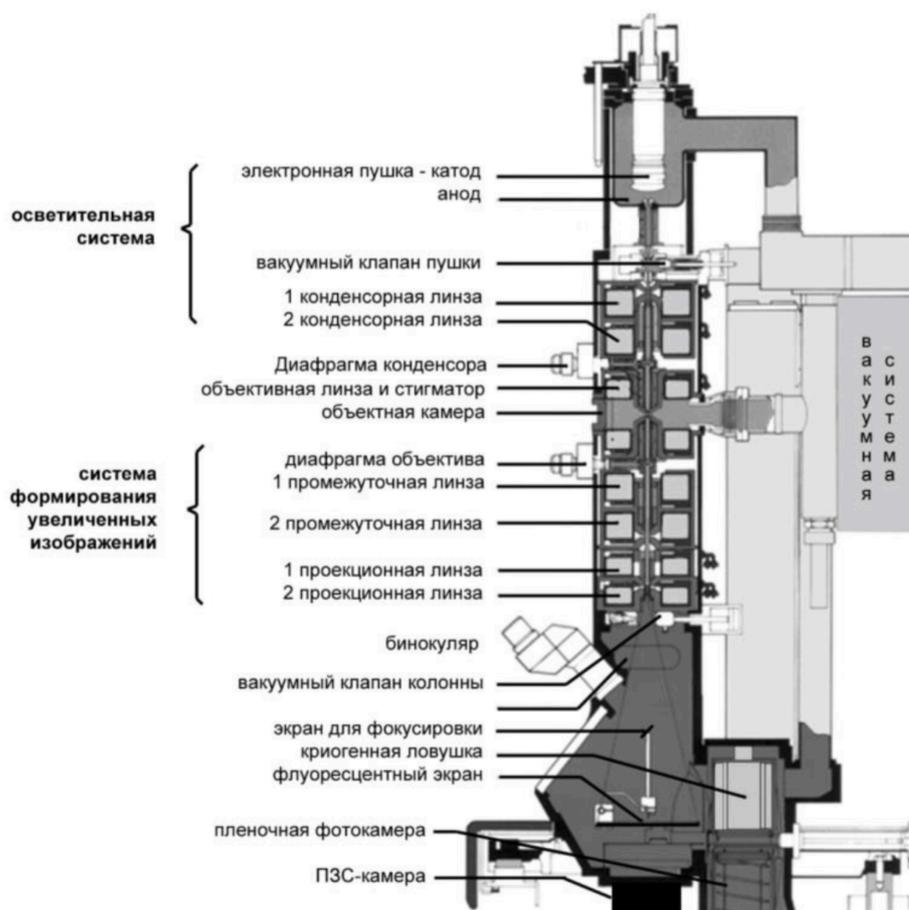
Просвечивающая (или трансмиссионная) электронная микроскопия используется для получения изображений ультратонких электроннопрозрачных образцов (бактериальных клеток, клеточных срезов, нанесенных на сетку частиц белка и т.д.) с целью получения данных об их микро- и ультраструктуре. Толщина образца при этом составляет порядка 0,1 мкм. Электроны попадают на объект и взаимодействуют с ним. Пучок электронов, прошедший сквозь образец, увеличивается объективными магнитными линзами и регистрируется на флуоресцентном экране.

В ПЭМ используются электроны с высокой энергией (100 кэВ и выше), что необходимо для исследования ультратонких образцов. И хотя использование меньших длин волн электронов сулит нам повышение разрешающей способности микроскопа, в реальности из-за аббераций линз разрешение лучших электронных микроскопов в настоящий момент составляет порядка 1-2 Å [Frank, 2006]. Электроны подвержены рассеянию при взаимодействии как с материей, так и с молекулами воздуха, в связи с чем возникает необходимость создания постоянной вакуумной среды в колонне электронного микроскопа. Необходимость постоянно поддерживать вакуум в колонне требует введения образца внутрь колонны с использованием специальной камеры, в которой создается вакуум после введения образца с держателем в камеру (и перед введением образца с держателем в колонну, соответственно).

## Строение электронного микроскопа

В состав электронно-оптической системы трансмиссионного электронного микроскопа входят следующие системы (рисунок 7):

- 1) Осветительная система
- 2) Объектная камера
- 3) Система формирования увеличенных изображений
- 4) Камера наблюдения
- 5) Фотокамера
- 6) Вакуумная система



**Рисунок 7. Блок-схема колонны ПЭМ.**

Электронный луч генерируется осветительной системой, состоящей из электронной пушки (катода) и конденсорных линз. Конденсорные линзы включают дополнительно диафрагмы (для отсечения части луча), дефлекторы (для отклонения луча) и стигматоры (для коррекции астигматизма). Испускаемые катодом электроны катодом ускоряются электрическим полем внутри электрода, из которого они выходят через отверстие шириной ~1 мм. Как правило источником электронов служит вольфрамовая спираль, нагретая до температуры 2000-3000°C.

Настройка конденсорных линз обеспечивает поддержание оптимального облучения образца. Изменяемыми параметрами являются размер точки (физическая ширина луча в плоскости образца), и угол «сведения» луча (определяет яркость облучения). Диафрагмы конденсора представляют собой тонкие пластинки с отверстием, отсекающие периферийную часть электронного луча, повышая его монохроматичность. Таким образом диафрагмы определяют диапазон распределения электронов по скоростям. Конденсорный стигматор позволяет устранять эллиптичность сечения электронного луча в плоскости объекта. Дефлектор обеспечивает наклон и смещение электронного пучка, он используется изменения траектории электронов в осветительной системе линз.

Образец для ПЭМ предстает собой тонкий диск-сетку диаметром около 3 мм. Перед помещением в колонну ПЭМ образец помещается в держатель, который уже вводят в объектную камеру. Объектная камера состоит из трех элементов: шлюзовая камера (через нее образец вводится в вакуум), высокостабильный предметный столик и манипулятор для перемещения образца.

Для защиты исследуемого объекта от загрязнения применяются специальные ловушки: диафрагмы и экраны, охлаждаемые жидким азотом, расположенные в непосредственной близости от объектной сетки. Конденсированные на холодных поверхностях загрязнения удаляются прогревом и откачкой по окончании работы с образцом.

Система формирования увеличенных изображений состоит из объективной, нескольких промежуточных и проекционной линз. Электромагнитные линзы характеризуются теми же типами дефектов, что и оптические: сферическими и хроматическими аберрациями, искривлением поля, астигматизмом. Объективная линза обеспечивает первичное увеличение изображения (в 20-50 раз) после прохождения электронов через структуру образца. Она позволяет фокусировать электронный луч путем изменения тока в обмотке линзы и является самым важным оптическим элементом электронного микроскопа. Совершенство объективной линзы определяет качество формируемого изображения. Образец устанавливается на оптической оси микроскопа по центру полюсного наконечника объективной линзы. Основными параметрами объективной линзы (определяют разрешение микроскопа) являются фокусное расстояние, коэффициенты сферической и хроматической аберраций и астигматизм. Система промежуточных линз располагается между объективной и проекционной линзами. Они позволяют гибко управлять увеличением в широком диапазоне (для молекулярных исследований применяется увеличение от 25000 до 60000), не изменяя фокусировку, обеспечиваемую объективной линзой. Проекционные линзы осуществляют проекцию финального изображения на экран. Система проекционных линз также вносит свой вклад в общее увеличение, и обеспечивает достаточную глубину фокуса для сохранения резкости

изображения на фокусирующем экране, а также на ПЗС-камере. В проекционную линзу обычно бывает вмонтирован фотозатвор, отсекающий или отклоняющий электронный луч по окончании получения изображения.

Камерой наблюдения называется нижняя часть колонны со смотровым окном, через которые виден люминесцентный экран. Люминесцентный экран представляет собой металлическую пластину, покрытую смесью флуорофоров. Из-за этого экран дает желто-зеленое свечение. Конечное увеличенное изображение формируется на люминесцентном экране. Кроме того в камере наблюдения есть дополнительный фокусирующий экран, который подводят к центру изображения во время фокусировки.

ПЗС-камера осуществляет запись ПЭМ изображений, выводимых на экран монитора. В камере используются фоточувствительные кремниевые диоды, соединенные со сцинтиллятором, преобразующим энергию прошедших сквозь образец электронов в световой сигнал.

Электроннооптическую систему ПЭМ в колонне микроскопа обслуживают вакуумная система, система электропитания линз и электронной пушки и система водяного охлаждения линз. Вакуумная система поддерживает в колонне давления остаточного воздуха на уровне не выше  $3 \times 10^{-5}$  мм.рт.ст. Вакуумная система обеспечивает возможность беспрепятственного пролета электронов от катода до детектора с малой вероятностью столкновений с молекулами остаточных газов. Система электропитания линз и электронной пушки обеспечивает высокую стабильность питающих напряжений и токов: если не соблюдается первое условие, увеличивается разброс энергий электронов (хроматическая абберация), а если второе — увеличивается сферическая абберация объектива. И то, и другое приводит к снижению разрешающей способности микроскопа. Система охлаждения колонны не только отводит тепло, выделяющееся при протекании тока через обмотки линз, но и термостатирует колонну. Это очень важно для избежания дрейфа объектного столика, который делает невозможным фотографирование изображений.

Упруго рассеянные электроны, попадая в магнитное поле объективной линзы, отклоняются этим полем, преобразовываясь в параллельные лучи, исходящие из разных точек объекта, которые далее собираются в одну точку на задней фокальной плоскости объективной линзы. Электроны, отклонившиеся на достаточно большие углы, отсекаются диафрагмой объективной линзы и в формировании изображения не участвуют. За пределами задней фокальной плоскости лучи снова расходятся, и в плоскости изображения формируют увеличенное изображение объекта. Изображение далее увеличивается промежуточной и проекционной линзами до заданного конечного увеличения и проецируется на экран или на фотопленку.

### Техники приготовления образцов

Задача трехмерной реконструкции состоит в получении структур с максимально возможным разрешением. Техники подготовки образцов для электронной микроскопии разрабатывались для стабилизации гидратированной молекулы таким образом, чтобы ее можно было поместить и наблюдать в вакууме. В дополнение к этому условию существует необходимость повысить собственный контраст молекулы, в случае биологических объектов недостаточный для наблюдения в электронный микроскоп. Метод негативного контрастирования солями тяжелых металлов (такими, как ацетат уранила-натрия  $\text{NaUO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_3$ ) обеспечивает высокий контраст благодаря высокой отклоняющей способности ядер атомов контрастера и до некоторой степени позволяет сохранить структуру молекулы. У метода есть свои недостатки: метод негативного контрастирования позволяет изучать только внешнюю поверхность молекулы. В некоторых случаях молекулы контрастера способны проникать в щели на поверхности исследуемой макромолекулы, однако это не дает возможность изучать ее внутреннюю структуру.

С развитием метода ПЭМ появились методы исследования структур макромолекул в среде, напоминающей их окружение в природе: заливка образца глюкозой, таннином, исследование образцов в аморфном льду (крио-электронная микроскопия) и крио-негативное контрастирование (гибридный метод). Гибридный подход позволяет исследовать объекты малых размеров с преимуществами крио-ПЭМ, однако физиологичность состояния теряется. В настоящий момент считается, что наилучшее разрешение, вплоть до атомного, дает исследование макромолекул в аморфном льду, однако зачастую используются последовательно несколько методов, позволяя с каждым новым шагом уточнить структуру и повысить ее разрешение.

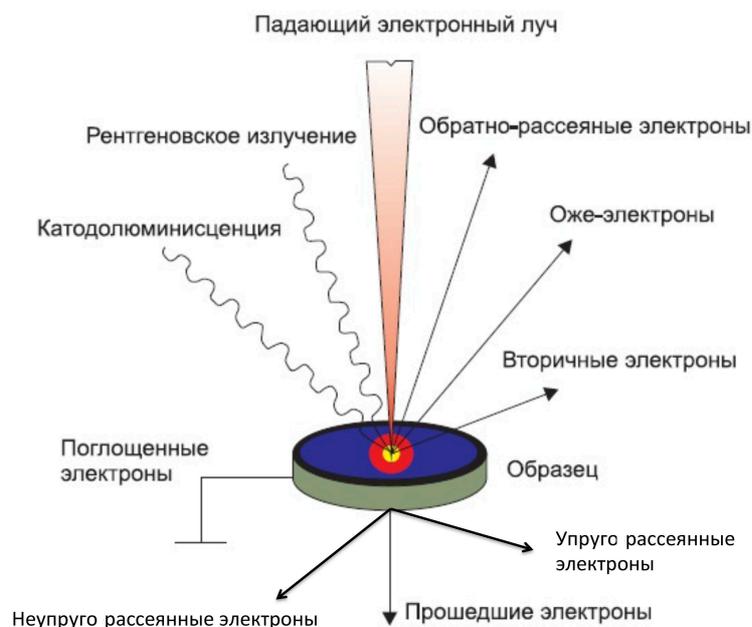
### **Принцип формирования изображений в ПЭМ**

#### Взаимодействие электронов с образцом

В основе формирования изображения ПЭМ лежит взаимодействие электронов с образцом. Облучение образца электронным пучком дает возможность получения изображений высокого разрешения благодаря коротким длинам волн электронов. Взаимодействие электронов непосредственно с образцом приводит к его радиационному поражению, которое является существенным ограничивающим фактором в электронной микроскопии биологических молекул. Для снижения эффекта радиационного поражения образца во время поиска места на сетке и фокусировки используется режим «низкой дозы» (low dose) [Glaeser, 1975; Unwin, 1974].

Природа взаимодействий электронов с образцом зависит от энергии электронов и структуры образца [Hanszen, 1971]. Часть электронов проходит сквозь образец, не претерпевая никаких изменений и не испытывая каких-либо взаимодействий, другие отклоняются электростатическим полем ядра, некоторые электроны могут сталкиваться или быть близкими к столкновению с атомными ядрами, испытывая отклонения от исходной траектории на большие углы. Среди взаимодействующих с образцом электронов - часть отражается без потери энергии (упругое рассеяние), а остальные передают часть энергии образцу (неупругое рассеяние). Передача энергии от электронов к образцу способна вызвать ионизацию атомов в образце, испускание лучей рентгеновского спектра, перераспределение химических связей, образование свободных радикалов, или вызывать появление вторичных электронов (рисунок 8). Все вышеперечисленные эффекты способны изменить структуру образца. Низкая доза облучения биологических образцов составляет от 1 до 20 электронов на  $\text{\AA}^2$ . И хотя биологические образцы устойчивы к облучениям до  $100\text{-}500 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$  в зависимости от температуры и химического состава, максимальное разрешение достигается уже при дозах порядка  $10 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$  и ниже [Glaeser, 1975]. К настоящему моменту ПЭМ дает возможность получать изображения с разрешением до  $0.8 \text{ \AA}$  в исследованиях радиационно-устойчивых материалов [Ziegler et al., 2002; Orlova&Saibil, 2011], до  $1.9 \text{ \AA}$  в электронной кристаллографии хорошо упорядоченных двумерных кристаллов [Gonen et al., 2005], до  $3.3 \text{ \AA}$  для симметричных биологических макромолекулярных комплексов [Orlova&Saibil, 2011], и  $5.5 \text{ \AA}$  для несимметричных молекул (рибосома) [Zhang et al., 2010; Bhushan et al., 2011].

Для формирования изображения в ПЭМ используются упруго рассеянные, а так же прошедшие через образец без потери энергии электроны. Доля рассеянных электронов зависит от концентрации тяжелых атомов в объекте, их среднего атомного номера и толщины объекта.



**Рисунок 8. Схема распределения энергии пучка электронов при взаимодействии с образцом.**

Формирование изображения объекта в ПЭМ можно разбить на три основных этапа. Первым этапом является взаимодействие электронного пучка с объектом, приводящее к рассеиванию электронов, вторым этапом является взаимодействие рассеянных электронов с магнитным полем объективной линзы. Магнитное поле линзы действует на электроны, заставляя их двигаться по определенным траекториям. На третьем этапе прошедшие через образец электроны формируют увеличенное изображение объекта, которое выводится на монитор компьютера.

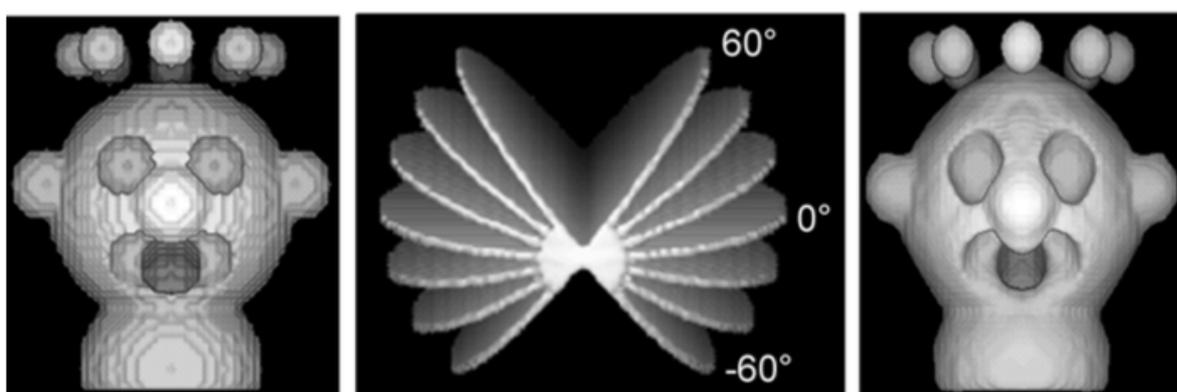
### **Методы получения ПЭМ изображений**

1) Метод вертикальной съемки: образец находится в горизонтальном положении, лучи попадают на него под прямым углом. Предварительную реконструкцию можно получить на основе данных анализа только вертикальной съемки. Однако, если образец характеризуется предпочтительной ориентацией, а так же если ему присуща анизотропия, вызванная взаимодействием с контрастером и высушиванием на воздухе, это может привести к получению некорректной структуры.

2) Метод случайного конического наклона (Random conical tilt, RCT) позволяет частично решить проблему отсутствующего массива данных (из-за отсутствия информации о части ориентаций молекул). Метод включает в себя получение изображения сначала методом вертикальной съемки (угол наклона 0 градусов), затем изображение той же области записывается под некоторым углом (это может быть  $\pm 45$  градусов, или  $\pm 50-60$  градусов).

Данный подход используется для получения информации о максимальном количестве ориентаций молекулы. Изображения, снятые под углом 0 градусов, выравниваются и классифицируются. Совместно с повернутыми анализируются изображения, снятые под углом, что позволяет получать более корректные трехмерные структуры. Разновидностью метода случайного конического наклона является метод ортогонального конического наклона (Orthogonal tilt reconstruction, OTR). Данная вариация впервые была представлена в работе [Leschziner&Nogales, 2006] и применена для реконструкции фактора ремоделирования хроматина RSC [Leschziner et al., 2007]. В данном методе изображения получают во взаимно ортогональных ориентациях (область снимается под углами -45 и +45 градусов). Подход позволяет практически окончательно решить проблему отсутствующего массива данных и возникающих в результате артефактов структуры, однако для решения проблемы необходимо соблюдение главного условия: образец на сетке должен находиться в максимально возможном числе ориентаций.

3) Целью электронной томографии является получение трехмерных реконструкций уникальных объектов, таких как участок клетки, изолированные субклеточные структуры, или макромолекулярные комплексы, с уникальной структурой. Серии изображений одного участка получают под максимальным количеством возможных углов, вплоть до диапазона -70- +70 градусов. Ограничениями метода являются увеличение длины пути электронного пучка через образец при наклоне и ограничение угла поворота держателя образца. Таким образом, в томограмме будет отсутствовать участок диапазона 40-60 градусов, приводя к некоторому искажению трехмерной карты (рисунок 9) [Boisset et al., 1998].



**Рисунок 9. Томограмма, полученная на основании изображений, снятых под углом -60 - +60 градусов будет характеризоваться искажением (вытянута в диапазоне отсутствующей области данных, правое изображение) [Elsevier Inc. 1998].**

## Контраст изображений

В основном изображения, получаемые с помощью электронного микроскопа, представляю собой разницу интенсивности пропускной способности отдельных участков сетки с нанесенным образцом. Общий контраст изображения  $Cont_{img}$  определяется отношением разности наиболее яркой  $\rho_{max}$  и наиболее темной точек  $\rho_{min}$  в изображении к средней яркости (интенсивности) изображения:

$$Cont_{img} = \frac{\rho_{max} - \rho_{min}}{\rho}. \quad (1)$$

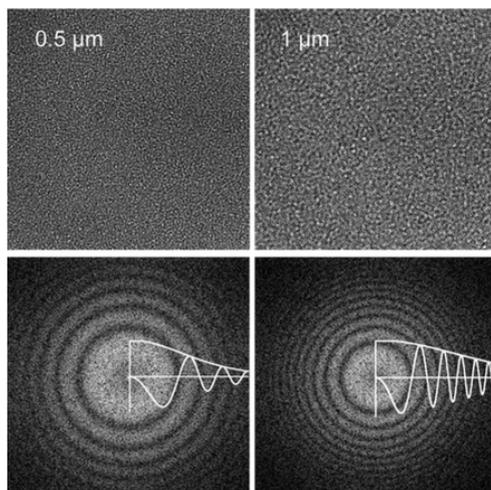
Различают два типа контраста изображений: амплитудный и фазовый контраст. Амплитудный контраст определяется изменением интенсивности электронного пучка при прохождении через образец. Изменение интенсивности электронного пучка является следствием поглощения электронов и отражения электронов на большие углы (отсекаются диафрагмой). Сложностью при исследовании биологических объектов методами ПЭМ является то, что биологические объекты характеризуются очень низким амплитудным контрастом. По природе своей они состоят из легких атомов (Н, О, N и С) и слабо отклоняют электроны электронного пучка, в результате чего на выходе общее количество электронов после взаимодействия с образцом остается прежним. Это значит что образцы не изменяют интенсивности падающего электронного пучка и не позволяют за счет этого различить детали изображения. Основной вклад в контраст изображений биологических объектов вносит фазовый контраст. В основе фазового контраста лежит то, что волновая функция электрона включает прямую (нерассеянную) и рассеянную волновую составляющие. Все они имеют одинаковую длину волны, но различные фазы, зависящие от угла рассеивания. В плоскости изображения происходит интерференция волновых составляющих, результат которой зависит от разности фаз. Амплитуда результирующей волны определяется суммой амплитуд входящих в нее волновых составляющих и разности фаз между ними. Вклад рассеянной составляющей в амплитуду результирующей волны называется частотно-контрастной характеристикой (ЧКХ, contrast transfer function, CTF) и описывается уравнением 2:

$$CTF(k, \Delta z) = \sin \gamma = \sin \left[ -\pi \Delta z \lambda k^2 + \frac{\pi C_s \lambda^3 k^4}{2} \right], \quad (2)$$

где  $k$  – пространственная частота,  $\Delta z$  -расстояние до фокальной плоскости (дефокус),  $\lambda$  – длина волны,  $C_s$  - коэффициент сферической абберации.

Соответственно чем выше значение модуля ЧКХ на определенном значении пространственной частоты, тем большее ее вклад в значение амплитуды результирующей волны, тем большим контрастом характеризуется изображение. На рисунке 10 приведен пример

зависимости вида частотно-контрастной характеристики от дефокуса. На нижней части рисунка 10 представлены изображения в Фурье-пространстве [Fourier, 1822] и соответствующая им частотно-контрастная характеристика.



**Рисунок 10. ПЭМ изображения снятые с разными дефокусами и они же в пространстве Фурье, с соответствующим изображениям кривыми ЧКХ [Orlova&Saibil, 2011].**

Рисунок 10 иллюстрирует особенности ЧКХ: ЧКХ характеризуется затуханием осцилляций с увеличением пространственной частоты, причиной которого является несовершенство окружения и когерентности пучка. Кривая, описывающая затухание ЧКХ с ростом пространственной частоты называется огибающей функцией  $E(\vec{R})$ .

Описанные выше эффекты приводят к снижению передачи сигнала микроскопом для мелких деталей изображения, приводя к их размытости на картинке. В результате чего точка будет изображена не как точка, а как размытое пятно. Связь между исходной точкой и ее изображением описывается функцией рассеяния точки (point spread function, PSF) устройства (электронного микроскопа). Функция PSF описывает несовершенства системы формирования изображения в реальном пространстве. Зависимость наблюдаемого изображения от функции рассеяния точки описывается формулой 3, где  $\Psi_{obs}(\vec{r})$ - наблюдаемое изображение,  $\Psi_{sam}(\vec{r})$  – изображение идеальной проекции образца,  $\vec{r}$  – волновой вектор изображения в реальном пространстве:

$$\Psi_{obs}(\vec{r}) = \Psi_{sam}(\vec{r}) * PSF(\vec{r}). \quad (3)$$

Влияние данного фактора на изображение принято описывать в пространстве Фурье (дифракционном пространстве), где  $F\{\Psi_{obs}(\vec{r})\}$  является трансформантой (преобразованием) Фурье наблюдаемого изображения,  $\vec{r}$  – волновой вектор изображения в реальном пространстве;  $\vec{R}$  – является пространственной частотой (координата в фурье-пространстве);  $F\{\Psi_{sam}(\vec{r})\}$ -

преобразование Фурье идеальной проекции образца;  $CTF(\vec{R})$  - является ЧКХ микроскопа, а  $E(\vec{R})$  является огибающей функцией. Огибающая функция  $E(\vec{R})$  описывает влияние различных нестабильностей (изменений дефокуса, неоднородной освещенности образца, разброса энергии в электронном пучке и т.д.) и распада образца под действием пучка:

$$F\{\Psi_{obs}(\vec{r})\} = F\{\Psi_{sam}(\vec{r})\} * CTF(\vec{R}) * E(\vec{R}). \quad (4)$$

Из представленного уравнения следует, что улучшить изображение можно разделив наблюдаемое изображение на значение ЧКХ и произведя обратное преобразование из Фурье-пространства, данный процесс называется коррекцией частотно-контрастной характеристики.

### **Определение частотно-контрастной характеристики (ЧКХ)**

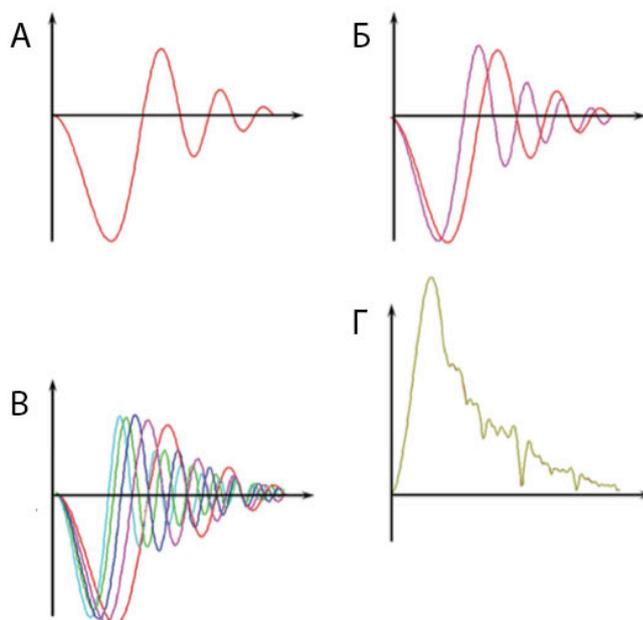
Для заданных настроек микроскопа ускоряющее напряжение и сферические абберации являются постоянными, однако дефокус различается у различных изображений из-за различных настроек линз, высоты и толщины образца в определенной области. Существуют два основных подхода в определении и коррекции частотно-контрастной характеристики. Первый подход состоит в том, что ЧКХ-коррекции подвергаются собранные с ПЭМ-микрофотографии частицы до начала их структурного анализа. Второй подход заключается в том, что структурный анализ производится отдельно для частиц с каждой микрофотографии, а определение ЧКХ и ее коррекция производится непосредственно по отношению к полученной структуре. Оба подхода имеют свои достоинства и недостатки.

Если ЧКХ-коррекция производится вначале, то данные об изображениях частиц с разных микрофотографий могут быть объединены и анализироваться как единый набор данных. Второй метод применим в том случае, если микрофотография содержит достаточной количество частиц для получения трехмерной структуры. Подход работает в случае высокой концентрации частиц в образце и характеризуется преимуществом более точного определения ЧКХ благодаря высокому отношению сигнал/шум в реконструкции, в которую были объединены изображения. Однако в случае более низкой концентрации частиц в образце или в отсутствии симметрии получить трехмерную реконструкцию на основании изображений частиц, собранных с одной микрофотографии, не представляется возможным, поэтому первый подход представляется более практически применимым. Как правило, алгоритм поиска значения частотно-контрастной характеристики вмонтирован в программное обеспечение.

### **Элиминирование эффектов частотно-контрастной характеристики (ЧКХ-коррекция)**

Изображение объекта считается наиболее достоверным в том случае, если в ходе обработки РЭМ изображений учитывался эффект частотно-контрастной характеристики микроскопа. Полное математическое восстановление спектра образца требует деления

$F\{\Psi_{sam}(\vec{r})\}$  согласно формуле 2 на ЧКХ т.е.  $\sin y$ , что невозможно из-за нулей ЧКХ, поэтому полный спектр (все детали изображения) не могут быть получены с изображений, снятых с одним дефокусом. Для получения полной информации о спектре, необходимо использовать изображения частиц, снятых с различными значениями дефокуса, чтобы нули каждой отдельно взятой ЧКХ были заполнены соответствующими значениями от изображений, снятых с другими дефокусами (рисунок 11).



**Рисунок 11.** А - изображение ЧКХ в непосредственной близости к истинному фокусу изображения (наблюдаются относительно медленные колебания функции); Б - ЧКХ для двух различных дефокусов; В - колебания ЧКХ с различными значениями дефокусов, голубая и зеленая кривые соответствуют ЧКХ с наибольшими значениями дефокуса, красная – ближе всех к фокусу изображения; Г – сумма амплитуд абсолютных значений всех ЧКХ, представленных на рисунке В. По оси  $x$  – пространственная частота, по оси  $y$  – амплитуда [Orlova&Saibil, 2011].

### Нормализация изображений

Даже в случае одинаковых настроек микроскопа в ходе получения ПЭМ изображений, различия в ориентации образца, его толщина и некоторые другие факторы приводят к разнице в контрасте изображений. Кроме того, структурный анализ требует объединения данных, полученных в ходе разных сессий получения изображений. Для оптимизации процессов обработки данных проводится стандартизация изображений, известная как нормализация. Приемлемым подходом является установка среднего значения электронной плотности изображений всех частиц на одном уровне (обычно нулевом) и масштабирование стандартного

отклонения значений плотностей на одном уровне для всех изображений, что важно в ходе процессов выравнивания.

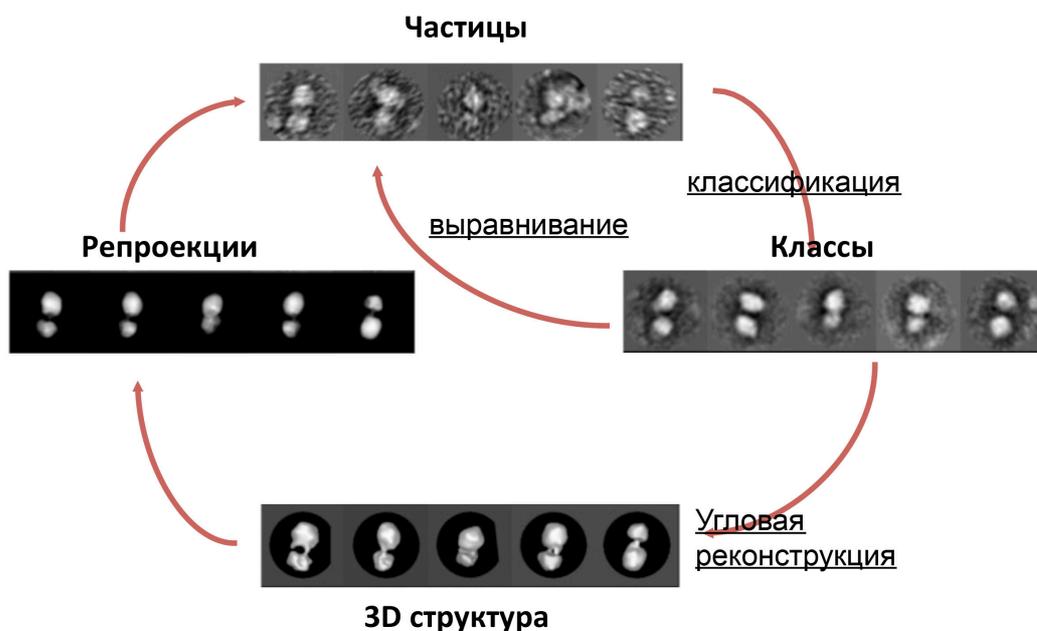
## **1.6 Трехмерная реконструкция карт электронной плотности из ПЭМ-изображений**

Процесс трехмерной реконструкции на основании ПЭМ изображений состоит из трех основных этапов (общая схема изображена на рисунке 12):

1. Съемка электронных микрофотографий;
2. Обработка двумерных изображений;
3. Реконструкция трехмерной структуры.

Снятые с использованием методов негативного контрастирования или крио-ПЭМ изображения подвергаются обработке:

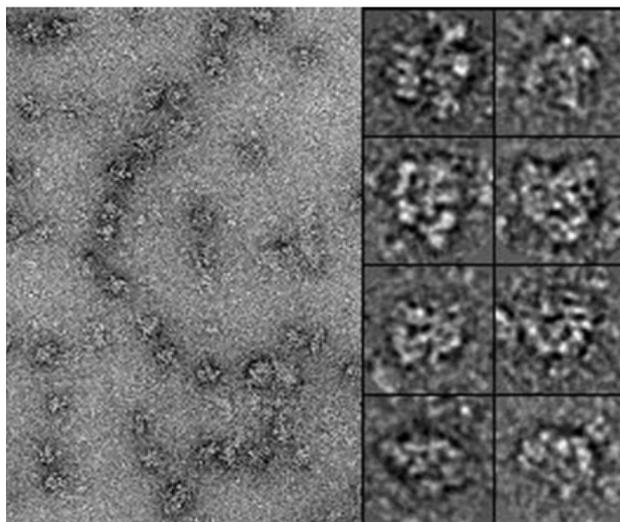
- Сборке изображений индивидуальных частиц;
- Итеративной процедуре классификации (объединению сходных изображений в группы - «классы», представляющие собой различные характеристические виды молекулы);
  - Внутрикласовое усреднение изображений для получения «классовых средних» («class averages»), которые характеризуются более высоким отношением сигнал/шум;
  - Получение трехмерных реконструкций из отдельных классов, или с объединением нескольких классов вместе;
  - Улучшение первичной трехмерной реконструкции для повышения разрешения.



**Рисунок 12. Общая схема процесса трехмерной реконструкции.**

### **Сборка изображений одиночных частиц**

В электронной микроскопии макромолекул обработка данных начинается со сбора частиц. Частицы определяются на ПЭМ изображениях по форме и характеристическим особенностям, которые бывает сложно определить для новых комплексов или объектов. Информация, которую получают с ПЭМ изображений, представляет собой двумерные проекции трехмерной структуры макромолекулы (рисунок 13). Трехмерная реконструкция объекта становится возможной благодаря тому, что двумерные проекции представляют собой различные ориентации объекта. Для получения трехмерной структуры необходимо получить изображения объекта в максимально возможном количестве ориентаций.



**Рисунок 13. Электронная микрофотография очищенных молекул сплайсосомы после окраски ацетатом уранила-натрия; справа - собранные двумерные проекции отдельных молекул [Jurica et al., 2002].**

Для сборки одиночных частиц существует несколько алгоритмов, они встроены в программные пакеты для обработки ПЭМ изображений. Перед началом сбора изображений выбирается размер квадратного бокса (ячейки), в центре которого будет располагаться молекула. Выбор размера бокса играет важную роль для дальнейшего выравнивания. Молекула/молекулярный комплекс должны целиком помещаться в ячейке и занимать около 85% ее площади (рисунок 13 правая часть).

### **Статистический анализ и классификация изображений**

Произвольное положение и ориентация объекта на сетке определяет большое количество различных проекций. Каждое индивидуальное изображение характеризуется низким отношением сигнал/шум из-за слабого контраста биологических объектов.

Отношение сигнал/шум (signal-to-noise ratio, SNR) рассчитывается по формуле 5:

$$SNR = \frac{P_{signal}}{P_{noise}}, \quad (5)$$

где  $P_{signal}$  - энергия сигнального спектра (интеграл силового спектра после нормализации),

$P_{noise}$  - энергия шума.

Повысить отношение сигнал/шум позволит объединение данных индивидуальных изображений, для чего нужно сравнить все собранные индивидуальные изображения с низким SNR между собой.

Для оценки степени сходства изображений используются различные статистические подходы: метод главных компонент, многофакторный статистический анализ или ковариантный анализ [van Heel&Frank, 1981; Saxon&Frank, 1977]. А объединение сходных изображений в классы может производиться иерархической кластеризацией или поиском K-средних.

Кросс-корреляционная функция широко используется для оценки степени сходства или зависимости между двумя значениями или функциями, расчет нормализованной кросс-корреляционной функции производится по формуле 6. В анализе двумерных проекций она используется для оценки степени сходства между двумя изображениями.

$$CCF(\vec{s}) = \frac{\int g_1(\vec{r}+\vec{s})g_2(\vec{r})d\vec{r}}{\sqrt{\int g_1(\vec{r})g_1(\vec{r})d\vec{r} \times \int g_2(\vec{r})g_2(\vec{r})d\vec{r}}} \quad (6)$$

В уравнении 5 CCF представляет собой нормализованную кросс-корреляционную функцию (CCF) между двумя функциями  $g_1(\vec{r})$  и  $g_2(\vec{r})$ , где  $\vec{r}$  - вектор пространства,  $\vec{s}$  – сдвиг между двумя изображениями. В данном случае два двумерных ЭМ изображения представляют собой сопоставляемые функции, а  $\vec{r}$  и  $\vec{s}$  – векторы в плоскости изображений. Изображения нормализованы до среднего значения равного нулю для избежания влияния бэкграунда. Нормализованная кросс-корреляционная функция максимальна если два изображения идентичны и хорошо выровнены, и смещение  $\vec{s}_p$  корреляционного пика от исходного изображения дает перемещение изображения  $g_1$  в соответствии с изображением  $g_2$ . Кросс-корреляционную функцию быстрее считать в пространстве Фурье где она выглядит следующим образом:

$$CCF(\vec{s}) = F^{-1} \left\{ \frac{G_1^*(\vec{R}) \times G_2(\vec{R})}{\sqrt{\int |G_1(\vec{R})|^2 d\vec{R} \times \int |G_2(\vec{R})|^2 d\vec{R}}} \right\}, \quad (7)$$

где  $\vec{R}$  – вектор в Фурье пространстве, а  $G_1$  и  $G_2$  – Фурье-трансформанты  $g_1$  и  $g_2$  соответственно.

Кросс-корреляционная функция изображения с самим собой называется автокорреляционной функцией.

В ходе классификации все изображения попарно сравниваются между собой, рассчитывается значение кросс-корреляционной функции для каждой пары изображений. Сходные изображения объединяются в общие классы и внутри класса суммируются с получением классовой суммы. Классовая сумма, как и индивидуальное изображение, представляет собой характеристический вид проекции объекта, но характеризуется большим контрастом за счет суммирования нескольких изображений.

## **Мультиференсное выравнивание изображений**

Выравнивание представляет собой повторяющийся несколько раз процесс, который начинается с сопоставления и выравнивания крупных особенностей набора данных (таких, например, как центр масс изображений частиц). Изображения индивидуальных частиц сопоставляются с полученными на предыдущем этапе классами, и изображение смещается на определенный вектор или поворачивается на определенный угол для максимального совпадения с соответствующей классовой суммой. Таким образом выравниваются все индивидуальные изображения частиц в наборе данных. Далее повторяется классификация выровненных изображений с получением новых классовых сумм. Процессы выравнивания и классификации повторяются несколько раз до тех пор, пока классы не перестают улучшаться (становятся видны детали изображения, классы перестают быть размытыми).

Из-за низкого отношения сигнал/шум, в частности в крио-изображениях, очень важно максимизировать вклад сигнала за счет уменьшения шума. Существует два способа уменьшения шума в изображениях. В реальном пространстве маска вокруг частицы позволяет убрать области фона вне частицы. В обратном Фурье пространстве может применяться полосовой фильтр (band-pass) для исключения из анализа очень низких и очень высоких частот, соответствующих шуму. На более поздних этапах выравнивания полезно не отсекал высокие частоты, так как это позволяет увеличить разрешение получаемой структуры.

## **Выравнивание в томографии**

### Выравнивание при наличии или отсутствии маркерных частиц

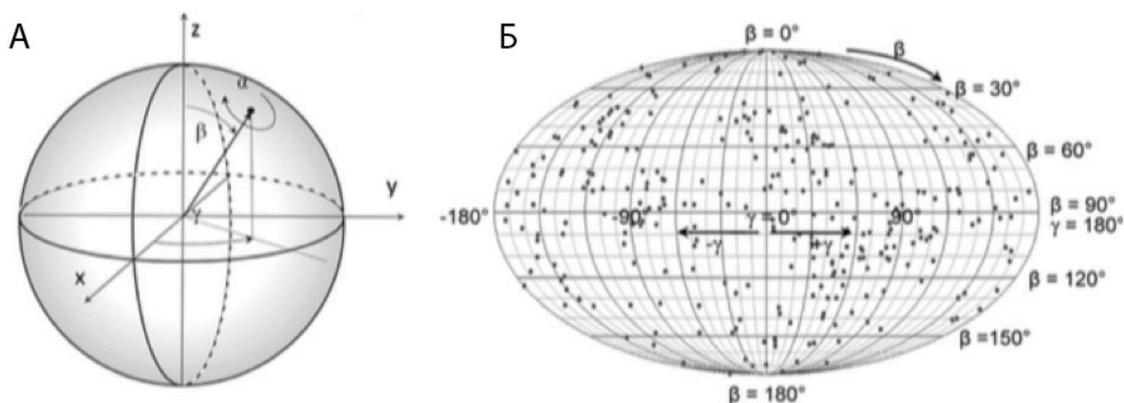
Аккуратность реконструкции томограммы зависит от качественного выравнивания повернутых изображений. Выравнивание как правило производится путем отслеживания перемещений маркерных точек (фидуциальных маркеров) на изображении в зависимости от угла поворота. В качестве маркерных точек могут быть использованы электронно-плотные частицы (например, частицы коллоидного золота). В крио-томографии коллоидное золото добавляют в суспензию до замораживания образца. При хорошем распределении маркерных точек и стабильном образце можно произвести аккуратное выравнивание и даже учесть некоторые локальные искажения образца. В случае, если контраст характеристических особенностей изображения достаточный, выравнивание можно производить без использования дополнительных маркеров. В таком случае используется метод, при котором выбираются большие наборы случайных точек и для них рассчитывается кросс-корреляционная функция [Castaño-Díez D. et al., 2007].

### Выравнивание отдельных участков, экстрагированных из томограммы (субтомограмм)

Томографические реконструкции таких объектов, как внутриклеточные области или молекулярные суспензии, как правило, содержат многочисленные копии молекулярных комплексов. Если эти комплексы могут быть распознанными и экстрагированными из томограмм, их можно выравнивать и классифицировать как одиночные трехмерные структуры частиц, повышая, таким образом, отношение сигнал/шум. Основное отличие данного подхода от двумерного анализа одиночных частиц состоит в том, что томограмма содержит клиновидную зону отсутствующего массива данных. Для каждого отдельного объекта в томограмме эта зона будет находиться в разных областях объекта в зависимости от его ориентации в томограмме. Для избежания ошибки, вносимой отсутствующей областью, кросс-корреляционная функция в Фурье-пространстве рассчитывается для областей, общих для каждой пары изображений [Förster F. et al., 2008]. Метод субтомограммного усреднения используется, например, для исследований структур паракристаллов, филаментов, вирусных частиц и их суб-структур, таких как поверхностные спайки [Winkler, 2007; Bartesaghi et al., 2008].

### **Определение ориентации двумерных изображений**

Для получения трехмерной структуры из набора проекций (классов) необходимо определить их ориентации в объекте (рисунок 14 А): значения координат и углов. Сложнее всего определить первичные ориентации классов для получения трехмерной структуры, особенно если объект характеризуется симметрией  $C1$ . Некорректная стартовая модель может исказить финальную трехмерную структуру, для таких случаев могут быть использованы другие подходы (например использовать кристаллическую структуру или реконструкцию сходного объекта).



**Рисунок 14. А - Определение параметров ориентации классов, Б - пример углового распределения классов объекта на Эйлеровской сфере [Orlova&Saibil, 2011].**

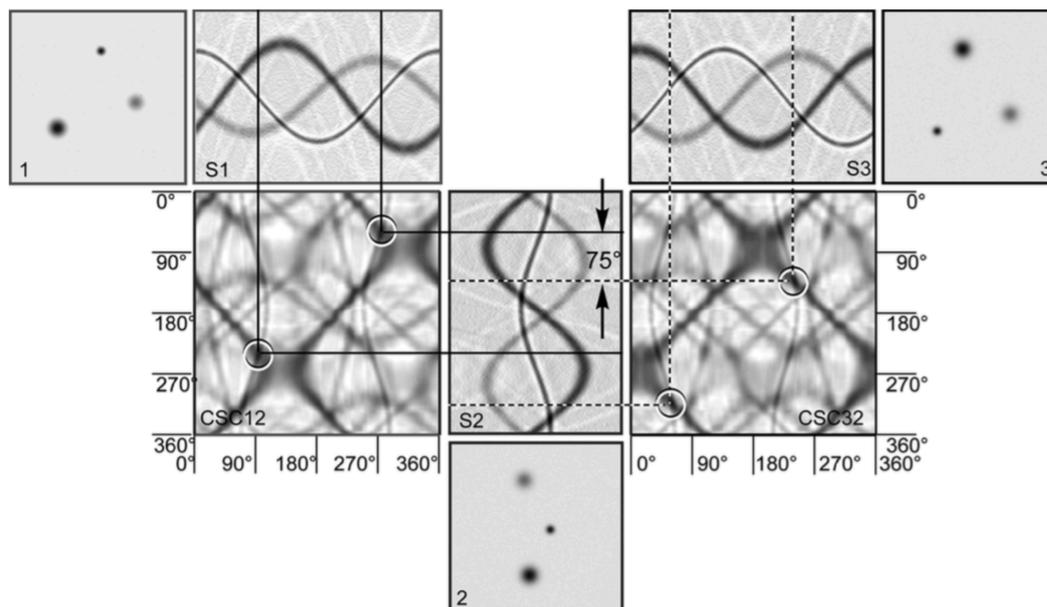
Определение ориентации изображения в пространстве производят поиском общих линий. Считается, что у любой пары двумерных проекций есть хотя бы одна общая линия [Radon, 1917, van Heel, 1987]. Для определения взаимной ориентации двух проекций в трехмерной структуре нужна информация минимум о трех общих линиях, так как это даст возможность определить угол между плоскостями. Поиск общих линий можно осуществлять как в пространстве Фурье (рисунок 15), так и в реальном пространстве. В пространстве Фурье двумерные проекции соответствуют плоскостям, проходящим через центр Фурье-пространства, а одномерные проекции становятся радиальными линиями в трансформанте. Общая линия между двумя проекциями в Фурье-пространстве является линией пересечения соответствующих двух плоскостей.



**Рисунок 15. Иллюстрация соотношения изображения трехмерной структуры, двумерных проекций и общих линий в Фурье-пространстве [Orlova&Saibil, 2011].**

Поиск общих линий в реальном пространстве происходит с использованием преобразования Радона: частности двумерная секция Радоновского преобразования трехмерной функции соответствует набору одномерных проекционных линий двумерной проекции. Данный подход поиска общих линий в реальном пространстве был встроен в программный пакет IMAGIC [Serysheva, 1995; van Heel, 1997]. Для каждого двумерного изображения рассчитывается набор одномерных проекций и представляется в виде изображения (синограммы), где линии представляют собой серию одномерных проекций от 0 до 360 градусов (рисунок 16). Задача состоит в поиске сходных линий для каждой пары изображений путем поиска наибольшего значения кросс-корреляционной функции между их синограммами.

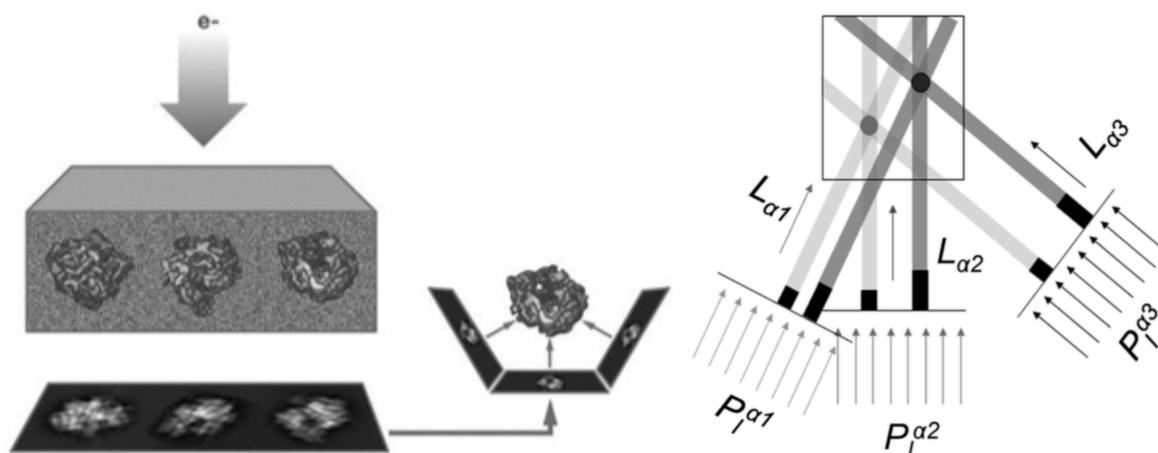
Таким образом определяются взаимные ориентации проекций. Кроме того фактор симметрии позволяет определить множество общих линий из одного изображения (собственные общие линии) и между парами изображений.



**Рисунок 16. Построение синограмм и определение ориентаций проекций [Orlova&Saibil, 2011].**

### Угловая реконструкция трехмерной структуры

Существуют несколько основных подходов для получения трехмерной реконструкции объектов из его проекций [Penczek, 2010]. Все эти методы разделяются на те, при которых реконструкция производится в реальном пространстве (методы с использованием обратных проекций и алгебраические методы) и на группу методов, работающих с изображениями в обратном Фурье-пространстве. Программа IMAGIC [van Heel, 1996], использованная в данной работе, производит реконструкцию методом обратного проецирования [van Heel, 1996] в реальном пространстве (рисунок 17). При этом двумерные изображения объекта, которым приписаны соответствующие ориентации, растягиваются в пространстве в плоскости, перпендикулярной плоскости изображения. Область пересечения растянутых плотностей соответствует трехмерной структуре реконструируемого объекта. Для получения предварительной реконструкции необходимо минимум три класса, представляющие собой основные характеристические виды молекулы. Если заранее известна предварительная структура – с нее можно получить репроекции для определения характеристических видов и далее использовать этот набор репроекции для сопоставления проекций (см. ниже), полученных из анализируемого набора данных, для получения более точных значений углов.



**Рисунок 17. Построение трехмерной структуры с использованием фильтрованного обратного проецирования. P – проекции, L – направления обратного проецирования [Jurica et al., 2002; Orlova&Saibil, 2011].**

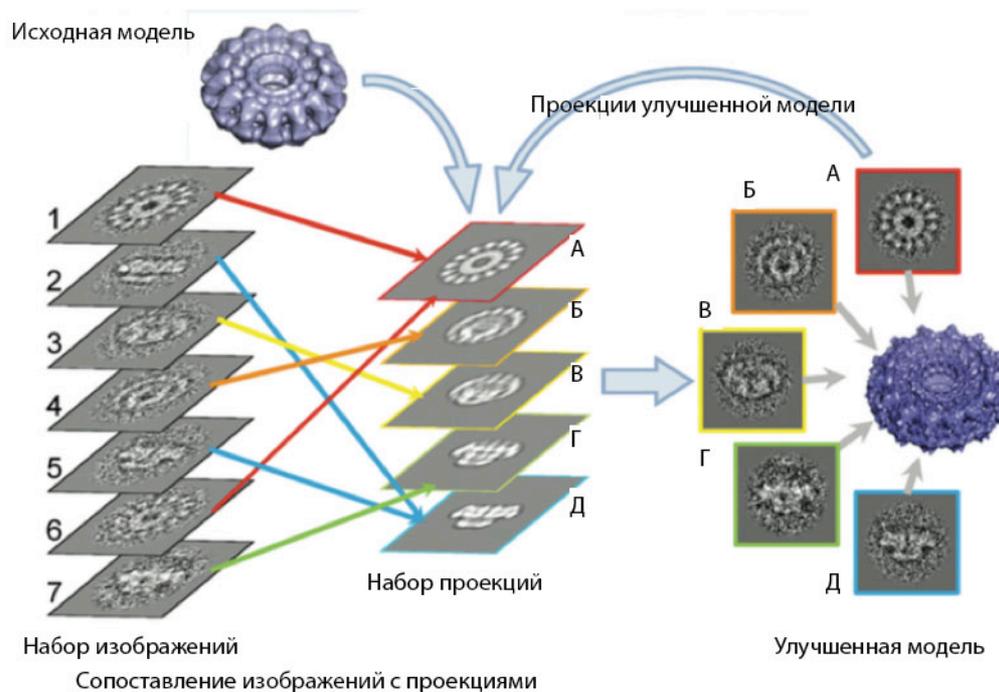
#### Томографическая реконструкция

В ходе реконструкции томограммы отдельные микрофотографии, полученные под разными углами с определенным шагом, выстраивают, начиная с наименьших значений угла наклона, заканчивая максимальным значением. Из-за того, что ПЭМ изображения соответствуют двумерным проекциям объекта в направлении электронного луча, изображения одной и той же области, снятые под разными углами, соответствуют набору проекций объекта в разных, но известных ориентациях. Как только индивидуальные ПЭМ-изображения выровнены, может быть получена трехмерная томограмма. В том случае, если в реконструированном объеме представлены многочисленные копии исследуемого объекта – они могут быть экстрагированы и использованы для усреднения субтомограмм. Данный подход приводит к повышению контраста, однако снижает разрешение получаемых трехмерных структур. Коррекцию ЧКХ для томограммы провести очень сложно, в частности, из-за различия дефокусов в разных частях изображения [Xiong et al., 2009; Zanetti et al., 2009].

#### Сопоставление проекций с исходными изображениями

После получения предварительной трехмерной структуры проводят несколько раундов улучшения, для повышения разрешения и уточнения деталей реконструкции. Для этого с полученной трехмерной структуры получают двумерные репроекции во всех возможных ориентациях для полного покрытия Эйлеровской сферы (рисунок 14 Б). Как правило, при получении изображений не удастся получить данные обо всех возможных ориентациях молекулы, вследствие чего на Эйлеровской сфере будут наблюдаться области отсутствующих

данных. Эти области приводят к искажению трехмерной структуры в направлении отсутствующих данных. Набор репроекций используется для сопоставления с изображениями индивидуальных частиц и уточнения классов и их ориентаций в построенной трехмерной структуре (рисунок 18).



**Рисунок 18. Иллюстрация процесса сопоставления проекций. Сначала получается предварительная трехмерная структура (исходная модель), с нее получают репроекции во всех возможных ориентациях. Далее изображения индивидуальных частиц сопоставляются с репроекциями и рассчитываются новые значения углов для соответствующих классов, процесс повторяется для улучшения трехмерной структуры [Orlova&Saibil, 2011].**

В процессе сопоставления проекций попарно рассчитываются значения кросс-корреляционной функции между выровненными двумерными изображениями и репроекциями полученной трехмерной структуры: производится выравнивание изображений в соответствии с полученными проекциями трехмерной структуры. Далее выровненные по репроекциям двумерные изображения повторно классифицируются, и вновь полученные классы должны характеризоваться большим сходством с проекциями трехмерной структуры. Для вновь полученных классов рассчитываются значения углов их ориентаций в трехмерной структуре с использованием значений углов соответствующих репроекций. Процесс повторяется до тех пор, пока разрешение трехмерной структуры не перестает улучшаться.

Процедура сопоставления проекций в реальном пространстве встроена во многие программные пакеты IMAGIC [van Heel, 1996], EMAN [Ludtke et al., 1999], SPIDER [Frank, 1996]. FREALIGN производит процедуру сопоставления проекций в обратном пространстве, давая преимущество во времени поиска дефокусов изображений [Grigorieff, 2007].

В некоторых случаях, если известна приближительная трехмерная структура, ее можно использовать для сопоставления проекций на начальном этапе. Первая итерация даст исходную модель, а последующие позволят улучшить структуру. Кроме того, существующая кристаллическая структура так же может быть использована как основа для получения репроекции [Prasad et al., 1999; Navaza, 2008; Chandran, 2009].

### Оценка качества и достоверности реконструкции

Для определения разрешения отношение сигнал/шум должно быть представлено как функция пространственной частоты. Хотя доступны различные подходы для оценки разрешения [Unser et al., 1987; Unser et al., 2005; Penczek, 2002; Cardone et al., 2005; Sousa & Grigorieff, 2007], наиболее широко используемым методом является метод объемной корреляции Фурье с коэффициентами 0,5 или 3-сигма (ОКФ, Fourier shell correlation, FSC) [Saxton & Baumeister, 1982; van Heel et al., 2005; Penczek, 2002].

Для оценки разрешения с использованием данного подхода набор данных, использованных при получении финальной структуры, делится на два поднабора (как правило выделяются классы с четными и нечетными номерами). Для данных классов уже рассчитаны значения углов, поэтому из них могут быть построены две независимые трехмерные реконструкции. Далее для Фурье трансформант двух трехмерных карт ( $F_1$ ,  $F_2$ ) ассчитывается значение кросс-корреляционной функции пространственных частот ( $k, \Delta k$ ). Средняя корреляция для каждой пространственной частоты располагается на графике, который в основном показывает падение от значения корреляции равной 1 на низком разрешении, к 0 на высоком разрешении.

$$FSC = \frac{\sum_{k, \Delta k} F_1(k) F_2^*(k)}{|\sum_{k, \Delta k} |F_1(k)|^2 \sum_{k, \Delta k} |F_2(k)|^2|^{1/2}} \quad (8)$$

По графику зависимости кросс-корреляционной функции от пространственной частоты определяют разрешение полученной структуры: в случае использования метода объемной корреляции Фурье с коэффициентом 0,5 выбирается значение разрешения, соответствующее значению кросс-корреляционной функции равному 0,5. В случае использования 3-сигма критерия принимается значение разрешения, соответствующего точке пересечения кросс-корреляционной функции и кривой 3-сигма.

### Интерпретация трехмерной карты

Как только определена карта новой трехмерной структуры, становится возможным оценить молекулярную массу электронной плотности. На уровне контура трехмерная карта должна быть оценена максимально приближенно к предполагаемой молекулярной массе исследуемого комплекса. Для этого производится фильтрация электронной плотности с учетом ожидаемой массы исследуемого объекта. При этом учитывается средняя электронная плотность исследуемого объекта, так, для белков она принимается равной  $844 \text{ Да/нм}^3$  [Quillin&Matthews, 2000].

## **1.7 Методы компьютерного моделирования и их роль в анализе трехмерных структур**

Ключевое значение для анализа и интерпретации трехмерных карт электронной плотности занимают методы компьютерного моделирования: фиттинг (докинг) и молекулярная динамика (МД).

### **Методы компьютерного докинга и фиттинга**

Классический молекулярный докинг представляет собой поиск взаимной ориентации двух или более молекул на основании моделирования вариантов межмолекулярных взаимодействий на основании расчета их атомных взаимодействий. Метод применяется в основном для моделирования взаимодействий как типа макромолекула – низкомолекулярный лиганд, так и для взаимодействий макромолекул [Lengauer&Rarey, 1996].

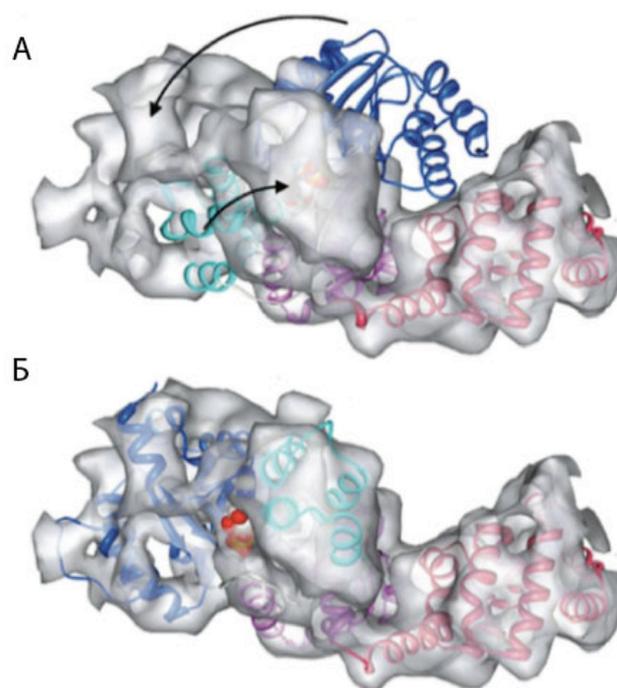
Разновидностью компьютерного докинга молекулярных структур является фиттинг, представляющий собой поиск наилучшего совпадения ориентаций кристаллической структуры (или структур) с трехмерной картой электронной плотности [Rossmann, 2000]. Фиттинг соответствующих атомных структур компонентов в трехмерную ПЭМ карту макромолекулярного комплекса является одним из основных способов ее интерпретации [Rossmann, 2000, Chacon&Wriggers, 2002; Jensen et al., 2010]. Фиттинг бывает двух типов: жесткий фиттинг (когда подвижность отдельных атомов не учитывается в ходе докинга, оценивается совпадение структур с координатами, полученными в результате рентгеноструктурного анализа) [Martin et al., 2007] и гибкий фиттинг (используется молекулярно-динамический подход с оценкой возможных конформаций атомной модели/атомных структурных элементов модели) [Trabuco et al., 2008, 2011]. Для проведения жесткого фиттинга широко используется программный пакет CHIMERA [Goddard et al., 2007], в котором встроена данная функция [Yanga et al., 2012; Pandurangan&Topf, 2012]. Математические основы подхода, а так же другие программные пакеты, в которых встроены

молекулярный фиттинг описаны в работе Fabiola&Chapman, 2005. В случае гибкого фиттинга в дополнение к стандартному МД силовому полю к каждому атому прикладываются силы, пропорциональные градиенту карты электронной плотности, направляющие элементы атомной структуры в области электронной плотности [Trabuco et al., 2012].

Совместное использование методов электронной микроскопии и молекулярного фиттинга для крупных молекулярных комплексов, не поддающихся кристаллизации, является основным подходом для получения структурной информации. К таким относят молекулярные комплексы, которые трудно перевести в кристаллическую форму [Kostyuchenko et al., 1999] или нестабильные структуры, которые сложно поддерживать на протяжении времени кристаллизации [Dokland et al., 1997], либо комплексы, подверженные быстрым структурным измерениям в ответ на функциональные стимулы [Rossmann, 2000]. В таких случаях для фиттинга в карту электронной плотности могут использоваться закристаллизованные атомные структуры фрагментов комплексов [Wang et al., 1992]. Фиттинг может производиться как в реальном, так и в обратном пространстве: реальном пространстве фиттинг в основном используется при необходимости оценить финальную структуру с точки зрения всех возможных углов и ориентаций, фиттинг в обратном пространстве используется, в частности, в процедуре итеративного улучшения структуры [Rossmann, 2000].

Большая часть структур, полученных методом электронной микроскопии макромолекул, характеризуется разрешением 7-30 Å, что не дает возможности определить молекулярную структуру. При низком разрешении реконструкции (20-30 Å) большие домены могут быть определены по их размерам и форме. В диапазоне 6-9 Å разрешаются альфа-спиральные вторичные структуры. Бета-складки обнаруживаются на разрешении около 4,5 Å. Детали боковых цепей обнаруживаются только в исключительно высоко разрешенных структурах.

Основным принципом фиттинга является оценка корреляции электронных плотностей. Встраиваемая фиттингом электронная плотность рассчитывается из атомной структуры, отфильтрованной на уровне того же разрешения, что и ПЭМ карта, а поиск максимального значения кросс-корреляционной функции используется для выравнивания двух электронных плотностей (рисунок 19).



**Рисунок 19. А - первоначальное встраивание атомной структуры в ПЭМ карту, Б - результат гибкого фиттинга структур [Orlova&Saibil, 2011].**

Представление о структуре макромолекулярных комплексов имеет важное значение для понимания их механизма функционирования. Наиболее точным методом для получения структурной информации является метод рентгеноструктурного анализа, однако метод имеет ряд ограничений и не всегда применим к объектам. В случаях, когда объект не поддается кристаллизации, альтернативным подходом может быть комбинация микроскопических и вычислительных методов. На текущий момент примером неподдающихся кристаллизации структур являются полные элонгационные комплексы, включающие (ДНК, РНКП, нуклеосому и фрагмент РНК), к настоящему моменту закристаллизована только РНКП из элонгационного комплекса с фрагментом ДНК в области внутреннего канала [Gnatt et al., 2001]. Знание структурных особенностей элонгационных комплексов может иметь не только фундаментальное, но и практическое медицинское значение в отношении терапии нейродегенеративных и онкологических заболеваний.

### **Метод молекулярной динамики**

Метод молекулярной динамики является широко распространенным вычислительным методом для изучения поведения атомных моделей молекул. В основе методов молекулярной динамики лежит модельное представление о многоатомной молекулярной системе, в которой все атомы представляются взаимодействующими материальными точками, описываемыми классическими ньютоновскими уравнениями движения. Используя этот метод можно исследовать системы порядка  $10^6$  атомов в диапазоне времени до 100 нс. Получающиеся

траектории движения атомов дают совокупную картину развития структурных флуктуаций во времени.

В качестве модели молекулярной системы берут совокупность взаимодействующих точек (атомов), поведение которых описывается уравнениями Ньютона:

$$m_i \frac{d^2 \vec{r}_i(t)}{dt^2} = \vec{F}_i, \quad (9)$$

$$\vec{F}_i = - \frac{dU(\vec{r}_1, \dots, \vec{r}_n)}{d\vec{r}_i}, \quad (10)$$

где  $i$  – номер атома,  $n$  - количество атомов в системе,  $m$  - масса атома,  $r$  - радиус-вектор атома,  $F$  - равнодействующая сил, действующих на атом,  $U$  - потенциальная энергия системы.

Равнодействующая сила рассчитывается как градиент потенциала, представляющего собой сумму всех взаимодействий атомов в системе. Для каждой пары атомов принимаются во внимание валентные связи, кулоновские, ван-дер-ваальсовы взаимодействия, а так же водородные связи. Для трех химически связанных атомов - валентные углы, для четырех связанных атомов - торсионные углы.

На траектории динамики новые координаты и скорости атомов в следующий момент времени  $t + \Delta t$  рассчитываются следующим образом:

$$\vec{r}_i(t + \Delta t) = \vec{r}_i(t) + (\Delta t) \vec{v}_i(t) + \frac{1}{2} (\Delta t)^2 \frac{\vec{F}_i(t)}{m_i}, \quad (11)$$

$$\vec{v}_i(t + \Delta t) = \vec{v}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) + \frac{1}{2} (\Delta t)^2 \frac{\vec{F}_i(t + \Delta t)}{m_i}. \quad (12)$$

Величина шага интегрирования  $\Delta t$  является важным параметром интегрирования. Длина шага должна быть меньше периода самых быстрых изменений координат системы. Для органических молекул это время осцилляции валентной связи С-Н, составляющее 10 фс. Таким образом, для полноатомных МД систем обычно выбирают величину шага интегрирования 1-2 фс. Скорости атомов задаются случайным образом в соответствии с распределением Максвелла для заданной температуры, дальнейшее поведение системы определяется на основании описанных потенциальных атом-атомных взаимодействий и параметров силовых полей. В ходе эксперимента моделируется система: параметры расчетной ячейки, среда, температура, давление и т.д.

Взаимодействие между атомами является потенциальным, поэтому равнодействующая сила находится как градиент потенциала, включающего сумму всех взаимодействий атомов в системе.

Потенциальная энергия в таком случае представляется:

$$U = U_b + U_v + U_\varphi + U_f + U_{qq} + U_{VW} + U_{Hb}, \quad (13)$$

где  $U_b$ -потенциал валентных связей,  $U_v$ - валентных углов,  $U_\varphi$ -торсионных углов,  $U_f$ - плоских групп и псевдоторсионных углов,  $U_{qq}$ - кулоновских сил,  $U_{VW}$ - взаимодействий Ван-дер-Ваальса,  $U_{Hb}$  - водородных связей.

Для каждого типа взаимодействий вводится свой феноменологический закон, параметризованный в рамках соответствующего силового поля. Феноменологические законы потенциалов в разных силовых полях сходны, однако могут существенно отличаться вкладами отдельных составляющих и параметрами взаимодействий (в частности параметры связей и углов).

#### Феноменологические законы для потенциалов в силовых полях

Энергия валентных связей и энергия валентных углов описываются гармоническими потенциалами (14, 15):

$$U_b(r) = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{N_b} K_{b,i} (r_i - r_{0,i})^2, \quad (14)$$

где  $K_{b,i}$  – эффективная жесткость валентной связи,  $i$  – номер связи в молекуле,  $N_b$  - полное число валентных связей,  $r_i$  - фактическая длина связи,  $r_{0,i}$  - равновесная длина связи. Жесткость и равновесная длина связи, входящие в состав силовых полей, отражают геометрию и колебательные частоты модельных соединений.

$$U_v(\alpha) = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{N_v} K_{v,i} (\alpha_i - \alpha_{0,i})^2, \quad (15)$$

где  $K_{v,i}$  – эффективная упругость валентного угла,  $i$  – номер валентного угла в молекуле,  $N_v$  – полное число валентных углов,  $\alpha_i$  – значение валентного угла,  $\alpha_{0,i}$  – равновесное значение валентного угла. Замена реального потенциала, описывающего валентные взаимодействия, на параболический оправдана тем, что при комнатных температурах колебания валентных связей малы. Как и в случае валентных связей, константа упругости и равновесное значение валентного угла отражают равновесную геометрию и колебательные частоты простых модельных молекул.

Потенциальная энергия для торсионных углов, плоских групп и псевдоторсионных углов задается общим выражением (16), представляющим собой ряд Фурье. Было установлено, что во всех случаях достаточно оставлять не более четырех членов ряда (включая нулевой):

$$U_\varphi(\alpha) = \frac{1}{2} \sum_{\varphi=1}^{\Phi} \sum_{l=1}^L K_{\varphi,l} [1 + g_{\varphi,l} \cos(n_{\varphi,l} \alpha_\varphi)], \quad (16)$$

где  $K_{\varphi,l}$  – константа,  $\varphi$  – номер торсионного угла,  $l$  – номер гармоники,  $g_{\varphi,l}$  – вклад гармоники в потенциал торсионного угла ( $-1 < g_{\varphi,l} < 1$ ),  $n_{\varphi,l}$  – кратность гармоники. Потенциалы  $U_{\varphi}$  и  $U_f$  отличаются константами.

Согласно подходу в молекулярной динамике атомы рассматриваются как материальные точки, электроны как таковые не задаются и не учитываются явным образом. Так как распределение электронной плотности в молекуле неравномерно, для описания ее распределения в силовых полях используется парциальный заряд для каждого атома. Потенциальная энергия взаимодействия заряженных атомов характеризуется электростатическим потенциалом (17):

$$U_{qq}(\vec{r}_i, \vec{r}_j) = \sum_{i \neq j} \frac{q_i q_j}{\varepsilon r_{ij}}, \quad (17)$$

где  $r_i, r_j$  – координаты взаимодействующих атомов,  $q_i, q_j$  – их парциальные заряды,  $\varepsilon$  – диэлектрическая проницаемость среды ( $\varepsilon = 1$  для вакуума),  $r_{ij} = |\vec{r}_i - \vec{r}_j|$ . Как правило для далекодействующие взаимодействия не учитываются, что позволяет увеличить скорость расчета. Для этого используют принимают радиус отсечки для взаимодействий (cut-off).

Взаимодействия между атомами, не связанными валентной связью, имеют электродинамическую природу и называются Ван-дер-Ваальсовыми взаимодействиями. Они описываются с помощью потенциала Леннарда-Джонса (потенциала 6-12, формула 18) или потенциала для водородной связи (19):

$$U_{vw}(\vec{r}_i, \vec{r}_j) = \sum_{i \neq j} \left[ \frac{A}{r_{ij}^{12}} - \frac{B}{r_{ij}^6} \right], \quad (18)$$

$$U_{hb}(\vec{r}_i, \vec{r}_j) = \sum_{i \neq j} \left[ \frac{A'}{r_{ij}^{12}} - \frac{B'}{r_{ij}^{10}} \right], \quad (19)$$

где  $A, B, A', B'$  – константы, определяющие глубину потенциальной ямы и расположение ее минимума,  $r_{ij} = |\vec{r}_i - \vec{r}_j|$ . Отталкивание на близком расстоянии в этих формулах аппроксимируется членом  $\frac{1}{r_{ij}^{12}}$ , выбор степени 12 обусловлен математическими удобствами.

Водородная связь относится к специальному типу связи и обусловлена тем, что радиус иона водорода на порядок меньше, чем у других ионов. В формулах (18) и (19) имеется различие во вкладах, описывающих притяжение: зависимость  $\frac{B}{r_{ij}^6}$  соответствует дисперсионному диполь-

дипольному взаимодействию, а  $\frac{B'}{r_{ij}^{10}}$  вводится исходя из феноменологических соображений. В ряде современных редакций полей (например, AMBER, начиная с версии 96) потенциал водородных связей в форме (19) не используется, а эффективно учитывается комбинацией потенциалов Леннарда-Джонса и кулоновских взаимодействий близлежащих атомов.

### Температура и термостаты

В молекулярной динамике температура системы вводится через среднее значение кинетической энергии:

$$E = \frac{\sum_{n=1}^N m_n v_n^2}{2N}, \quad (20)$$

где  $m$  - молекулярная масса атома,  $v$  - скорость атома,  $N$  - полное число атомов в системе.

Из статистической физики связь энергии и температуры описывается как:

$$E = \frac{3k_B T}{2}, \quad (21)$$

где  $k_B$  – константа Больцмана,  $T$  – температура системы.

Для температуры получаем выражение:

$$T = \frac{\sum_{n=1}^N m_n v_n^2}{3Nk_B}. \quad (22)$$

После проведения усреднения по времени получаем значение температуры в молекулярно-динамическом эксперименте:

$$\bar{T} = \frac{1}{3Nk_B \tau} \int_{t_0}^{t_0+\tau} \sum_{n=1}^N m_n v_n^2 dt.$$

При изучении молекулярной динамики обычно фиксируют температуру термостата.

В ходе вычислительного МД эксперимента молекул используется конечная длина шага, за который атомы координаты атомов изменятся в соответствии с уравнениями МД. В результате чего по завершению шага атомы могут оказаться на небольшом в запрещенной области потенциального поля. На следующем шаге может получить избыточную кинетическую энергию, что приведет к разогреванию системы. Для избежания разогревания системы используют алгоритмы термостатирования.

#### Масштабирование скорости

Алгоритм масштабирования скорости предполагает умножение скорости каждого атома на фактор, зависящий от отношения температуры системы к значению текущей температуры. Умножение повторяется через каждые несколько шагов интегрирования.

Если температура системы в момент времени  $t$  составляет  $T(t)$  (на основании кинетической энергии системы), а  $T_0$ - необходимая для поддержания температура, значение фактора –  $\lambda$ , масштабирования может быть вычислено как:

$$\Delta T = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N 2 \frac{m_i (\lambda v_i)^2}{3Nk_B} - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N 2 \frac{m_i v_i^2}{3Nk_B}, \quad (23)$$

$$\Delta T = (\lambda^2 - 1)T(t), \quad (24)$$

$$\lambda = \sqrt{T_0/T(t)}. \quad (25)$$

### Термостат Берендсена

При использовании термостата Берендсена температура  $T_0$  поддерживается фиксированной извне. Масштабирование скоростей производится на каждом шаге, а изменение температуры со временем вычисляется как:

$$\frac{dT(t)}{dt} = \frac{1}{\tau}(T_0 - T(t)), \quad (26)$$

где  $\tau$  – параметр, характеризующий взаимодействие между внешним нагревателем и системой. Температура системы пошагово изменяется следующим образом:

$$\Delta T = \frac{\delta t}{\tau}(T_0 - T(t)). \quad (27)$$

А фактор  $\lambda$  масштабирования скорости будет описываться уравнением 28:

$$\lambda^2 = 1 + \frac{\delta t}{\tau} \left\{ \frac{T_0}{T(t - \frac{\delta t}{2})} - 1 \right\}. \quad (28)$$

### Поддержание постоянного давления

Для поддержания постоянного давления системы в молекулярной динамике применяются алгоритмы баростатирования. Наиболее распространенными баростатами являются баростаты Берендсена и Парринелло-Рамана [Parrinello&Rahman, 1981].

На каждом шаге давление рассчитывается с применением вириальной теоремы Клаузиуса между кинетической энергией и вириалом:

$$P = \frac{2}{V}(E_{kin} - Vi), \quad (29)$$

где  $V$  – размер ячейки на каждом шаге, а  $Vi$  - вириал. Вириал рассчитывается по формуле 30:

$$Vi = -\frac{1}{2} \sum_{i \leq j} r_{ij} F_{ij}. \quad (30)$$

Баростат Берендсена в конце каждого шага пересчитывает координаты и линейные размеры ячейки с помощью матрицы  $x'$ , чтобы привести систему к заданному давлению  $P_0$ :

$$x' = x - \frac{\Delta t}{3\tau} \beta \{P_0 - P(t)\}, \quad (31)$$

где  $\beta$  – коэффициент изотермической сжимаемости,  $\tau$  – коэффициент баростатирования,  $P_0$  – задаваемое давление,  $P(t)$  – текущее давление на шаге.

Баростат Парринелло-Рамана допускает не только изменение объема вычислительной ячейки, но и ее формы, а векторы периодической ячейки представлены матрицей, подчиняющейся уравнениям движения.

Баростаты можно применять изотропно, анизотропно и полуизотропно (например в системах с границей раздела фаз, таких как липидная мембрана).

### Неравновесная молекулярная динамика

Метод неравновесной (управляемой) молекулярной динамики используется для изучения процессов, характерное время которых превышает достижимые методом МД времена траекторий. При равновесной молекулярной динамике атомы движутся под действием сил взаимодействия с другими атомами системы. В случае управляемой МД на отдельные атомы системы налагается дополнительный потенциал, который направляет молекулярные процессы по определенным степеням свободы.

В молекулярном пакете Gromacs внешняя сила определяется фиксирующим вектором и внешним ускорением. В этом случае уравнение для скорости примет вид:

$$\vec{v}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = f_g * \lambda * \left[ \vec{v}_i\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) + \frac{\vec{F}_i(t)}{m_i} \Delta t + a_n \Delta t \right], \quad (32)$$

где  $f_g$  – фиксирующий вектор, который равен «0», если атом фиксирован или равен «1», если нет,  $a_n$  – внешнее ускорение в нм/пс<sup>2</sup>, а  $\lambda$  – коэффициент термостатирования, который рассчитывается в соответствии с используемым термостатом.

## Глава II

### Материалы и методы

#### 2.1. Материалы

Материалы, использованные для подготовки сеток для электронной микроскопии негативного контрастирования

##### 1. Растворы и материалы

- Ацетат уранила-натрия раствор 1%;
- Сетки медные для электронной микроскопии (SPI, США) диаметр 3мм.

##### 2. Оборудование

- Прибор для лиофилизации Emitech K100X (Emitech Ltd., UK).

Материалы, использованные для подготовки сеток для крио-электронной микроскопии

##### 1. Растворы и материалы

- Сетки медные для крио-электронной микроскопии (Quantifoil, Германия) диаметр 3мм, число ячеек 400/дюйм, покрытые пластиковой подложкой с отверстиями диаметром 1,2 мкм.

##### 2. Оборудование

- Прибор для нанесения материала на сетки Vitrobot Mark IV (FEI, Нидерланды).
- Прибор для лиофилизации Emitech K100X (Emitech Ltd., UK).
- Суперкомпьютерный комплекс «Ломоносов» (МГУ, Москва).

## 2.2. Методы

### Подготовка проб для ПЭМ-исследования

Получение элонгационных комплексов, остановленных в +24 положении от входа в нуклеосому (ЭК(+24)) на интактных нуклеосомах и с разрывом сахарофосфатного остова ДНК в положении +12 (в сотрудничестве с Герасимовой Н.С., Лаборатория регуляции транскрипции и репликации Биологического факультета МГУ).

### Получение фрагментов ДНК

В качестве ДНК-матрицы для сборки мононуклеосом использовался фрагмент ДНК, содержащий измененную позиционирующую нуклеосому последовательность 603 [Lowary&Widom, 1998] и искусственный  $\sigma^{70}$ -специфичный промотор T7A1 для РНКП *E. Coli*. В последовательность ДНК был введен сайт узнавания фермента никазы для внесения разрыва в сахарофосфатный остов нематричной цепи в определенном положении (+12). ДНК-матрицы были получены методом ПЦР-мутагенеза на основе синтетического олигонуклеотида T7A1\_s603-25A (конечная нуклеотидная последовательность приведена в Приложении 2).

Для отбора и клонирования фрагментов ДНК с интересующей последовательностью нуклеотидов использовали набор InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific) по стандартному протоколу производителя. Для клонирования плазмид, полученных при лигировании продуктов амплификации в вектор pTZ57R/T, использовали бактерии *Escherichia Coli* штамма Ultra XL10 Gold. Анализ колоний на наличие вставки нужного фрагмента в плазмиду проводили с помощью ПЦР в присутствии олигонуклеотидов M13-20 и M13-Rev. Колонии, содержащие плазмиду с интересующей длиной встройки, высевали на жидкую среду LB с ампициллином в концентрации 100 мкг/мл с последующей ночной культивацией в качалке при 150 об/мин при 37°C. Плазмидную ДНК выделяли с помощью набора QIAprep Spin Miniprep (Quiagen). Секвенирование плазмид и ПЦР-продуктов произведено фирмой Синтол (Москва) на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3100 («Applied Biosystems»). ДНК-матрицы с модифицированными последовательностями нуклеотидов амплифицировали в ходе ПЦР с использованием полученных плазмид в качестве матрицы и олигонуклеотидов FAM-282Forwhst и 603R.

Для внесения одностороннего разрыва (никирование) в строго определенное положение нуклеосом-позиционирующей последовательности (НПП) фрагменты ДНК обрабатывали никазой Nt.BsmA1 (NEB). Реакцию проводили в буфере 4 (NEB) с 1 мкг ДНК в объеме 50 мкл, инкубировали ночь при 37°C. ДНК-фрагменты, никированные с эффективностью не менее 95%, очищали от фермента и реактивов обработкой фенолом.

### Сборка нуклеосом

Нуклеосомы были собраны на матрице методом ступенчатого диализа против растворов с понижающейся ионной силой в присутствии хроматина без гистона H1. Диализ проводился при температуре 4°C в буфере, содержащем 10 мМ Трис-НСl pH 7,5, 0,1% тергитол, 0,2 мМ ЭДТА, 5 мМ бета-меркаптоэтанола и NaCl (1М – 1 час; 0,75М – 1 час; 0,5М – 2,5 часа; 0,01М - ночь).

### Транскрипция нуклеосом РНКП *E. Coli in vitro*

Транскрипция полученных матриц проводилась РНКП *E. Coli* в транскрипционном буфере (ТВ: 20 мМ Трис-НСl, pH 7,9, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ 2-меркаптоэтанол и KCl в концентрации 40/150/300 мМ) при комнатной температуре по схеме:

- Сборка холофермента РНКП *E. Coli* производилась путем инкубации коровой части фермента РНКП *E. Coli* с субъединицей  $\sigma^{70}$  в буфере ТВ40 (число обозначает концентрацию KCl в мМ) в течение 15 мин.;
- Добавление нуклеосомы с ДНК-матрицей (1/5 часть по количеству), инкубация в течение 10 мин. В результате чего происходит сборка открытого транскрипционного комплекса;
- Транскрипция инициировалась добавлением тририбонуклеотида АУС, АТФ и ГТФ до концентрации 20 мкМ каждого. Смесь инкубировалась в ТВ40 в течение 10 мин. В результате данного этапа образуется элонгационный комплекс (-39), содержащий 11-мерный фрагмент РНК;
- Для исключения реинициации добавлялся рифампицин до концентрации 20 мкг/мл;
- Дальнейшее добавление ЦТФ в концентрации до 4 мкМ приводит к формированию ЭК (-5) с 45-мерным участком РНК; инкубация на этом этапе происходит в течение 10 минут;
- Для удаления из реакционной смеси всех присутствующих рибонуклеотидов элонгационные комплексы очищались с использованием агарозных шариков с Ni-NTA носителем (Qiagen). 20 мкл шариков трижды промывались буфером ТВ40, затем инкубировались в течение 15 мин в присутствии бычьего сывороточного альбумина (0,2 мг/мл) и снова промывались ТВ. Рекombинантная РНК-полимераза *E. Coli* несла гистидиновый тэг, через который комплексы в ходе 15-минутной инкубации были связаны с Ni-NTA группами на агарозных шариках. Далее шарики с комплексами были трижды отмыты буфером для транскрипции ТВ150. Очищенные комплексы были элюированы 100 мМ имидазолом и использованы в дальнейшей работе;
- Необходимое положение РНКП в элонгационном комплексе достигалось 10-минутной инкубацией ЭК(-5) в присутствии ограниченного набора рибонуклеотидов (УТФ и ГТФ

в концентрации 20 мкМ, ЦТФ – 4 мкМ). Эффект остановки РНКП в заданной позиции достигается за счет лимитирования реакции транскрипции по одному или нескольким рибонуклеотидам. Из-за отсутствия субстрата фермент доходит до точки на матрице, где соответствующий/е рибонуклеотид/рибонуклеотиды отсутствуют в формируемом транскрипте, и останавливается. Определение количества активных транскрипционных комплексов проводили электрофоретическим разделением в ПААГ в нативных условиях.

- В случае системы с односторонним разрывом ДНК в положении (+12) ближайшей к промотору границы нетранскрибируемой цепи ДНК остановка РНКП осуществлялась спонтанно в связи с дефицитом рибонуклеотидов.

Получение остановленных комплексов ЭК(+42) на интактных нуклеосомах (в сотрудничестве с Hsieh F.K., Rutgers University, USA).

#### Получение фрагментов ДНК и сборка нуклеосом

Получение фрагментов ДНК для сборки мононуклеосом производилось по принципу, описанному выше для ЭК(+24) за исключением введения сайта распознавания нуклеозидом. В качестве ДНК-матрицы сборки мононуклеосом использовался фрагмент ДНК, содержащий участок с позиционирующей нуклеосому последовательностью нуклеотидов, разработанный на основе НПП 603 [Lowary&Widom, 1998] и искусственный  $\sigma^{70}$ -специфичный промотор T7A1 (Pr-603.42; 269 пар оснований).

Сборка нуклеосом как и в первом случае производилась на матрице методом ступенчатого диализа против растворов с понижающейся ионной силой в присутствии хроматина без гистона H1. Ступенчатый диализ NaCl производился от 2М до 0,01М.

#### Транскрипция нуклеосом РНКП *E. Coli in vitro*

Получение транскрипционного комплекса производилось по методике, аналогичной использованной для ЭК(+24). Очистка полученных комплексов производилась путем диализа против ТВ в течение 2-3 часов.

## **Нанесение проб на сетки для ПЭМ**

### Подготовка образцов ЭК (+24) и (+42) для электронной микроскопии с негативным контрастированием

- *Подготовка сеток*

Медные сетки для электронной микроскопии, покрытые слоем аморфного углерода, помещались в аппарат Emitech K100X и обрабатывались в режиме тлеющего разряда при силе тока 20 мА в течение 45 сек.

- *Нанесение образца на сетки*

Раствор образца ЭК в буфере TB150 с имидазолом 125мМ (концентрация ~ 5 нг/мкл) в количестве 3 мкл наносился на медную сетку диаметром 3 мм, выдерживался 30 с. Избыточный раствор удалялся с помощью фильтровальной бумаги.

- *Контрастирование сеток*

Негативная окраска производилась 1% ацетатом уранила-натрия: сетка дважды промывалась на каплях по 30 с, излишки удалялись фильтровальной бумагой.

- *Высушивание*

Готовая сетка с нанесенным и контрастированным ЭК высушивалась на воздухе.

### Подготовка образца ЭК(+42) для крио-электронной микроскопии

- *Нанесение образца на сетки*

Приготовленные образцы в объеме 3 мкл наносились на сетки с использованием аппарата Vitrobot Mark IV (FEI). В камере аппарата Vitrobot Mark IV поддерживались постоянная температура (22°C) и влажность (95%). Сетки зажимались в пинцете и автоматически промакивались с помощью бумажных фильтров для удаления излишков жидкости в течение 2 сек. После этого пинцет с зажатой сеткой моментально погружался в жидкий этан для образования аморфного льда, содержащего частицы ЭК. Хранили сетки с нанесенными образцами в контейнерах, погруженных в жидкий азот, до использования.

## **Проведение исследований методами ПЭМ**

Исследование образцов методом ПЭМ с негативным контрастированием производилось на просвечивающем электронном микроскопе JEOL 2100 на базе Межкафедральной лаборатории электронной микроскопии Биологического факультета МГУ (Москва, Россия). Использовалось ускоряющее напряжение 200 кВ в условиях низкой дозы (<10-20 электронов на

Å<sup>2</sup> в секунду) для уменьшения повреждения образца под воздействием электронного пучка. Изображения получали с увеличением  $\times 25000$  с помощью Gatan ПЗС-камеры (размер матрицы 2000x2000 пикселей). Размер пикселя на микрофотографиях составил 5,3 Å.

Исследование образцов методом крио-ПЭМ производилось на просвечивающем электронном микроскопе Tecnai G2 Spirit TEM (FEI, Нидерланды) на базе Института кристаллографии им. А.Н.Шубникова РАН, при напряжении 120 кВ в режиме низкой дозы ( $10 \text{ e}/\text{Å}^2$ ). Для получения изображений использовали ПЗС-камеру Eagle (FEI, Нидерланды) с размерами матрицы 4000x4000 пикселей.

Получение ПЭМ изображений в негативном контрастировании производилось с использованием нескольких подходов. Изображения получались в техниках вертикальной съемки, случайного конического наклона (RCT) и разновидности метода конического наклона – OTR (Orthogonal tilt reconstruction) [Leschziner et al., 2007].

Для получения изображений методом ортогонального конического наклона (OTR) производилась съемка одной и той же области изображения под парными углами  $+45^\circ$  и  $-45^\circ$ . Примеры полученных изображений приведены на рисунке 20.

Обработка полученных изображений производилась с использованием программы EMAN2.1 в режиме Random conical tilt (Случайный конический наклон). Изображения индивидуальных частиц собирали попарно и объединяли в стэки. На выходе было получено два стэка: первый стэк представляет собой набор частиц, снятых под углом  $-45^\circ$ , второй стэк - под углом  $+45^\circ$ . Коррекция ЧКХ при использовании данного подхода не производится, так как оба набора изображений сняты с наклоном.

Получение изображений в крио-ПЭМ проводилось с использованием метода классической вертикальной съемки.

Докинг (фиттинг) атомных структур в карты электронной плотности производился в программе UCSF Chimera [Goddard et al., 2007] с использованием алгоритма поиска наибольшего значения кросс-корреляционной функции между картой электронной плотности и картой, соответствующей кристаллической структуре нуклеосомы либо РНКП *E.Coli* при заданном разрешении [Orlova&Saibil, 2011; Rossmann, 2000; Chacon&Wriggers, 2002; Jensen, 2010]. Атомные структуры нуклеосомы (1AOI) и РНКП *E.Coli* (4JKR) находятся в PDB [RCSB Protein Data Bank, [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)].

Оценка разрешения полученных 3D структур производилась в программе IMAGIC по методу ОКФ с коэффициентом 0,5 [Saxton&Baumeister, 1982; van Heel et al., 2005].

Измерение расстояний между центрами нуклеосомы и РНК-полимеразы производилось с использованием программы ImageJ [<https://imagej.nih.gov/ij/>]. Расстояния оценивались между центрами нуклеосомы и РНКП в классовых суммах, гистограммы строились с использованием

программы Statistica Base [StatSoft Russia].

### **Проведение расчетов методом молекулярной динамики**

Все МД расчеты для выполнения задачи по оценке влияния введения одонитового разрыва на механические свойства ДНК проводились с использованием программного пакета Gromacs 4.6.5 [Spoel et al., 2013] и силового поля Amber99sb-ildn [Lindorff-Larsen et al., 2010].

Расчет траекторий проводился в NPT-ансамбле при температуре 300 К (термостат Берендсена) и изотропном давлении – все компоненты давления 1 бар (баростат Берендсена), использованная модель воды — SPC-E [Berendsen et al., 1987]. Для потенциалов Леннарда-Джонса радиус отсечки составлял 1.8 нм [Levitt et al., 1995], для расчета электростатических взаимодействий использовался метод PME [Darden&Pedersen, 1993] с радиусом отсечки 1.8 нм [Darden&Pedersen, 1993]. Шаг интегрирования — 1 фс.

## Глава III

### Результаты

#### 3.1 Исследования ЭК, остановленного в положении активного центра РНКП *E. Coli* +42 позиции нуклеосом-позиционирующей последовательности

##### 3D структура ЭК(+42), полученная с использованием метода негативного контрастирования

Для получения трехмерной структуры ЭК, остановленного в положении +42 НПП активного центра РНКП использовали следующую схему:

1. Получение и обработка данных, полученных методом OTR (см. методы);
2. Получение предварительной 3D реконструкции ЭК на основании данных OTR;
3. Получение и обработка данных, полученных методом вертикальной съемки;
4. Получение финальной 3D структуры ЭК, методом улучшения предварительной реконструкции.

Число полученных микрофотографий и собранных с них изображений индивидуальных частиц отражено в таблице 1. Обработка и анализ данных, полученных методом негативного контрастирования и крио-электронной микроскопии проводились независимо.

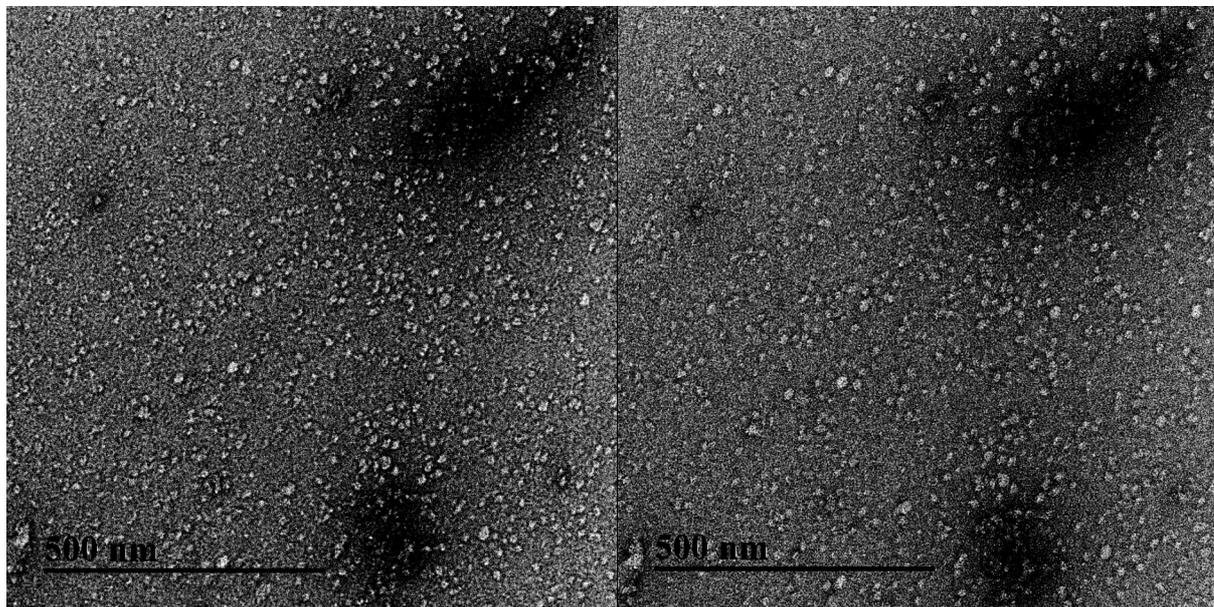
**Таблица 1. Данные, полученные путем исследования ЭК(+42) методами ПЭМ негативного контрастирования и крио-ПЭМ.**

Метод получения ПЭМ изображение	Число полученных МФ/пар МФ	Число собранных частиц/пар частиц (для метода случайного конического наклона)
Негативное контрастирование (НК): классическая вертикальная съемка	40	6000
НК: Метод ортогонального конического наклона	25	2500
Крио-ПЭМ: классическая вертикальная съемка	115	3500

##### Получение предварительной реконструкции ЭК(+42) с использованием метода OTR

Процессы итеративной классификации и выравнивания собранных частиц производились с использованием программы EMAN2.1 в режиме RCT, при этом

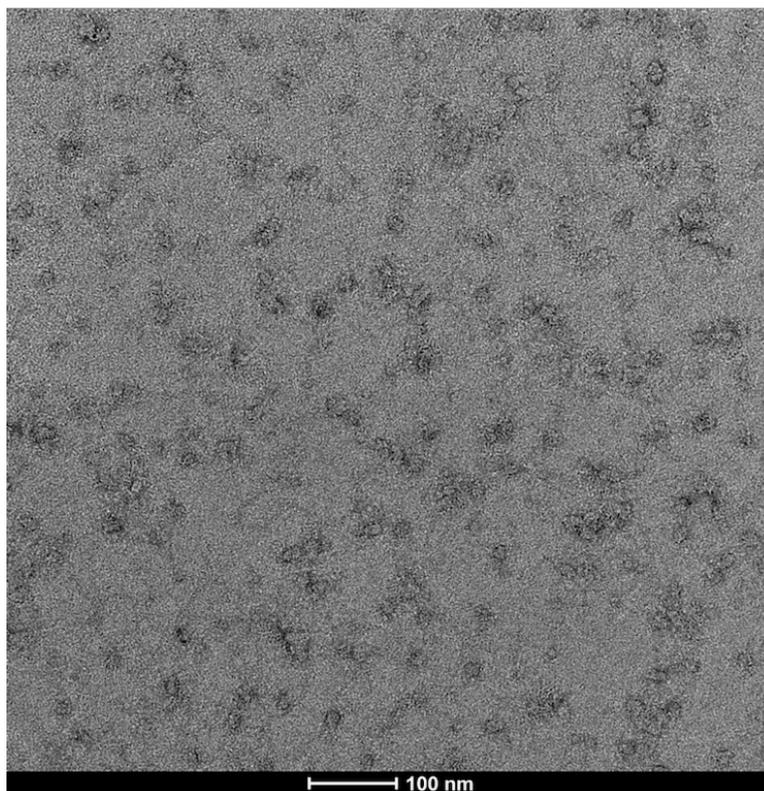
классификации подвергался один стэк частиц (под углом  $+45^\circ$ ), изображения индивидуальных частиц из второго стека автоматически определялись в классы вместе с соответствующей парой их противоположного стека (рисунок 20). Реконструкция предварительной 3D структуры производилась с использованием программы EMAN2.1.



**Рисунок 20. Микрофотографии с изображением ЭК(+42) полученные с использованием техники негативного контрастирования методом OTR: слева - угол  $-45^\circ$ , справа  $+45^\circ$ .**

Получение трехмерной структуры ЭК(+42) путем совместного анализа данных.

ПЭМ-изображения (пример представлен на рисунке 21), полученные методом классической вертикальной съемки, обрабатывались с использованием программного пакета IMAGIC [van Heel, 1996]. С его помощью производилась коррекция ЧКХ и сборка индивидуальных частиц в стэк (информация о количестве собранных индивидуальных частиц представлена в таблице 2).



**Рисунок 21. Микрофотография с изображением ЭК(+42), полученная с использованием техники негативного контрастирования и вертикальной съемки.**

Совместный анализ объединенного набора данных, полученных методом OTR и классической вертикальной съемки, производился в программе IMAGIC [van Heel, 1996]. Было произведено 6 раундов итеративного выравнивания и классификации частиц.

Угловая реконструкция улучшенной трехмерной структуры ЭК(+42) производилась в программе IMAGIC [van Heel, 1996], в качестве шаблона использовалась предварительная 3D структура, полученная методом OTR.

### **Получение 3D структуры ЭК(+42) методом крио-ПЭМ**

#### Сборка индивидуальных крио-изображений ЭК+42

Частицы собирались с изображений в полуавтоматическом режиме с использованием программы EMAN Boxer [Ludtke et al., 1999] в режиме «Реконструкция одиночных частиц» (Single particles reconstruction, SPR) и объединялись в стек для дальнейшей классификации и анализа. Обработывали изображения в программе IMAGIC: произведено 6 раундов итеративного выравнивания и классификации частиц.

Угловая реконструкция трехмерной структуры ЭК(+42) производилась без использования шаблона в программе IMAGIC (Reference-free reconstruction). Для дальнейшего улучшения и анализа структуру разделили на 3 (функция Split в программе IMAGIC), каждая из которых характеризовалась в целом меньшей ошибкой реконструкции. Наиболее

репрезентативная модель (85% массива данных) далее итеративно улучшалась (2 раунда улучшения) с использованием репроекций.

### **3.2 Исследования элонгационного комплекса, остановленного в положении +24 активного центра РНКП *E. Coli***

Изображения ЭК(+24) с однонитевым разрывом в 12 положении НПП нематричной цепи ДНК и без разрыва (в условиях дефицита рибонуклеотидов в системе) получали с увеличением  $\times 40000$  для ЭК(+24) с однонитевым разрывом,  $\times 25000$  для образцов ЭК(+24) без разрыва, с помощью ПЗС-камеры Gatan. Размер пикселя составил соответственно 2,9 Å и 5,3 Å.

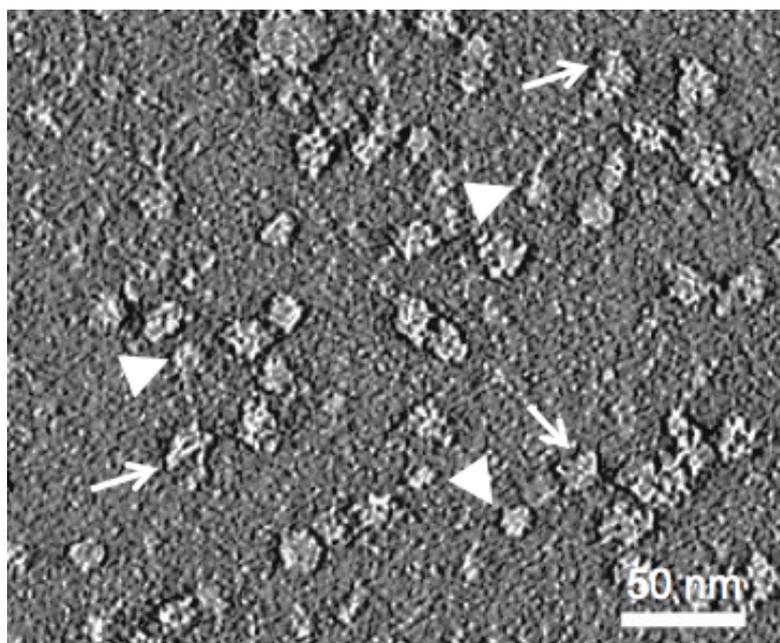
Для получения максимального количества информации об ориентации образцы исследовались с помощью следующих техник: вертикальной съемки, метода случайного конического наклона (Random conical tilt, RCT) [Asturias et al., 2002] и электронной томографии (теоретические основы методов описаны в литературном обзоре).

Реконструкции производились по схеме:

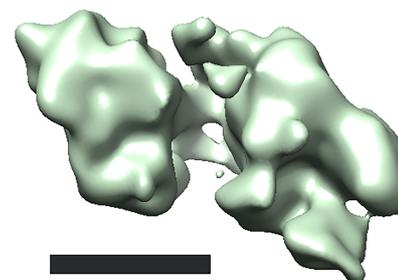
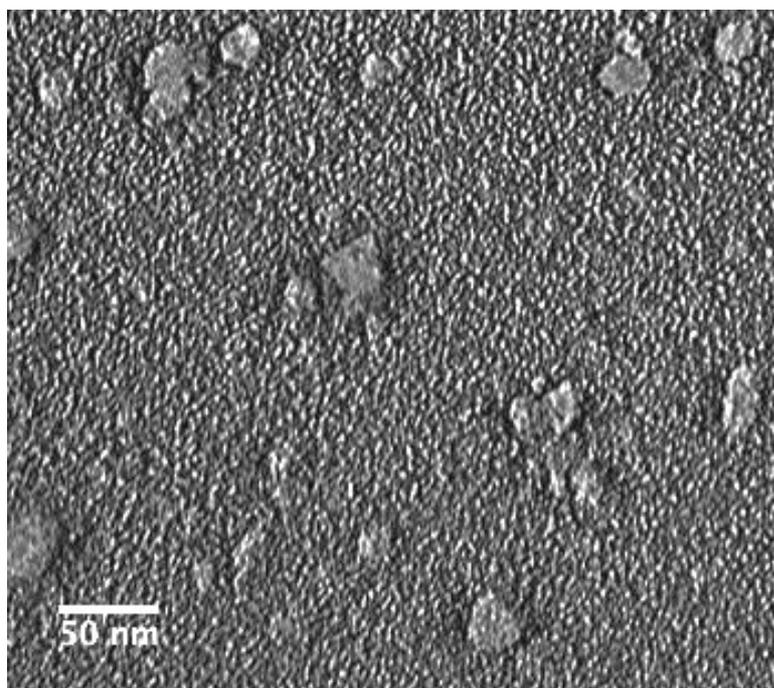
1. Получение и обработка данных электронной томографии;
2. Получение предварительной реконструкции ЭК на основании данных электронной томографии;
3. Получение и обработка совместных данных, полученных методами вертикальной съемки и RCT;
4. Получение 3D структуры ЭК на основании совместных данных, с использованием предварительной реконструкции из электронной томографии в качестве шаблона.

#### **Получение предварительной реконструкции ЭК(+24) с использованием электронной томографии**

Томографирование сеток с нанесенным образцом производилось в диапазоне углов от (-60°) до (+60°) с шагом в 1°. Сборка ПЭМ изображений в трехмерный стек производилась с использованием программы Digital micrograph (совм. с Моисеенко А.В.). Обработка томограмм производилась в программе EMAN2.1 [Ludtke et al., 1999] (Single particles tomography, SPT). Индивидуальные томограммы комплексов вырезались, подвергались усреднению для получения предварительной 3D реконструкции ЭК(+24) (рисунок 22). Количество исходных частиц приведено в таблице 2.



**А - ЭК(+24) без одонитевого разрыва**



**Б - ЭК(+24) с разрывом в позиции +12 НПП**

**Рисунок 22. Обработка томограмм. В левой части рисунка приведены изображения поперечных срезов через томограммы. На рисунке А треугольниками отмечена нуклеосома, стрелками – РНКП. В правой части изображений - предварительные реконструкции ЭК(+24) структур с одонитевым разрывом (Б) и без него (А). Размер масштабного отрезка для структуры без разрыва – 10 нм, с одонитевым разрывом – 15 нм.**

**Таблица 2. Данные, полученные путем исследования ЭК(+24) методами ПЭМ негативного контрастирования.**

ЭК(+24)	Число полученных МФ метод вертикальной съемки	Число собранных частиц (метод вертикальной съемки)	Число полученных пар частиц МФ методом RCT	Число собранных пар частиц (метод RCT)	Число исследованных томограмм	Число собранных индивидуальных частиц с томограмм
Без однонитевого разрыва	30	1347	25	1377	1	15
Никированные в позиции +12 НПП	90	5730	30	511	2	121

3D структура ЭК(+24) с однонитевым разрывом (рисунок 22 Б, правая часть) характеризуется некоторым уплощением РНКП и искажением общей структуры, то есть, анизотропией. Данный эффект, по-видимому, связан с ограниченным количеством данных, использованных для реконструкции.

### **Получение 3D структуры ЭК(+24) с использованием метода RCT и негативного контрастирования.**

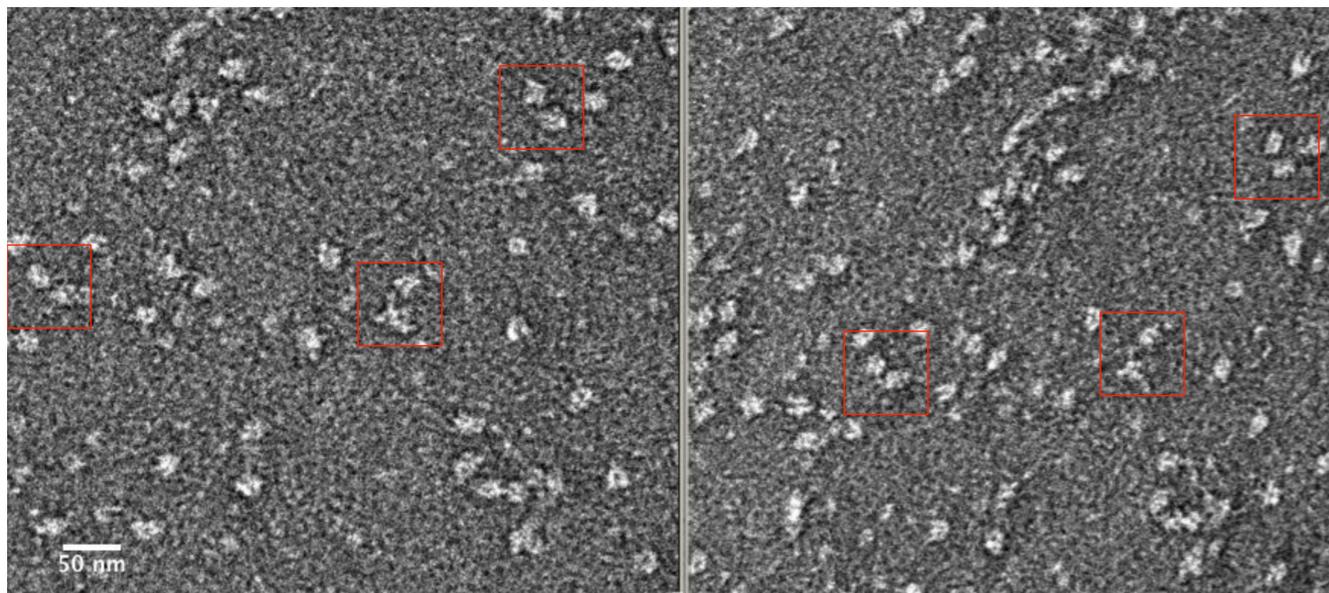
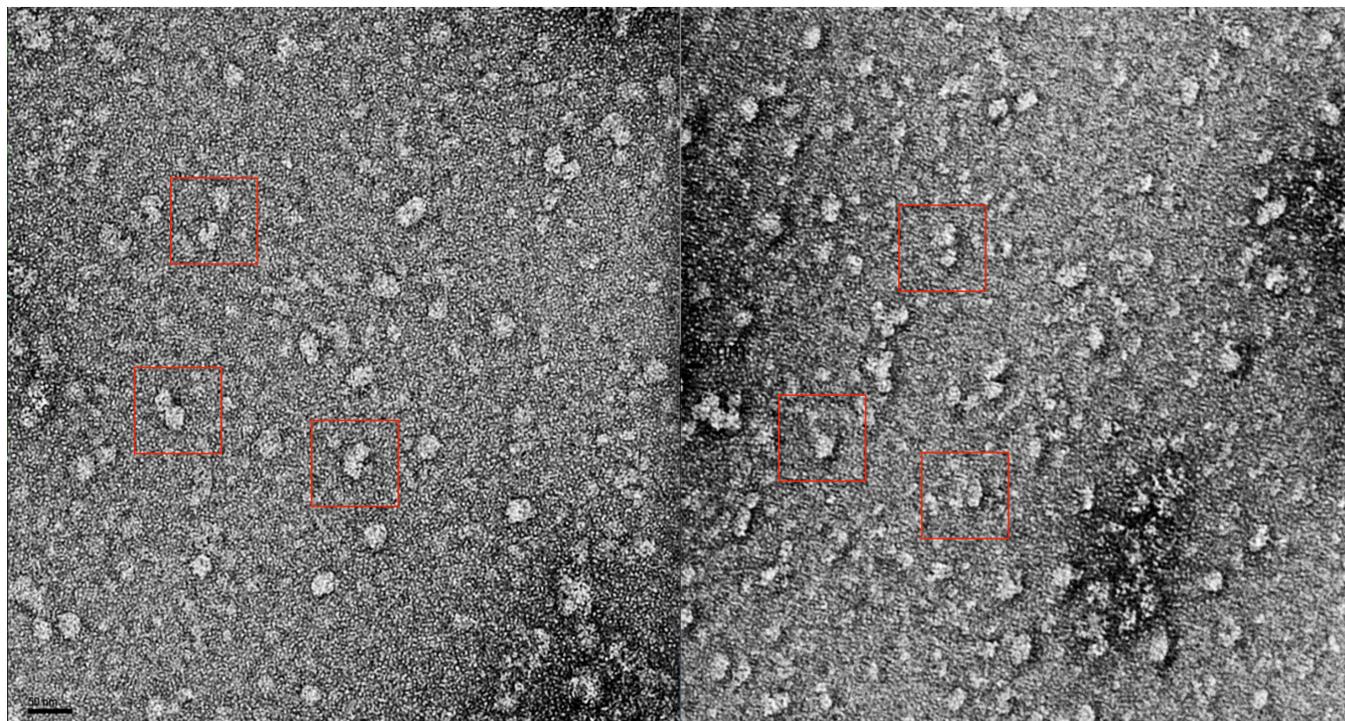
Получение изображений методом RCT (Random conical tilt) производилось попарной съемкой одной области изображения под двумя углами: под углами  $0^\circ$  и  $+51^\circ$  для ЭК(+24) без разрыва, и  $0^\circ$  и  $+45^\circ$  для ЭК(+24) с однонитевым разрывом. Примеры полученных изображений приведены на рисунке 23.

Обработка ПЭМ изображений производилась с использованием программы EMAN2.1 в режиме «Random conical tilt» (Случайный конический наклон). Сборка изображений частиц производилась попарно, изображения объединялись в стэки. На выходе было получено два стэка: первый стэк представляет собой набор частиц под углом  $0^\circ$ , второй стэк - набор частиц под углами  $+51^\circ$  и  $+45^\circ$  соответственно. Коррекция частотно-контрастной характеристики проводилась в программе EMAN2.1. Согласно методике, значение ЧКХ определялось для изображений, снятых при  $0^\circ$ , параметры ЧКХ соответствующих микрофотографий применялись для стэка соответствующих частиц. На выходе были получены стэки частиц со скорректированным значением ЧКХ.

ПЭМ изображения (приведены на рисунке 24), полученные методом классической вертикальной съемки, обрабатывались с использованием программного пакета IMAGIC [van Heel, 1996]: с его помощью производилась коррекция ЧКХ и сборка индивидуальных частиц в стэк.

Для дальнейшей обработки (классификации и выравнивания) изображения частиц, полученных методами вертикальной съемки и RCT, объединялись один набор данных. Совместный анализ частиц производился с использованием программного пакета EMAN2.1: произведено 8 раундов выравнивания и классификации.

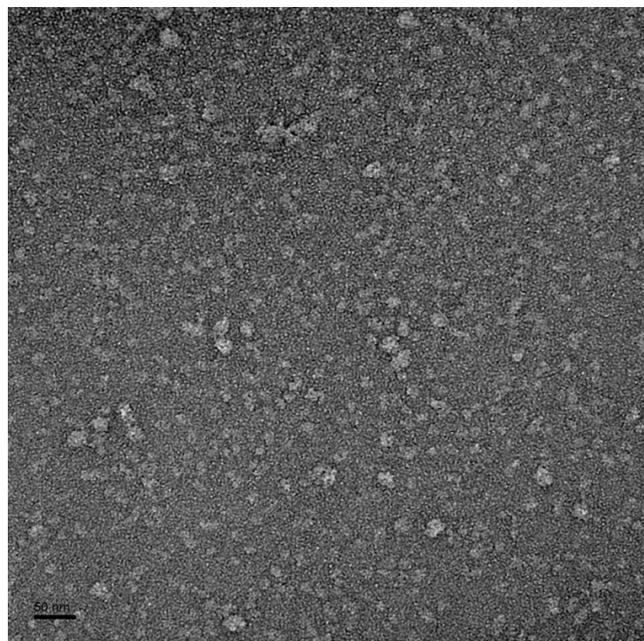
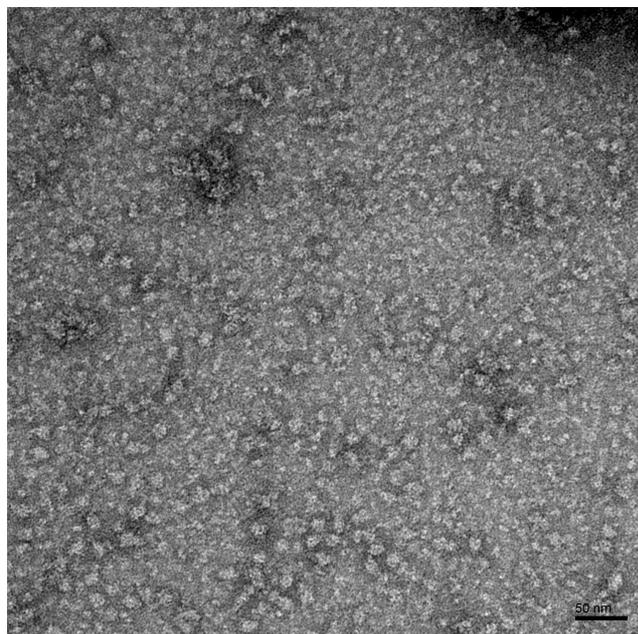
Угловая реконструкция 3D структуры ЭК(+24) производилась в программе EMAN 2.1. В качестве шаблона использовалась предварительная реконструкция, полученная методом электронной томографии (рисунок 22). Полученная 3D структура далее подвергалась 4 раундам улучшения с использованием репроекций.

**А - ЭК(+24) без одностороннего разрыва****0°****+51°****Б - ЭК(+24) никированные в позиции +12 НПП****0°****+45°**

**Рисунок 23. Микрофотографии ЭК(+24), полученные методом РСТ, в красных боксах выделены соответствующие пары частиц. Масштабные отрезки – 50 нм.**

**А - ЭК (+24) без однонитевого разрыва**

**Б - ЭК (+24) с однонитевым разрывом в  
положении +12 НПП**



**Рисунок 24. Электронные микрофотографии образцов элонгационных комплексов (+24), снятых без наклона.**

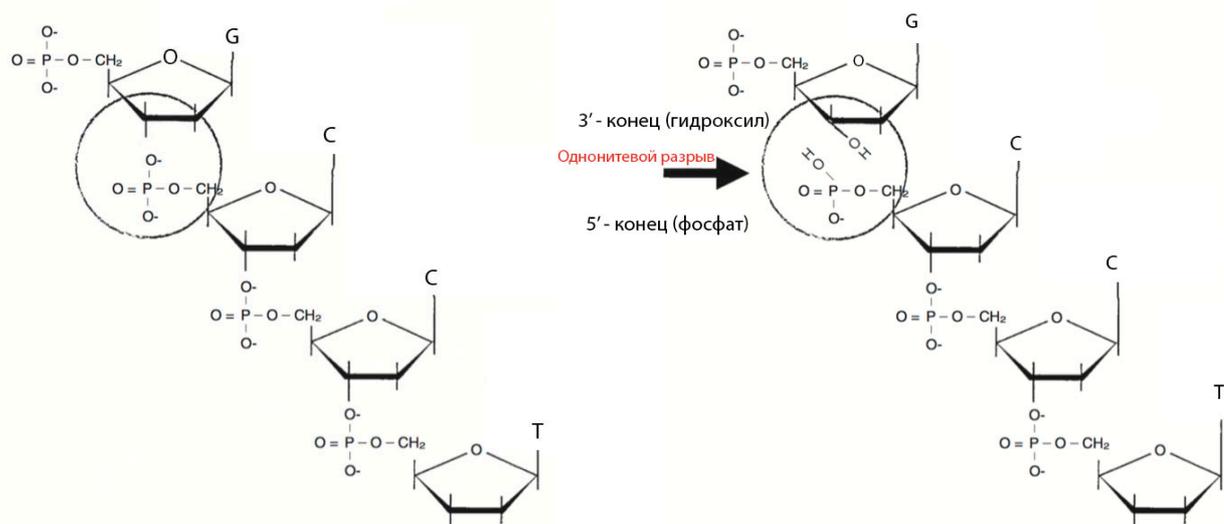
### **3.3. Применение молекулярно-динамического подхода для исследования влияния введения однонитевого разрыва на механические параметры (жесткость и гибкость) фрагмента ДНК**

**Создание моделей исследуемых структур фрагмента ДНК без однонитевого разрыва и с однонитевым разрывом**

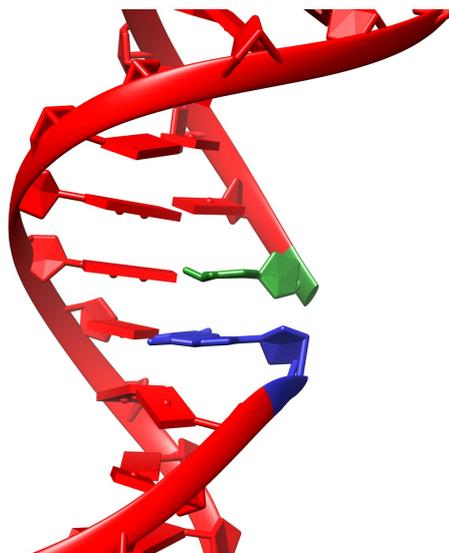
Для исследования влияния введения однонитевого разрыва на механические свойства ДНК была взята 20 п.н. последовательность ДНК из 603 нуклеосом-позиционирующей последовательности (участок проксимальный к промотору) с введением однонитевого разрыва в (+12) положении нематричной цепи ДНК. Таким образом, исследуемая система представляла собой фрагмент ДНК из задачи по исследованию элонгационного комплекса, с остановленной РНКП в положении +24: фрагмент ДНК без однонитевого разрыва и с однонитевым разрывом в положении (+12) нематричной цепи (схематичное изображение участков с разрывом и без приведено на рисунках 25 и 26).

Последовательность матричной цепи: **3'-GGGCCACAGAGGCCGGGCGGA-5'**.

Последовательность нематричной цепи: **5'-CCCGGTGTCTCCGCCCCGCCT-3'**, место введение одонитевого разрыва – нуклеотид **C** в положении (+12) – выделен красным цветом.



**Рисунок 25.** Введение одонитевого разрыва в нематричную цепь ДНК (типы азотистых остнований представлены буквенными обозначениями).



**Рисунок 26.** Изображение одонитевого разрыва в нематричной цепи: зеленым изображен модифицированный **C**, синим – модифицированный **G**.

Структура для проведения вычислительных экспериментов построена в программе Chimera [Goddard et al., 2007]. Топология структуры получена в Gromacs 4.6.5 [Spoel et al., 2013] с использованием силового поля Amber99sb-ildn [Lindorff-Larsen et al., 2010]. Введение одонитевого разрыва производилось разрывом ковалентной связи сахарофосфатного остова между кислородом –O3' дезоксирибозы G и фосфором фосфатной группы **C** нематричной цепи. Введение одонитевого разрыва никазами сопровождается гидролизом, в результате чего

образуются –ОНЗ' на дезоксирибозе G и HO- группа на фосфатной группе C (рисунок 25). Аналогичная модификация остатков на месте однонитевого разрыва была произведена для исследуемой структуры с однонитевым разрывом. Изображение области однонитевого разрыва в модельной структуре ДНК с однонитевым разрывом приведено на рисунке 26.

### Оценка влияния введения однонитевого разрыва на жесткость ДНК

Для подготовки исследуемых структур к проведению управляемой молекулярной динамики системы релаксировались: были проведены расчеты равновесной молекулярной динамики структур ДНК без однонитевого разрыва и с однонитевым разрывом в водном растворе с физиологической концентрацией ионов хлорида натрия в течение 500 пс без баростата, и в течение 3 нс с баростатом. Параметры расчетной ячейки приведены в таблице 3:

**Таблица 3. Параметры расчетной ячейки структур ДНК без однонитевого разрыва и с однонитевым разрывом в положении +12 НПП в задаче по оценке влияния введения однонитевого разрыва на жесткость ДНК.**

Система	Размер расчетной ячейки, нм	Количество атомов	Количество противоионов Na/Cl
ДНК без однонитевого разрыва	6,0×15,0×6,0	53049	87/49
ДНК с однонитевым разрывом в положении +12 НПП	6,0×15,0×6,0	53057	86/49

Расчет модуля Юнга растяжения немодифицированной последовательности ДНК и ДНК с однонитевым разрывом производилась с применением управляемой молекулярной динамики. Длина траектории составила 2 нс.

В ходе вычислительного эксперимента фиксировалась верхняя пара азотистых оснований DG5 и DC3, фиксация осуществляется по трем координатам (x,y,z). Противоположному концу фрагмента нуклеиновой кислоты сообщалось ускорение. Ускорения сообщались атомам фосфора цепи P19 и P21 (предпоследняя пара оснований, так как на концевом DA5 нет фосфата). Величина ускорений равнялась: 6, 8, 10 (нм/пс<sup>2</sup>) по координате y для трех систем аналогично, соответствующие приложенные силы равнялись 9, 12, 15  $\frac{\text{ккал}}{\text{моль}\cdot\text{Å}}$ .

Расчет модуля растяжения производился по формуле:

$$E = \frac{F}{A_0} \cdot \frac{L_0}{\Delta L}, \quad (33)$$

где F – сила, приложенная к концу цепи (в Ньютонах),  $A_0$  – поверхность приложения силы (ангстрем<sup>2</sup>),  $L_0$  – начальное расстояние между центрами масс концевых пар атомов фосфора

(нм),  $\Delta L$  - относительное удлинение соответствующего расстояния (нм).

Единица измерения модуля Юнга -  $\frac{H}{m^2} = \text{Па}$ .

### Оценка влияния введения однонитевого разрыва на характер стэкинг-взаимодействий в области разрыва ДНК

Для подготовки исследуемых структур к проведению управляемой молекулярной динамики системы релаксировались: были проведены расчеты равновесной молекулярной динамики структур ДНК без однонитевого разрыва и с однонитевым разрывом в водном растворе с физиологической концентрацией ионов хлорида натрия в течение 500 пс без баростата, и в течение 3 нс с баростатом. Параметры расчетной ячейки приведены в таблице 4:

**Таблица 4. Параметры расчетной ячейки структур ДНК без однонитевого разрыва и с однонитевым разрывом в положении +12 НПП в задаче по оценке влияния введения однонитевого разрыва на гибкость ДНК.**

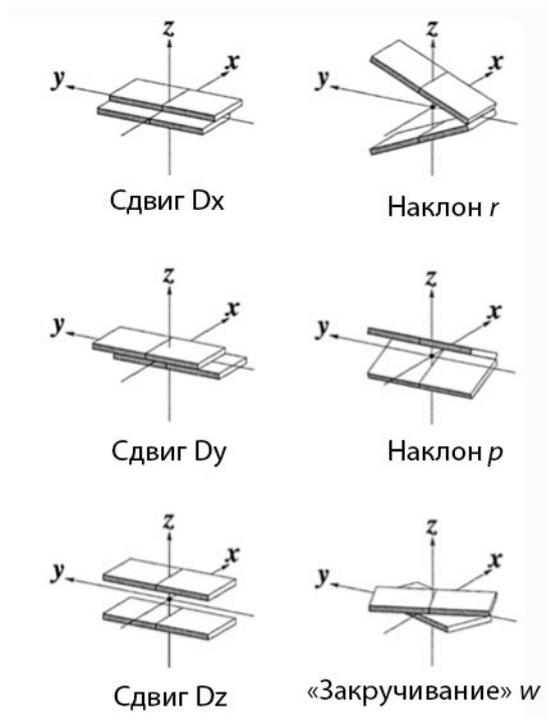
Система	Размер расчетной ячейки, нм	Количество атомов	Количество противоионов Na/Cl
ДНК без однонитевого разрыва	5,7×9,4×5,6	28693	65/27
ДНК с однонитевым разрывом в положении +12 НПП	5,7×9,4×5,6	25878	64/27

В эксперименте по исследованию влияния введения однонитевого разрыва на гибкость ДНК длина траекторий составила 20 нс.

Расчет параметров подвижности для соседних нуклеотидных пар производился с использованием программы X3 DNA <http://x3dna.org> [Lu et al., 2000; Colasanti et al., 2013; Xiang-Jun&Olson, 2003] на основании координат, полученных из траекторий молекулярной динамики.

Оценивались следующие параметры соседних нуклеотидных пар (рисунок 27):

- 1) Сдвиг вдоль оси x ( $D_x$ );
- 2) Сдвиг вдоль оси y ( $D_y$ );
- 3) Сдвиг вдоль оси z ( $D_z$ );
- 4) Угол наклона между плоскостями соседних пар нуклеотидов  $r$ ;
- 5) Угол наклона между плоскостями соседних пар нуклеотидов  $p$ ;
- 6) Угол «закручивания» между плоскостями соседних пар нуклеотидов  $w$ .



**Рисунок 27. Иллюстрация параметров, рассчитывавшихся для оценки влияния однонитевого разрыва на характер стэкинг-взаимодействий в цепи ДНК.**

## Глава IV

## Обсуждение

#### 4.1. Интерпретация структурных особенностей элонгационного комплекса, остановленного в положении +42 активного центра РНКП *E. Coli*

В первой части работы анализировался молекулярный механизм образования высокого барьера между РНКП и нуклеосомой *in vitro* в области +(40-50) [Gaykalova, Volokh et al., 2015]. Полученные нами результаты показали, что после столкновения с сильным нуклеосомным барьером в данной области, происходит отбрасывание РНКП обратно вдоль ДНК матрицы на нуклеосоме. РНКП отступает обратно на расстояние от 4 до 6 п.н. относительно области паузирования и оказывается остановленной в положении (+42) ЭК. Ранее предполагалось, что отбрасывание РНКП может приводить к образованию участка свободной ДНК между ферментом и нуклеосомой (рисунок 28), однако в нашей работе было показано, что, видимо, происходит обратное закручивание ДНК на гистоновом октамере. Нуклеосом-специфичная остановка РНКП в данном положении является стабильной, но полностью обратимой с участием либо факторов транскрипции, либо с изменением реакционной среды.



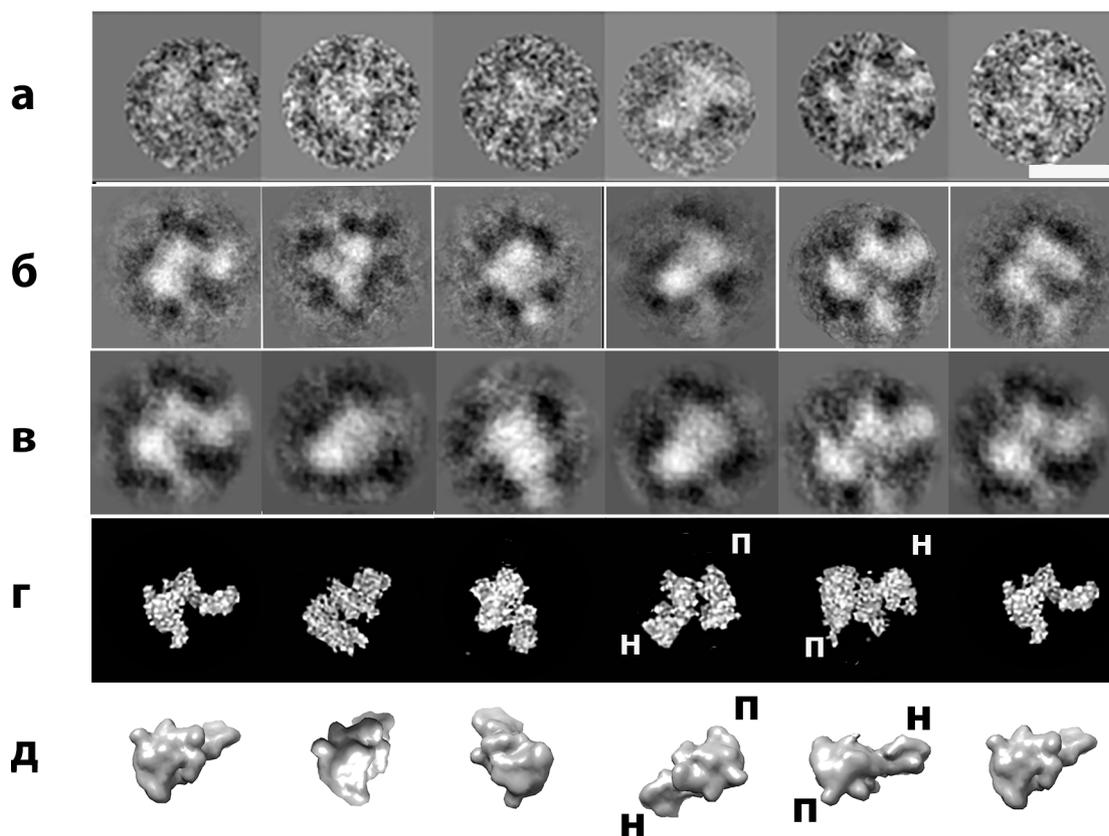
**Рисунок 28.** Схематичное изображение возможного образования области свободной ДНК между РНКП и нуклеосомой [Gaykalova, Volokh et al., 2015].

Структурные исследования были выполнены на модельном объекте мононуклеосомных комплексов с 603 НПП и РНКП *E. Coli*, остановленной в положении (+42) элонгационного комплекса, с проведением последующего докинга кристаллических структур в полученную электронную плотность. Для получения трехмерной структуры ЭК(+42) применялись два независимых метода: электронная микроскопия негативного контрастирования, и крио-электронная микроскопия. В связи с тем, что применение методов электронной микроскопии к исследованию элонгационных комплексов производилось впервые, было решено сопоставить

полученные результаты от двух независимых методов для оценки адекватности подхода и сопоставления получаемых трехмерных структур.

### Анализ 3D структуры ЭК, остановленного в положении +42 активного центра РНКП *E. Coli*, полученной методом крио-ПЭМ

Этапы получения 3D структуры ЭК(+42) из частиц, замороженных в витрифицированном льду: изображения индивидуальных частиц (рисунок 29 А), соответствующих классов сумм (рисунок 29 Б), репроекций (рисунок 29 В) и собственных изображений трехмерной структуры (рисунок 29 Г) представлены ниже.



**Рисунок 29.** Поэтапная иллюстрация крио-ПЭМ исследования ЭК(+42): А - индивидуальные изображения частиц, Б – соответствующие классы частиц, В – проекции 3D структуры, Г – 3D структура в соответствующих ориентациях, Д – представленная в виде электронной плотности компьютерная модель ЭК(+42) (РНКП - 2O5I, нуклеосома - 1A0I). Размер масштабного отрезка - 25 нм.

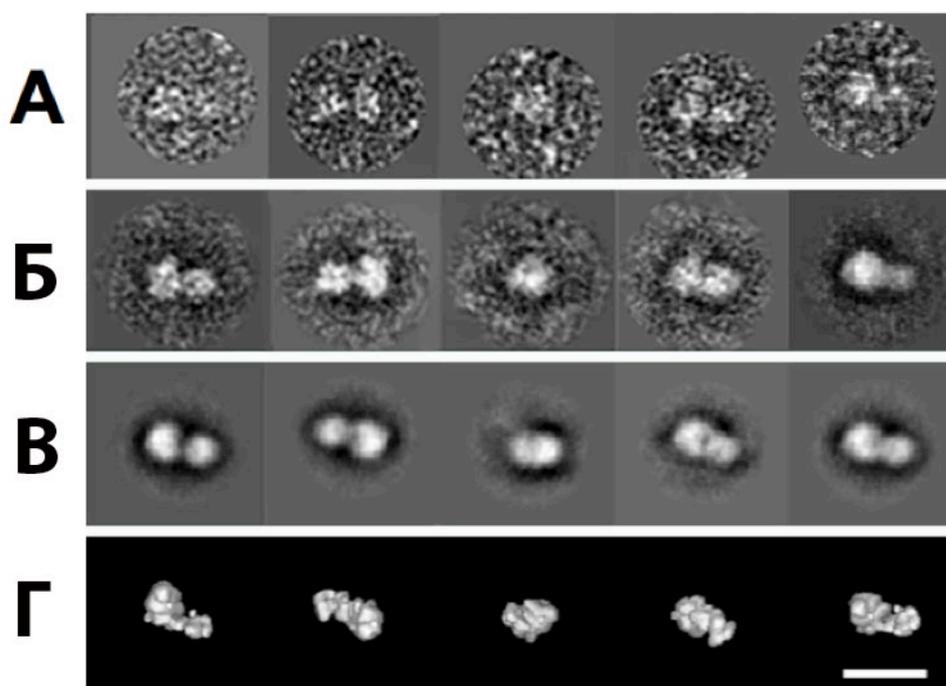
Полученная 3D структура представляет собой две электронные плотности, соединенные друг с другом, большая с высотой ~20 нм и шириной ~10 нм, и меньшая с диаметром ~ 8 нм (рисунок 29 Г), которые могут быть по размерам соотнесены с РНК-полимеразой и нуклеосомой. Разрешение реконструкции, рассчитанное методом ОКФ [Saxton&Baumeister, 1982; van Heel M., Schatz, 2005] при коэффициенте корреляции 3-сигма составило 25 Å.

Для интерпретации полученной реконструкции использовали модель ЭК(+42). Для получения модели использовали кристаллические структуры нуклеосомы [1A0I, Davey et al., 2002] и РНК-полимеразы [2O5I, Vassylyev et al., 2007], отфильтрованные с разрешением 25 Å с помощью программы UCSF Chimera [Goddard et al., 2007] (модель на рисунке 29 Д выполнена Шайтаном А.К.). При этом разрешении размеры кристаллических структур становятся сопоставимыми с размерами доменов в крио-ПЭМ 3D реконструкции. Модель элонгационного комплекса (рисунок 29 Д) по своим размерам и расположению соответствующих субдоменов соответствовала 3D реконструкции (рисунок 29 Г).

Низкое значение разрешения крио-ПЭМ реконструкции может быть связано с ограниченным набором данных, полученных в витрифицированном льду, а также в связи со сложностью получения изображений ЭК из-за его относительной подвижности.

### **Анализ 3D структуры ЭК, остановленного в положении +42 активного центра РНКП *E. Coli*, полученной методом ПЭМ негативного контрастирования**

Преимуществом негативного контрастирования перед крио-ПЭМ является наличие контрастных образцов с высоким отношением сигнал/шум (см. обзор литературы). Поэтому мы использовали этот метод как альтернативный для получения реконструкции ЭК(+42). Изображения индивидуальных частиц и соответствующих им классовых сумм, и репроекций 3D структуры представлены на рисунке 30. Исходя из рисунка 30, репроекции 3D структуры (рисунок 30 В) хорошо согласуются с соответствующими классами (рисунок 30 Б), что свидетельствует в пользу адекватности полученной 3D структуры.



**Рисунок 30.** Поэтапная иллюстрация ПЭМ исследования ЭК(+42) ПЭМ негативного контрастирования, А - индивидуальные изображения частиц, Б –классы частиц, В – проекции полученной трехмерной структуры, Г – полученная трехмерная структура в соответствующих ориентациях. Размер масштабного отрезка - 25 нм.

Индивидуальные частицы и соответствующие суммы (рисунок 30 А, Б), как и крио-изображения (рисунок 29 А, Б) характеризуются двумя близко расположенными доменами. Трехмерная структура включает больший (~20 нм) и меньший (~14 нм) субдомены, которые могут быть соотнесены с РНК-полимеразой и нуклеосомой соответственно, однако их структурные особенности не обнаруживаются при полученном разрешении.

3D структура ЭК(+42), полученная методом ПЭМ негативного контрастирования, приведена на рисунке 31. Разрешение ее, оцененное по методу объемной корреляции Фурье с коэффициентом 0,5, составило 22 Å (график зависимости значения кросс-корреляционной функции от пространственной частоты приведен на рисунке 32). Контурный уровень финальной структуры был выбран из расчета средней белковой плотности 844 Да/нм<sup>3</sup>, объем соответствует молекулярной массе ЭК ~745 кДа.

Следует заметить, что разрешение, полученное при использовании негативного контрастирования, оказалось лучше, чем при использовании крио-ПЭМ. Это может быть

связано с низким контрастом комплекса во льду. Применяя метод негативного контрастирования, мы смогли улучшить контраст изображений.

Для интерпретации 3D структуры был произведен компьютерный докинг (фиттинг) кристаллических структур РНК-полимеразы *E. Coli* (код 4JKR в PDB) в больший сегмент электронной плотности и нуклеосомы (1KX5) в меньший сегмент. Соответствие кристаллических структур с соотнесенными областями электронных плотностей трехмерных карт характеризуется значением кросс-корреляционной функции 0,73. Модель свидетельствует в пользу того, что ЭК, остановленный в положении 42 НПП активного центра РНКП содержит одиночные моноклеосому и РНКП.

Интерпретация 3D структуры с использованием докинга кристаллических структур демонстрирует, что область, соотнесенная с димером гистонов H2A/H2B (рисунок 31) обращена в среду и не взаимодействует с ДНК или РНКП, однако остается ассоциированной с октамером. Данная особенность была ранее описана в работе Кулаевой О.И. с соавторами [Kulaeva et al., 2009], где показано, что перемещение РНКП от (+42) до (+49) положений сопровождается полным обратным закручиванием нуклеосомной ДНК на поверхность димера (рисунок 33). Это свидетельствует о том, что димер гистонов не покидает октамер по меньшей мере до положения (+49). Димер гистонов показывает удивительную стабильность в ходе транскрипции, учитывая, что время на потерю обоих димеров H2A/H2B составляет менее 1 секунды при полном удалении ДНК [Feng et al., 1993]. Ранее было показано, что связывание промотор-проксимального димера H2A/H2B с тетрамером H3/H4 в ЭК(+42) может быть аллостерически стабилизировано сохраняющимися ДНК-гистоновыми взаимодействиями в нуклеосоме, что является важным фактором нуклеосомного выживания в ходе транскрипции [Bintu et al., 2011].

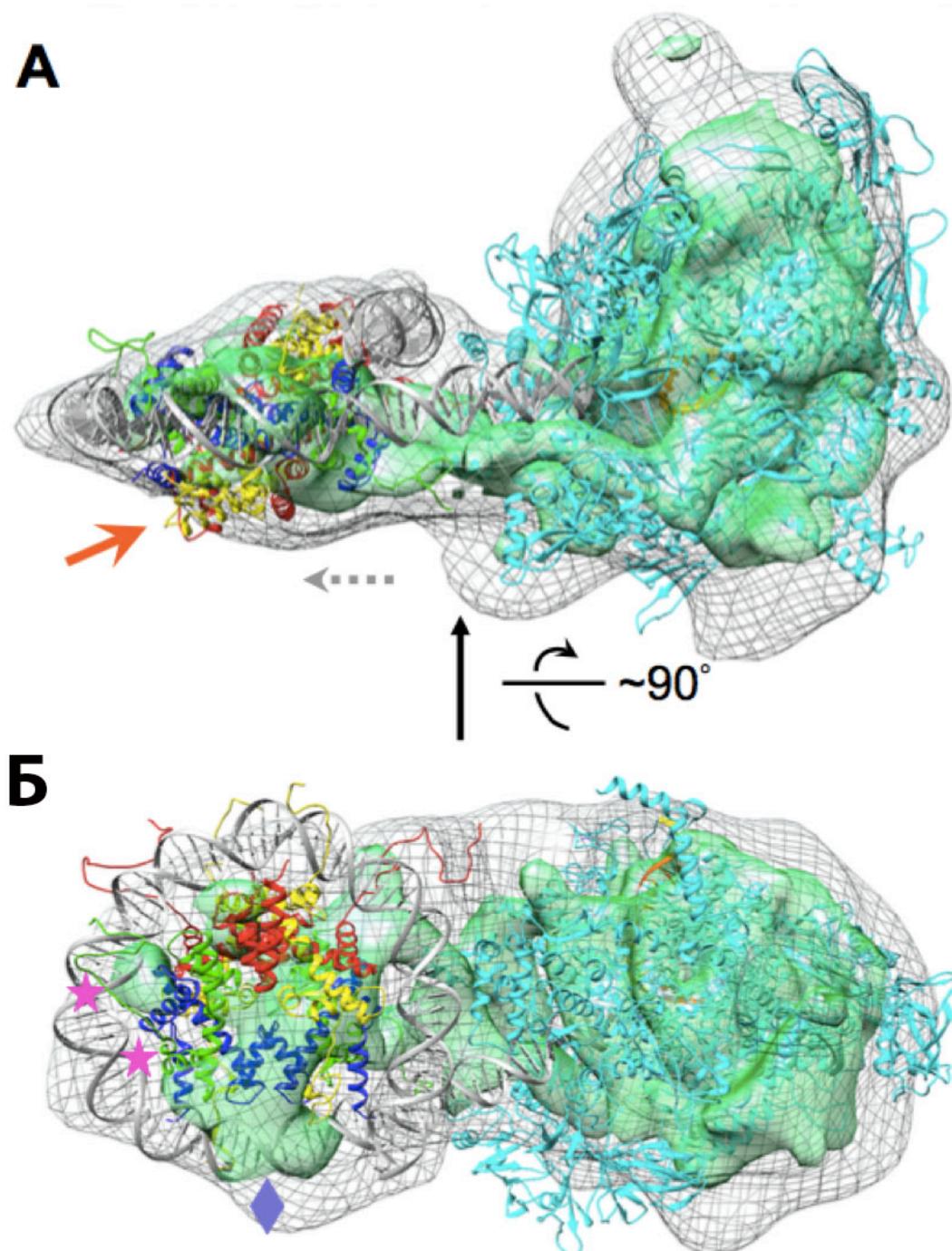


Рисунок 31. Трехмерная структура элонгационного комплекса (+42). Электронная плотность изображена сеткой, произведен докинг кристаллических структур РНКП *E. Coli* (4JKR) и нуклеосомы (1KX5). Серой пунктирной стрелкой показано направление хода транскрипции. Оранжевая стрелка показывает на электронную плотность, соотнесенную с димером гистонов H2A/H2B, в рамках данной модели она обращена в среду и не взаимодействует с нуклеосомной ДНК и РНКП.

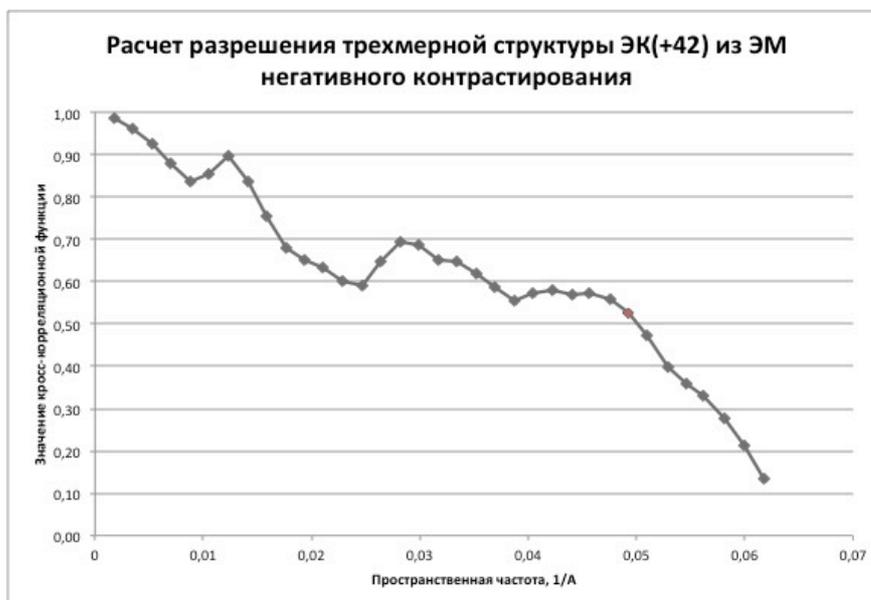


Рисунок 32. График зависимости значения кросс-корреляционной функции от пространственной частоты ЭК(+42), значение разрешения рассчитывается при коэффициенте 0,5.

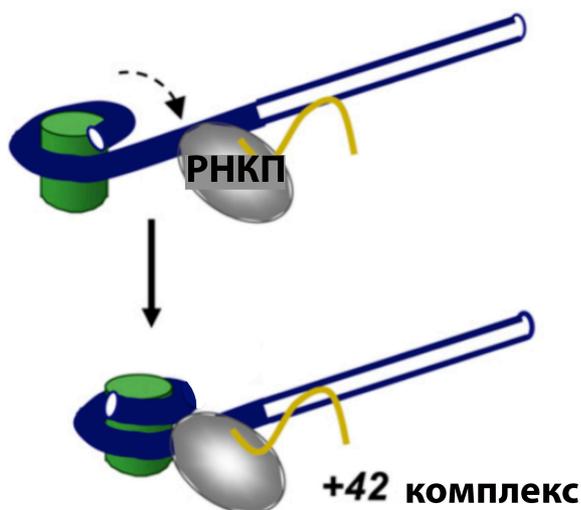


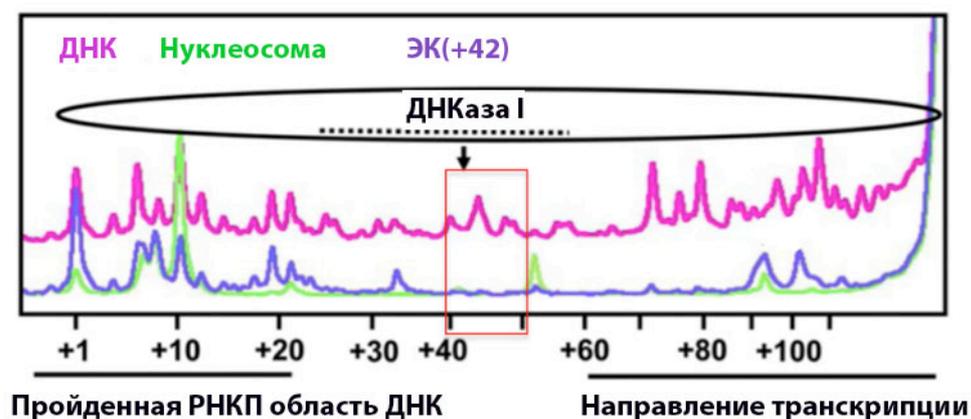
Рисунок 33. Схематичное изображение обратного закручивания (направление закручивания изображено пунктирной стрелкой) освобожденного участка ДНК на нуклеосому в ходе образования ЭК(+42) при столкновении РНКП с нуклеосомным барьером в положении +(46-48) НПП.

Сравнение и анализ 3D структур ЭК(+42), полученных методами негативного контрастирования и крио-ПЭМ.

Полученные методами электронной микроскопии негативного контрастирования и крио-ПЭМ трехмерные структуры элонгационного комплекса, остановленного в положении 42 активного центра РНК-полимеразы *E. Coli* характеризуются сходной морфологией: в обеих

структурах четко дифференцируются два субдомена электронной плотности большего и меньшего размеров, сопоставимые по размерам с РНК-полимеразой и нуклеосомой соответственно (рисунки 29, 30).

В обеих 3D структурах РНК-полимераза *E. Coli* и нуклеосома находятся в непосредственной близости друг к другу, соединяющий их короткий фрагмент ДНК скрыт фрагментами белков, что свидетельствует против образования свободного участка ДНК в структуре ЭК(+42). Для выявления областей ДНК, незащищенных контактами с нуклеосомой и РНК-полимеразой, нашими коллегами из лаборатории Регуляции транскрипции и репликации биофака МГУ был проведен футпринтинг ДНКазой I, показавший отсутствие доступных нуклеазе участков нуклеосомной ДНК в области между РНК-полимеразой и нуклеосомой [Gaykalova, Volokh et al., 2015] (рисунок 34).



**Рисунок 34.** Анализ данных футпринтинга элонгационного комплекса (+42) ДНКазой I, пики соответствуют сайтам узнавания и рестрикции ДНКазой I. Красным блоком выделена интересующая зона: на рисунке красным блоком отмечен сайт узнавания нуклеазой последовательности ДНК в области НПП +(40-50), однако эта зона не доступна ДНКазе I как в нуклеосоме, так и в элонгационном комплексе (+42) (отсутствие пиков на зеленой и фиолетовой кривых в области красного блока).

Согласованные результаты ПЭМ и данных футпринтинга свидетельствуют в пользу гипотезы о том, что отбрасывание назад РНК-полимеразы сопровождается обратным закручиванием освободившейся ДНК, расположенной между ферментом и нуклеосомой по направлению хода транскрипции (рисунок 34) [Gaykalova, Volokh, et al., 2015].

Морфологическое сходство полученных разными методами 3D структур между собой, а так же сопоставимость проекций трехмерных структур с соответствующими двумерными классами свидетельствует в пользу адекватности и относительной надежности полученных карт

электронной плотности. На основании интерпретации полученных трехмерных структур была предложена модель элонгационного комплекса в положении +42 НПП активного центра РНК-полимеразы *E. Coli* (рисунок 35).

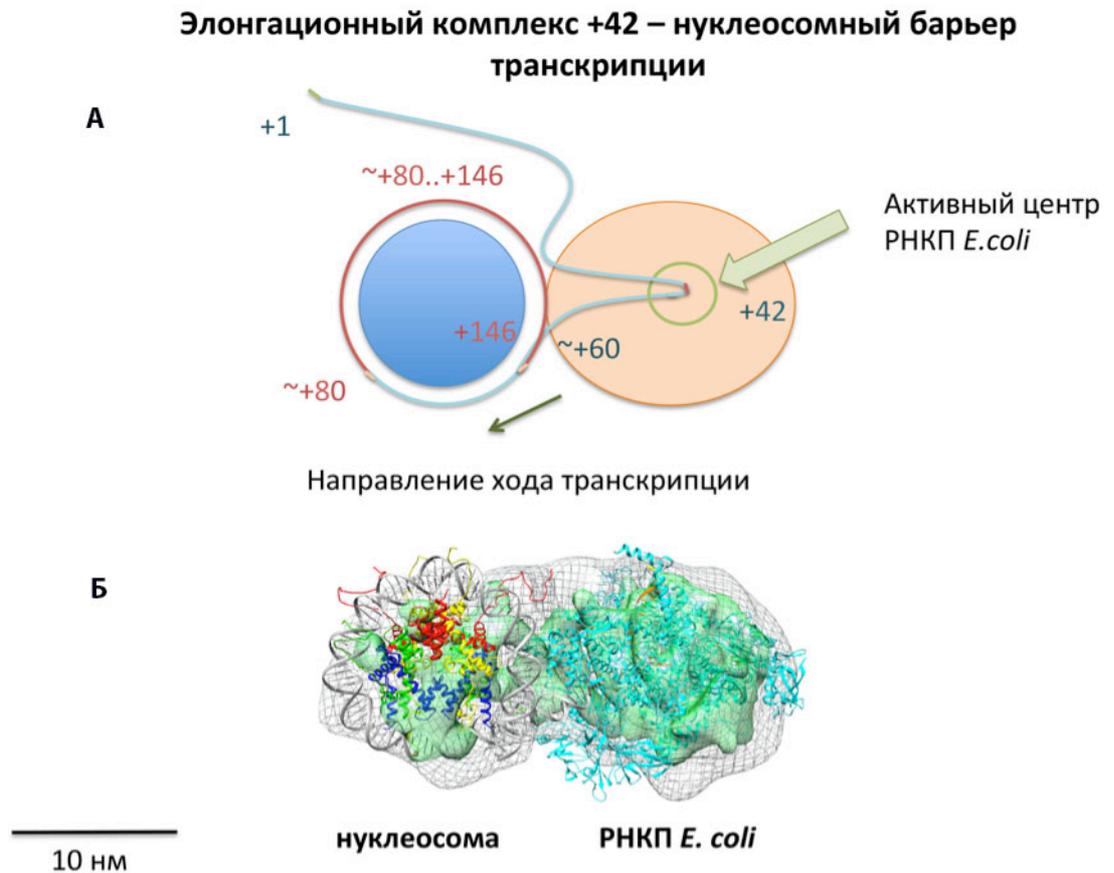


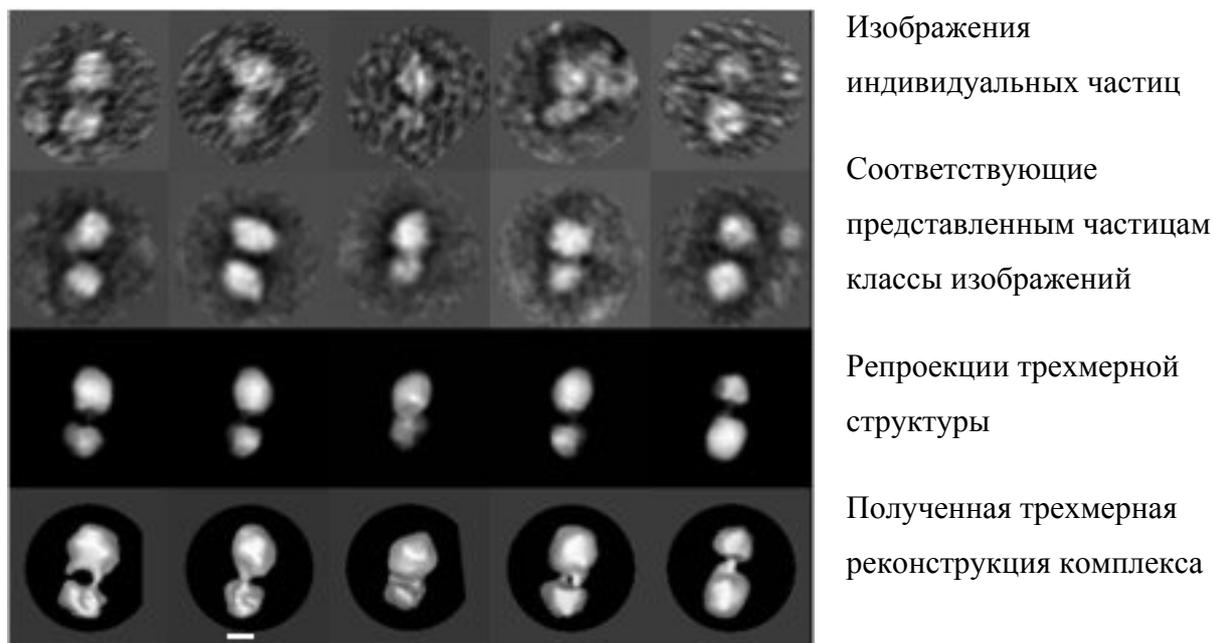
Рисунок 35. А - Модель ЭК(+42). Нуклеосома схематично представлена в виде синего круга, РНК-полимераза – в виде оранжевого эллипса. ДНК виток, обращенный к зрителю – изображен бордовым цветом, ДНК виток, обращенный от зрителя (второй виток нуклеосомной ДНК) - голубым. Отметка (+1) - первый нуклеотид нуклеосом-позиционирующей последовательности (НПП), (+12) нуклеотид находится на выходе из внутреннего канала РНКП, (+24) нуклеотид находится в активном центре РНКП, нуклеотиды ~(+60..+146) сохраняют свои положения на нуклеосоме. РНК-полимераза совершила ~1,8 оборота вокруг матрицы ДНК и повернута к зрителю своей «верхней» частью, промотор-проксимальная ДНК находится в свободном состоянии и расположена на рисунке «от зрителя». Б - 3D структура ЭК(+42), полученная с помощью ПЭМ с негативным контрастированием. Ориентация аналогична модели на (А).

## 4.2. Влияние одностороннего разрыва ДНК на структурные особенности элонгационного комплекса, остановленного в положении +24 активного центра РНКП *E. Coli*

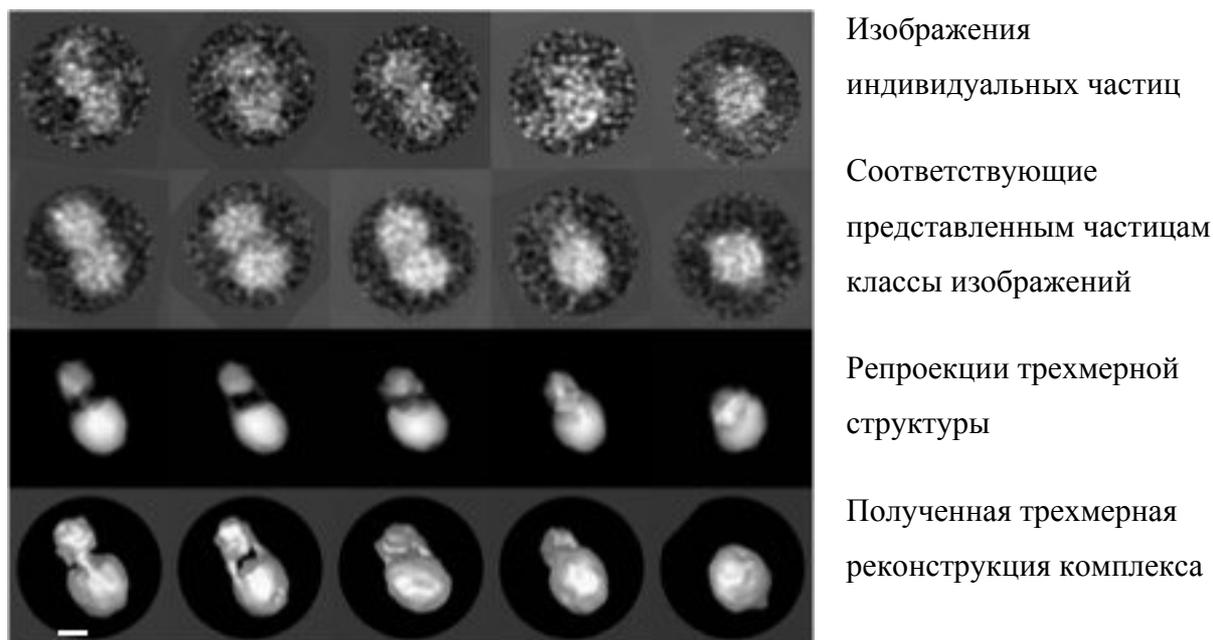
Во второй части работы изучали влияние введения одностороннего разрыва ДНК в положении +12 НПП на структуру комплексов. Изображения индивидуальных частиц, соответствующих им классовых сумм, репроекций, представленные на рисунке 36, использовались для расчета 3D структур ЭК(+24) с односторонним разрывом в положении +12 НПП (рисунок 36 Б) и без разрыва (рисунок 36 А). Разрешение составило  $\sim 57 \text{ \AA}$  для ЭК(+24) без разрыва и  $\sim 35 \text{ \AA}$  для структуры с односторонним разрывом (рисунок 37). Разрешение было рассчитано с использованием метода ОКФ и использованием критерия 3-сигма (рисунок 38). Полученные низкие значения разрешений, по-видимому, связаны с тем, что первичные трехмерные структуры были получены с использованием томографии: данный метод позволяет получить информацию о максимальном числе ориентаций одиночных частиц и повышает контраст, однако приводит к потере разрешения.

Анализ и сопоставление классовых сумм и полученных трехмерных структур свидетельствует в пользу того, что введение одностороннего разрыва в положение (+12) НПП нематричной цепи ДНК приводит к уменьшению расстояния между нуклеосомой и РНКП. Гистограмма распределения расстояний между центрами нуклеосомы и РНК-полимеразы *E. Coli* представлена на рисунке 39. Распределение расстояний между центрами нуклеосомы и РНКП элонгационного комплекса (+24) без одностороннего разрыва лежат в диапазоне от 140 до 260  $\text{ \AA}$ , а в случае элонгационного комплекса +24 с односторонним разрывом – расстояния смещены в меньшую сторону и лежат в диапазоне от 100 до 200  $\text{ \AA}$  ( $p < 0,001$ ).

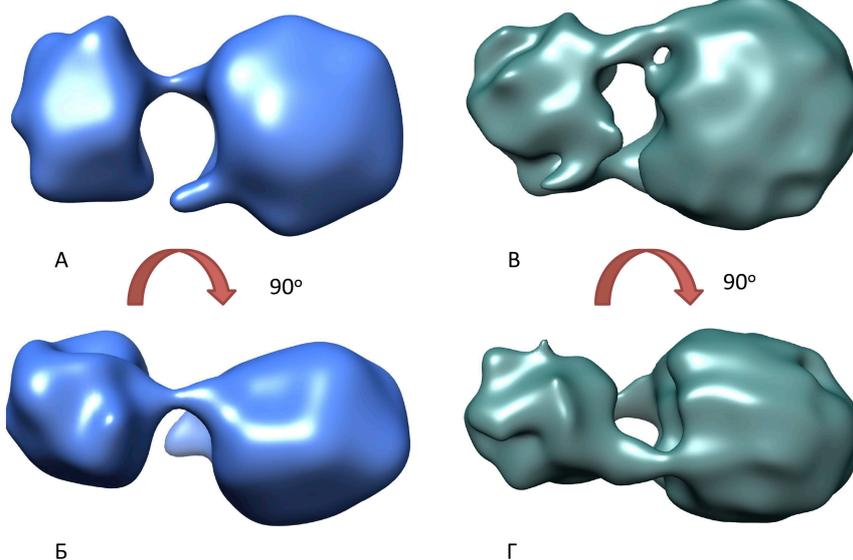
А - ЭК(+24) без одностороннего разрыва



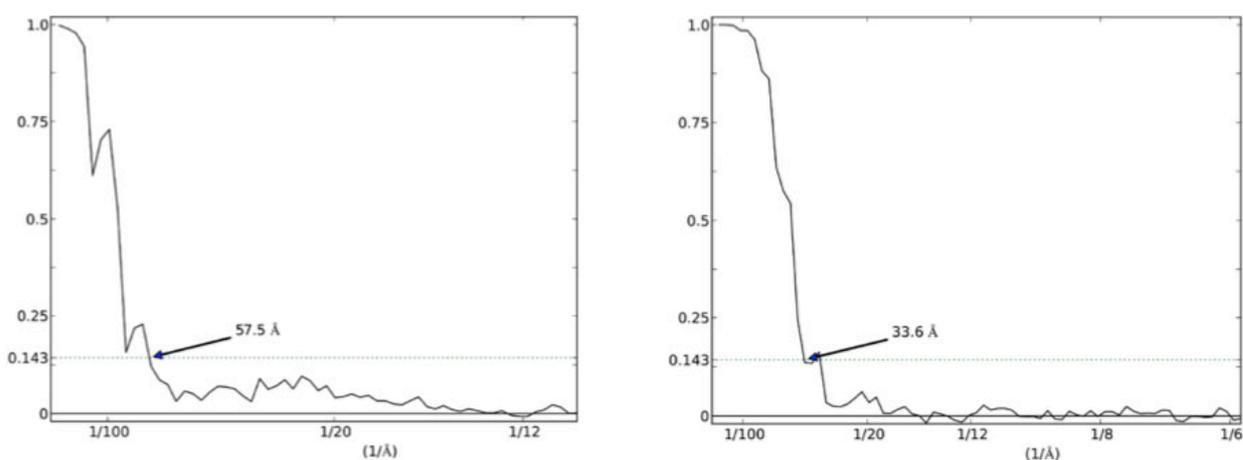
Б - ЭК(+24) с односторонним разрывом в положении +12 НПП



**Рисунок 36. Изображения индивидуальных частиц, соответствующих им классовых сумм, репроекций и трехмерных структур ЭК (+24) без одностороннего разрыва (А) и с односторонним разрывом в положении (+12) НПП (Б). Длина масштабного отрезка – 10 нм.**



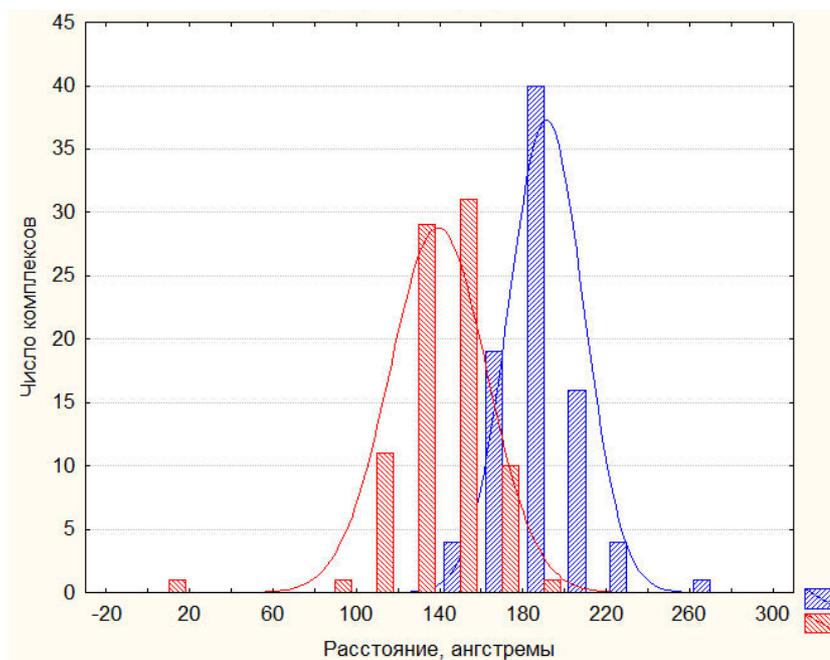
**Рисунок 37. 3D структуры ЭК, остановленного в положении (+24) НПП активного центра РНКП *E. Coli*. А, Б – ЭК(+24) без разрыва; В, Г – ЭК(+24) с одностранным разрывом.**



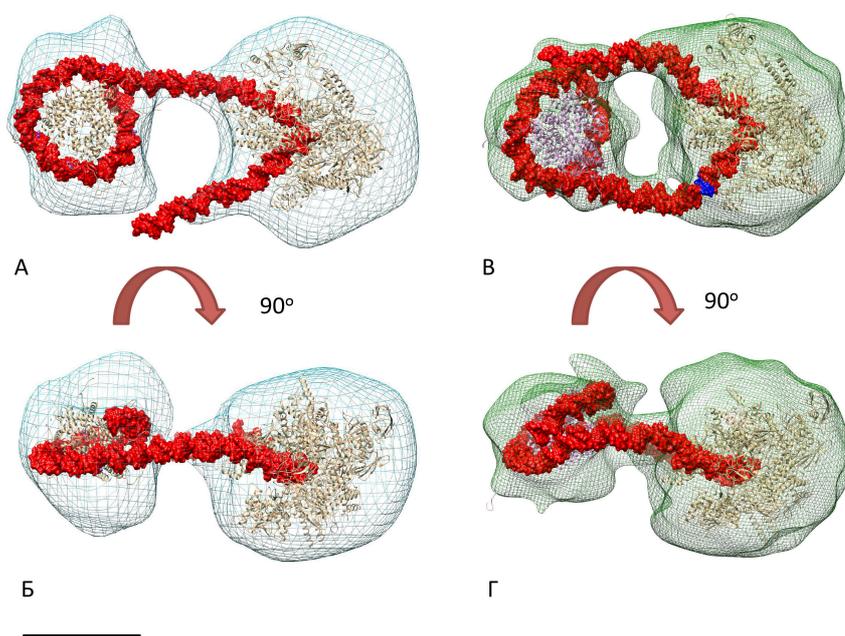
А

Б

**Рисунок 38. Графики расчета разрешения 3D структур ЭК(+24) (А - без разрыва, Б с одностранным разрывом). По оси x – разрешение реконструкции, по оси y – значение кросс-корреляционной функции.**



**Рисунок 39.** Гистограмма распределения расстояний между центрами РНКП и нуклеосомы в ЭК (+24) без одностороннего разрыва (синий) и с односторонним разрывом в положении +12 НПП (красный) ( $p < 0,001$ ).



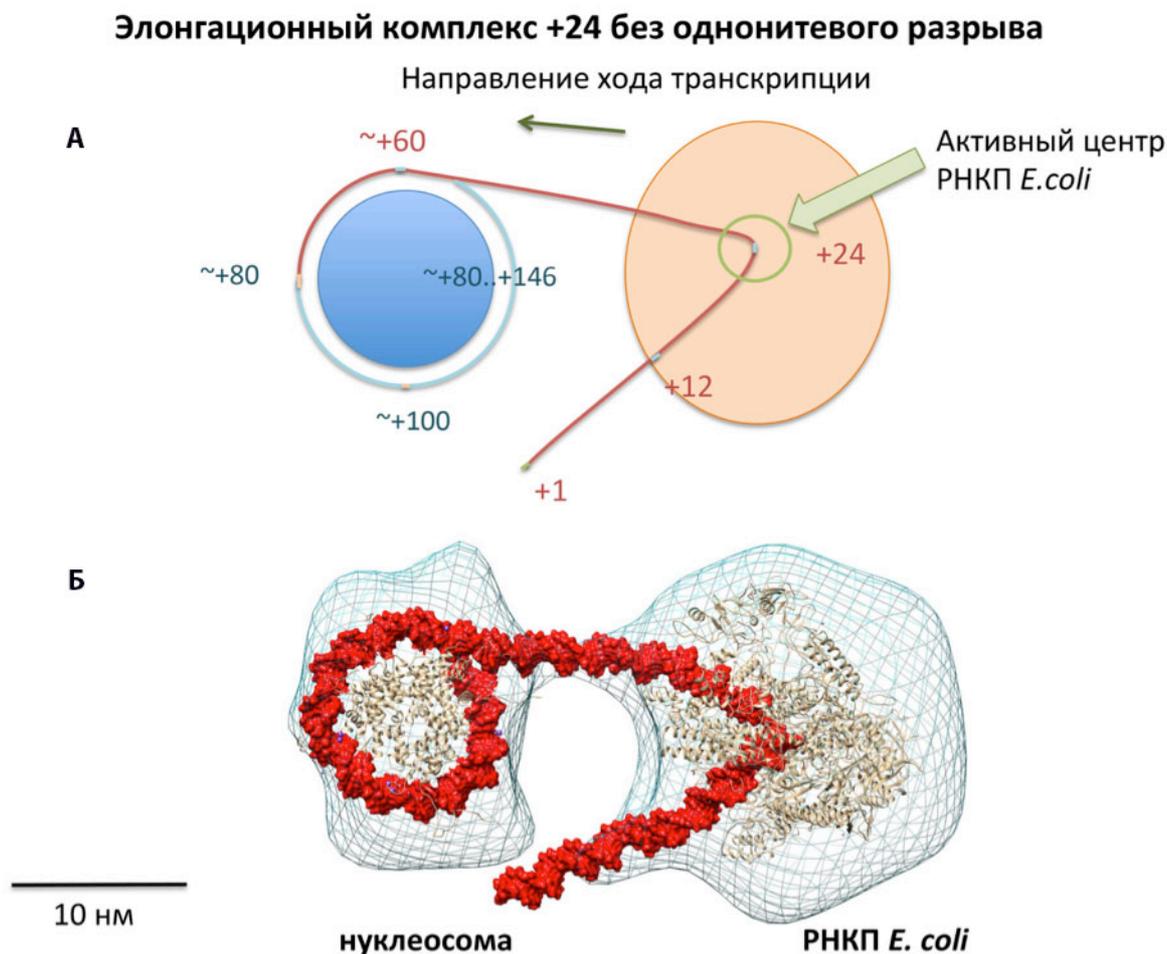
**Рисунок 40.** Докинг кристаллических структур нуклеосомы (1AOI) и РНКП *E. Coli* (5BYH) в карты электронных плотностей ЭК(+24). А, Б – ЭК(+24) без разрыва; В, Г – ЭК(+24) с односторонним разрывом в положении +12 нематричной цепи НПП, соседние с односторонним разрывом пары нуклеотидов отмечены синим цветом.

3D структуры ЭК(+24) с однонитевым разрывом (рисунок 37 В, Г) и без него (рисунок 37 А, Б) характеризуются сходной морфологией: в структурах можно выделить две области большего и меньшего размеров (рисунок 36), которые могут быть соотнесены с РНК-полимеразой и нуклеосомой, как и в случае ЭК(+42). В отличие от ЭК(+42) в обеих структурах ЭК(+24) обнаруживается линкер в верхней части трехмерной карты, соединяющий РНКП и нуклеосому. Этот линкер может быть образован нуклеосомной ДНК до вхождения в область активного центра РНК-полимеразы. В нижней части реконструкций между нуклеосомой и РНК-полимеразой в структуре ЭК(+24) с однонитевым разрывом так же обнаруживается тая электронная плотность, симметричный верхнему и замыкающийся обратно на нуклеосому (рисунок 37 В, Г). В структуре ЭК(+24) без разрыва отсутствует участок электронной плотности, соответствующий ДНК (рисунок 37 А, Б).

Для интерпретации полученных структур был произведен компьютерный докинг (фиттинг) кристаллических структур нуклеосомы и РНК-полимеразы *E. Coli* в карты электронной плотности ЭК(+24) с однонитевым разрывом (рисунок 40 В, Г) и без разрыва (рисунок 40 А, Б). Значения кросс-корреляционной функции составили 0,65 и 0,75, соответственно, что означает хорошее соответствие кристаллических структур с соотнесенными областями электронных плотностей. На основании докинга были построены предположительные атомные модели элонгационного комплекса +24 с однонитевым разрывом и без разрыва (рисунок 40).

Различия в области, соотнесенной с проксимальной к промотору ДНК, а именно замкнутая плотность в структуре ЭК(+24) с однонитевым разрывом (рисунок 40 В, Г), может свидетельствовать в пользу образования внутринуклеосомной петли. Согласно литературным данным в ходе транскрипции нуклеосомной ДНК РНК-полимераза вращается вокруг матрицы в соответствии с ходом витков спирали ДНК [Kulaeva et al., 2009]. Можно предположить, что введение однонитевого разрыва в (+12) положение нематричной цепи ДНК может оказывать влияние на механические свойства ДНК (в том числе жесткость и гибкость). А изменения механических свойств ДНК в свою очередь могут приводить к обратному замыканию проксимальной к промотору ДНК на нуклеосому с образованием внутринуклеосомной петли. В таком случае РНК-полимераза оказывается запертой во внутринуклеосомной петле и не может далее продвигаться по матрице нуклеосомной ДНК, в результате чего наблюдается спонтанная остановка транскрипции в положении (+24) НПП активного центра РНКП *E. Coli*, продемонстрированная в работе Герасимовой Н.С. [2015]. Замыкание промотор-проксимальной ДНК и образование внутринуклеосомной петли, по-видимому, приводит к уменьшению расстояния между нуклеосомой и РНК-полимеразой, что наблюдается в распределении расстояний в двумерных проекциях ЭК(+24) (рисунок 39).

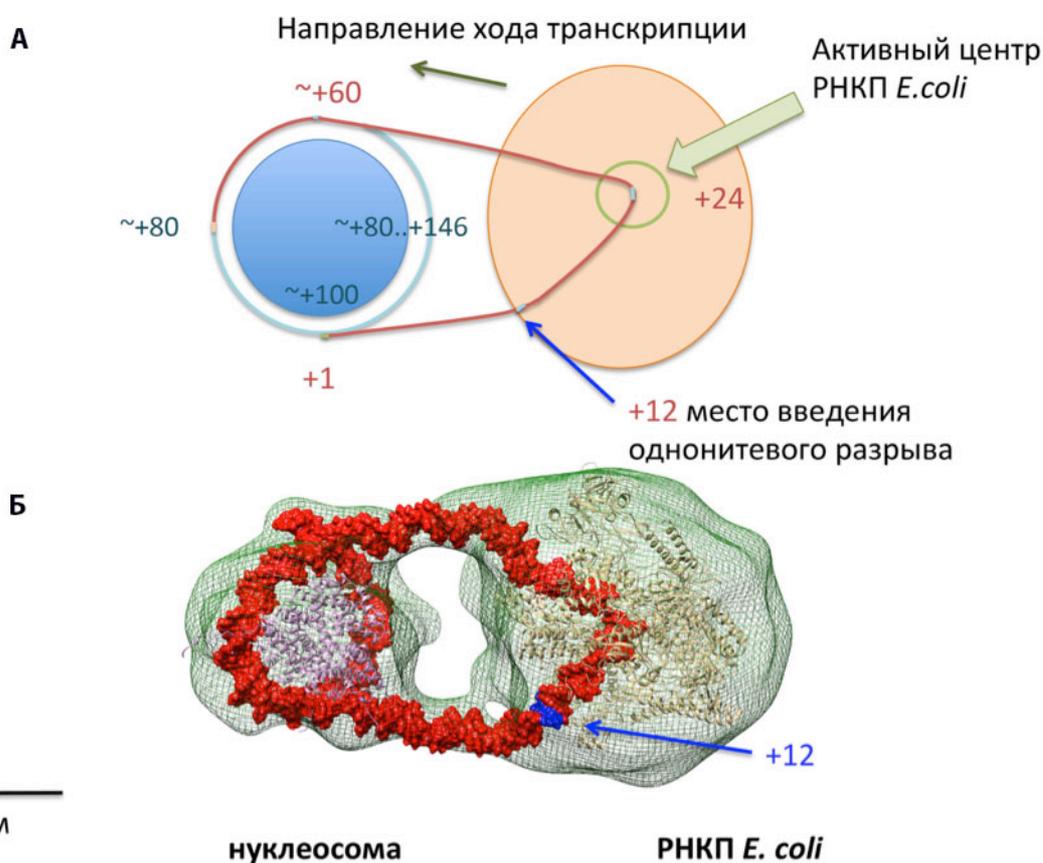
На основании интерпретации полученных трехмерных структур представлены схематичные модели элонгационного комплекса в положении 24 НПП активного центра РНК-полимеразы *E. Coli* с однонитевым разрывом в (+12) положении НПП и без него (рисунки 41-42).



**Рисунок 41. А - Модель ЭК, остановленного в положении +24 нуклеотидной последовательности в активном центре РНК-полимеразы *E. Coli* (без однонитевого разрыва в положении 12 нематричной цепи НПП). Обозначения, как на рисунке 35. Б - 3D структура ЭК(+24) без разрыва, полученная с помощью ПЭМ с негативным контрастированием. Ориентация аналогична модели на (А).**

Базируясь на полученной трехмерной структуре (рисунок 41 Б) мы предполагаем, что проксимальный к промотору участок ДНК позади РНК-полимеразы находится в свободном подвижном состоянии, поэтому на электронной плотности обнаруживается только его малый фрагмент.

### Элонгационный комплекс +24 с одностранным разрывом в положении +12 НПП



**Рисунок 42. А - Модель ЭК, остановленного в положении (+24) нуклеотидной последовательности в активном центре РНК-полимеразы *E. Coli* (с одностранным разрывом в положении 12 нематричной цепи НПП). Обозначения, как на рисунке 35. Б - 3D структура ЭК(+24) с разрывом, полученная с помощью ПЭМ с негативным контрастированием. Ориентация аналогична модели на (А).**

Базируясь на полученной трехмерной структуре ЭК(+24) с разрывом (рисунок 42 Б), мы предполагаем, что введение одностранный разрыва в 12 положении нематричной цепи НПП приводит к изменению механических свойств участка ДНК на выходе из РНКП – из-за чего может происходить обратное замыкание промотор-проксимальной ДНК обратно на нуклеосому с образованием нутринуклеосомной петли. Образование петли, в свою очередь, может препятствовать перемещению и вращению РНКП в ходе поступательного движения вдоль матрицы, из-за чего фермент оказывается «запертым» в петле, что приводит к необратимой остановке транскрипции.

### 4.3. Оценка влияния введения однонитевого разрыва на механические свойства ДНК

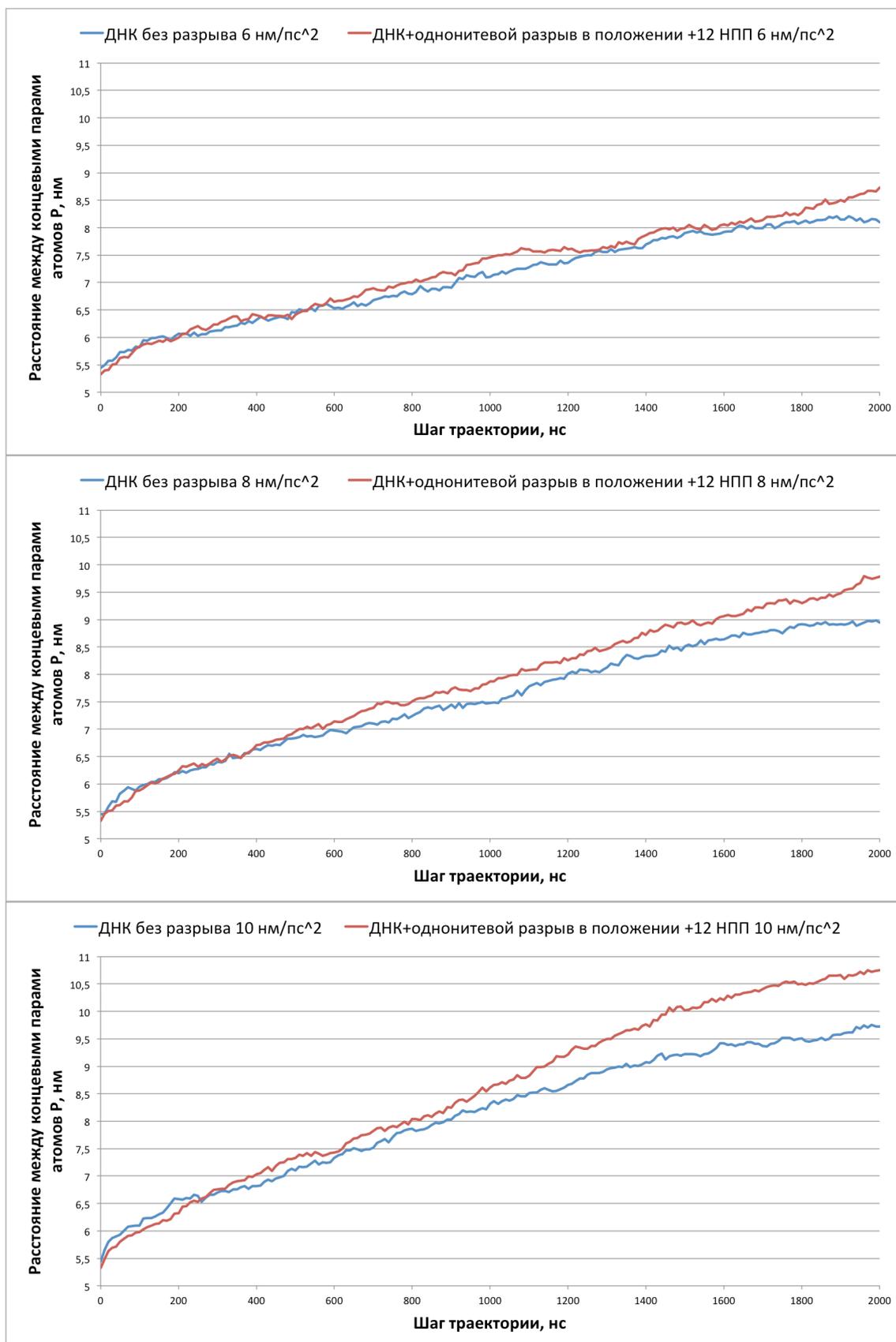
Для оценки влияния введения однонитевого разрыва на механические свойства ДНК в третьей части работы был применен опробованный нами подход по оценке эластичности ДНК с использованием метода управляемой молекулярной динамики [Приложение 1, Волох с соавт., 2015]. С использованием метода равновесной молекулярной динамики была произведена попытка оценить влияние однонитевого разрыва на гибкость фрагмента ДНК, для этого рассчитывались параметры стэкинг-взаимодействий между соседними парами нуклеотидов фрагмента ДНК.

Оценка влияния введения однонитевого разрыва на жесткость фрагмента ДНК производилась путем расчета значения модуля Юнга растяжения структуры. Графики зависимости расстояний между центрами масс пар атомов фосфора на траектории молекулярной динамики в зависимости от сообщенных ускорений приведены на рисунке 43. Рассчитанные значения модуля Юнга растяжения приведены в таблице 5:

**Таблица 5. Рассчитанные значения модуля Юнга.**

Модуль Юнга, Е, Па	
ДНК без однонитевого разрыва	ДНК с однонитевым разрывом в положении +12 НПП
$(3.0 \pm 0.05) \times 10^9$	$(1.8 \pm 0.08) \times 10^9$

Из представленных графиков видно, что в самом начале управляемой динамики структуры ведут себя аналогичным образом до достижения расстояния между концевыми фосфатами ~6.5 нм. По всей видимости, к этому моменту изменение стэкинг-взаимодействий доходит до нуклеотидных пар, соседних с однонитевым разрывом, и структуры начинают вести себя по-разному. В случае трех приложенных ускорений структура ДНК с однонитевым разрывом растягивается быстрее, чем аналогичная нормальная структура ДНК, что свидетельствует в пользу меньшей жесткости (большей эластичности) структуры ДНК с однонитевым разрывом в положении +12 НПП. Это подтверждается расчетными данными модуля Юнга, приведенными в таблице 5. Из траекторий анализируемых структур установлено, что по достижении расстояний между фосфатами значения ~7.5 нм происходит нарушение стэкинг-взаимодействий и вторичной структуры ДНК, поэтому для расчета модуля упругости использовались участки траектории, соответствующие изменениям длин структуры в диапазоне 6.5-7.5 нм.

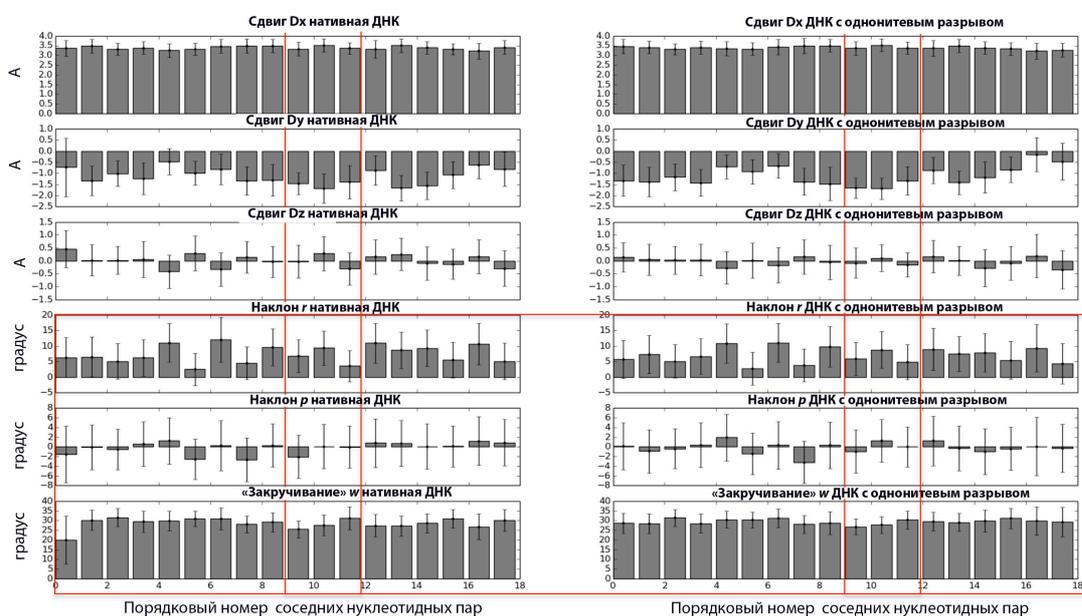


**Рисунок 43. Графики зависимости расстояний между центрами масс пар атомов фосфора на траектории молекулярной динамики в зависимости от сообщенных ускорений. По оси  $x$  – шаг траектории (нс), по оси  $y$  - расстояние между центрами масс пар атомов Р (нм).**

Для оценки влияния введения однонитевого разрыва на гибкость фрагмента ДНК была поставлена задача по определению параметров стэкинг-взаимодействий нуклеотидных пар, так как данный подход широко используется в литературных источниках для оценки гибкости ДНК [Colasanti et al., 2013; Kumar&Grubmüller, 2015; Pengwen&Jie, 2013; Lankaš et al., 2003] (совм. с Армеевым Г.А.).

Оценка влияния введения однонитевого разрыва на параметры стэкинг-взаимодействий нуклеотидных пар производилось путем оценки изменений соответствующих параметров из координат траекторий (иллюстративное изображение оцениваемых параметров приведено на рисунке 27).

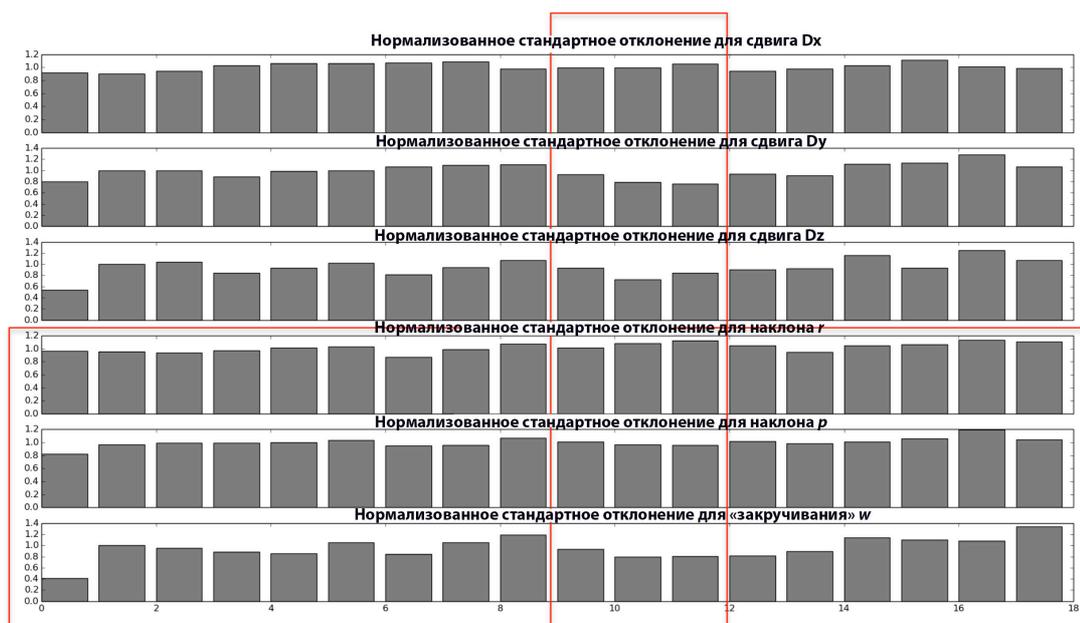
Результаты рассчитанных шести параметров приведены на рисунке 44:



**Рисунок 44. Рассчитанные параметры стэкинг-взаимодействий нуклеотидных пар (слева данные для немодифицированной структуры ДНК, справа – для ДНК с однонитевым разрывом), вертикальные выделенные красным блоки – соседние с однонитевым разрывом нуклеотидные пары; горизонтальный красный блок – параметры, «ответственные» за гибкость. По оси y – значение смещения (в Å для значений сдвига, в градусах для углов наклона и «закручивания»). По оси x – порядковый номер соседних нуклеотидных пар. Доверительный интервал представляет собой стандартное отклонение рассчитанной величины на траектории.**

Основным параметром для оценки гибкости является угол наклона между соседними парами нуклеотидов между плоскостями комплементарных пар вдоль оси y (Roll) (четвертый сверху блок на рисунке 44) [Lankaš et al., 2003; Colasanti et al., 2013; Kumar&Grubmüller, 2015],

мы так же решили обратить внимание на угол наклона между соседними парами нуклеотидов между плоскостями комплементарных пар вдоль оси  $x$  (Tilt), а так же на угол поворота между соседними парами нуклеотидов в плоскости комплементарных пар (Twist) (выделены красным горизонтальным блоком на рисунке 44). Интерес представляет величина стандартного отклонения исследуемого параметра, так называемый «объем конформационного пространства» [Olson et al., 1998], в котором исследуемая переменная (значение соответствующих значений углов) находится большую часть времени динамики (рисунок 45).



**Рисунок 45. Нормализованные по ДНК без одонитевого разрыва значения стандартного отклонения параметров стэкинг-взаимодействий нуклеотидных пар. По оси  $x$  – нуклеотидные пары, по оси  $y$  – значения нормализованных по ДНК без одонитевого разрыва стандартных отклонений параметров стэкинг-взаимодействий нуклеотидных пар.**

Из полученных графиков следует, что отношение отклонений параметров стэкинг-взаимодействий ДНК с одонитевым разрывом по отношению к ДНК без разрыва лежат в пределах 0,8-1,2 для ротационных и трансляционных степеней свободы как для пар нуклеотидов, соседних с одонитевым разрывом, так и для участков нативной ДНК. Значимых различий в поведении структуры с одонитевым разрывом и без одонитевого разрыва в ходе данного вычислительного эксперимента не выявлено. Аналогичный результат был получен в работе Yamaguchi et al., 2002. Отсутствие различий между поведением структур в данной системе может быть связано с тем, что параметры стэкинг-взаимодействий в силовых полях, используемых в молекулярной динамике существенно переоценены [Banáš et al., 2012]. В связи с этим, использование управляемой МД, где стэкинг-взаимодействия нарушаются за

счет приложения силы, способно показать различие в поведении систем с односторонним разрывом и без него, в отличие от равновесной МД. Кроме того, персистентная длина ДНК составляет  $50 \pm 5$  нм, что на порядок больше длины исследуемого фрагмента [Lankaš et al., 2003; Nagerman, 1981], в результате чего фрагмент ДНК заданной длины может вести себя как гибкий стержень, но не как гибкая цепь.

В результате анализа полученных из молекулярной динамики данных можно сделать вывод о том, что введение одностороннего разрыва влияет на механические свойства ДНК. В частности, введение одностороннего разрыва приводит к снижению жесткости соответствующей цепи по сравнению с ДНК без одностороннего разрыва. Оценить влияние введения одностороннего разрыва на гибкость соответствующего ДНК с использованием равновесной МД не удалось, так как по всей видимости данный подход не позволяет произвести оценку данного параметра. Данная задача станет предметом дальнейших исследований.

## Заключение

В работе исследовались особенности взаимодействия ДНК с лигандами в норме и при нарушениях транскрипции на примере транскрипции нуклеосомной ДНК и формирующихся элонгационных комплексов. Впервые методами просвечивающей электронной микроскопии получены трехмерные структуры элонгационных комплексов, остановленных в положениях +42 и +24 на нуклеосом-позиционирующей последовательности активного центра РНК-полимеразы *E. Coli*. Продемонстрирована общая морфология элонгационных комплексов, включающих мононуклеосому и РНК-полимеразу.

Полученная трехмерная структура элонгационного комплекса (+42) в совокупности с данными футпринтинга свидетельствует в пользу гипотезы об обратном закручивании освобождающейся в результате отбрасывания РНК-полимеразы нуклеосомной ДНК при попадании фермента в область нуклеосомного барьера +(46-48) НПП. На основании данных электронной микроскопии и молекулярной динамики в работе предложен возможный механизм остановки транскрипции на примере элонгационного комплекса (+24) с однонитевым разрывом в +12 положении нематричной цепи нуклеосомной ДНК. Результаты данной работы могут являться очередным шагом в понимании механизмов нарушения транскрипции, в основе которых лежат взаимодействия ДНК-матрицы с молекулами-лигандами, такими как нуклеосома.

## Выводы

1. Методом электронной микроскопии макромолекул получены трехмерные реконструкции элонгационных комплексов РНКП *E.Coli*, остановленной в позициях (+24) и (+42) при транскрипции через нуклеосому. Реконструкции характеризуются сходной морфологией и состоят из двух соединенных электронных плотностей, соответствующих РНКП *E.Coli* и нуклеосоме.
2. Трехмерная структура комплекса ЭК(+42) характеризуется близким расположением РНКП и нуклеосомы. Наличие электронной плотности в области димера гистонов H2A/H2B свидетельствует в пользу того, что на данном этапе транскрипции сохраняется целостность гистонового октамера. Октамер в ЭК(+42) стабилизирован контактами с ДНК, что играет ключевую роль в сохранении нуклеосом в ходе транскрипции.
3. Исследование ЭК(+24) методом электронной микроскопии показало, что структура с односторонним разрывом в нетранскрибируемой цепи ДНК (+12) отличается от структуры ЭК(+24) без разрыва в ДНК меньшим расстоянием между нуклеосомой и РНКП, что, возможно, связано с обратным замыканием нуклеосомной ДНК на гистоновом октамере.
4. Произведенная апробация динамических моделей ДНК-лиганд на примере комплексов фрагмента ДНК с производными актиномина Д показала адекватную картину поведения динамических структур. Модуль упругости ДНК структур комплексов с производными актиномина возрастает в ряду актиномина – гидроксидактиномина – аминоктиномина. Свободная энергия  $\Delta G$  аналогичным образом уменьшается в данном ряду. Величины модуля Юнга и свободной энергии коррелируют с порядковыми значениями соответствующих величин из литературных данных.
5. Методом управляемой молекулярной динамики показано, что последовательность ДНК с односторонним разрывом характеризуется меньшей жесткостью по сравнению с аналогичной последовательностью нативной ДНК.

## Благодарности

Я выражаю огромную благодарность и признательность своим научным руководителям доктору биологических наук, доценту, Соколовой Ольге Сергеевне и доктору физико-математических наук, профессору, Шайтану Константину Вольдемаровичу за помощь в освоении методов и руководство в ходе выполнения данной работы.

Так же хочу поблагодарить коллектив кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова – д.б.н. В.М. Студитского, к.ф.-м.н. М.Е. Боздаганян, к.б.н. Н.С. Герасимову, к.б.н. Ю.М. Ефремова, к.ф.-м.н. О.В. Левцову, к.ф.-м.н. В.Н. Новоселецкого, к.ф.-м.н. А.К. Шайтана, Г.А. Армеева, М.Г. Карлову, Т.Б. Станишневую-Коновалову за неоценимую помощь, детальные консультации и активные дискуссии в процессе выполнения работы. Отдельно благодарю коллектив соавторов к.б.н. Д.А. Гайкалову, к.б.н. О.И. Кулаеву, F. K. Hsieh, PhD, к.б.н. Е.В. Печникову, А.В. Моисеенко за совместную работу.

Особую признательность выражаю своей семье за оказанную поддержку.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ 14-24-00031) и ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (Соглашение Минобрнауки России № 14.604.21.0063, RFMEFI60414X0063).

**Список использованной литературы**

1. Adelman J.T. Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: emerging roles in K. metazoans// *Nat. Rev. Genet.* 2012. Vol.13. P. 720–731.
2. Arents G., Moudrianakis E.N. The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization// *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995. Vol. 92. № 24. P. 11170–11174.
3. Armache K. J. et al. Structures of complete RNA polymerase II and its subcomplex, Rpb4/7 // *Journal of Biological Chemistry.* 2005. Vol. 280. №. 8. P. 7131-7134.
4. Armache K.J., Kettenberger H., Cramer P. Architecture of initiation-competent 12-subunit RNA polymerase II// *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003. Vol. 100. P. 6964-6968.
5. Asturias F.J., Chung W.H., Kornberg R.D., Lorch Y. Structural analysis of the RSC chromatin-remodeling complex// *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002. Vol. 99. P. 13477-13480.
6. Baker T. S., Cheng R. H. A model-based approach for determining orientations of biological macromolecules imaged by cryoelectron microscopy // *Journal of structural biology.* 1996. Vol. 116. №. 1. P. 120-130.
7. Banáš P. et al. Can We Accurately Describe the Structure of Adenine Tracts in B-DNA? Reference Quantum-Chemical Computations Reveal Overstabilization of Stacking by Molecular Mechanics// *Journal of Chemical Theory and Computation.* 2012. Vol. 8. № 7. P. 2448-2460.
8. Bartesaghi A. et al. Classification and 3D averaging with missing wedge correction in biological electron tomography// *Journal of structural biology.* 2008. Vol. 162. №. 3. – P. 436-450.
9. Bednar J., Studitsky V., Grigoryev S., Felsenfeld G., Woodcock C. The nature of the nucleosomal barrier to transcription: direct observation of paused intermediates by electron cryomicroscopy// *Mol. Cell.* 1999. Vol. 4. P. 377–386.
10. Belotserkovskaya R., Oh S., Bondarenko V.A., Orphanides G., Studitsky V.M., Reinberg D. FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration// *Science.* 2003. Vol. 301. P. 1090–1093.
11. Berendsen H. J. C., Grigera J. R., Straatsma T. P. The missing term in effective pair potentials// *J Phys Chem.* 1987. Vol. 91. №24. P. 6269–6271.
12. Berriman J., Unwin N. Analysis of transient structures by cryo-microscopy combined with rapid mixing of spray droplets// *Ultramicroscopy.* 1994. Vol. 56. P. 241-252.
13. Bhushan S. et al. SecM-stalled ribosomes adopt an altered geometry at the peptidyl transferase center // *PLoS Biol.* 2011. Vol. 9. №. 1. P. e1000581.

14. Bielas J.H. Non-transcribed strand repair revealed in quiescent cells// *Mutagenesis*. 2006. Vol. 21. № 1. P. 49–53.
15. Bieler N., Hunenberger P. Orthogonal sampling in free-energy calculations of residue mutations in a tripeptide: TI versus  $\lambda$ -LEUS// *J Chem Phys*. 2015. Vol. 36. №22. P.1686-1697.
16. Bintu L, et al. The elongation rate of RNA polymerase determines the fate of transcribed nucleosomes// *Nat Struct Mol Biol*. 2011. Vol. 18. №12. P.1394–1399.
17. Bloom K., 2008. Beyond the code: the mechanical properties of DNA as they relate to mitosis// *Chromosoma*. 2003. Vol. 117. №2. P. 103–110.
18. Boeger H., Griesenbeck J., Kornberg R. Nucleosome retention and the stochastic nature of promoter chromatin remodeling for transcription// *Cell*. 2008. Vol. 133. P. 716–726.
19. Boisset N. et al. Overabundant single-particle electron microscope views induce a three-dimensional reconstruction artifact // *Ultramicroscopy*. 1998. Vol. 74. №. 4. P. 201-207.
20. Bondarenko V., Steele L., Ujvari A., Gaykalova D., Kulaeva O., Polikanov Y., Luse D., Studitsky V. Nucleosomes can form a polar barrier to transcript elongation by RNA polymerase II// *Mol. Cell*. 2006. Vol. 24. P. 469–479.
21. Bradley M.O., Kohn K.W. X-ray induced DNA double strand break production and repair in mammalian cells as measured by neutral filter elution// *Nucleic Acids Res*. 1979. Vol. 7. № 3. P. 793–804.
22. Brenowitz M., Seneff D.F., Shea M.A., Ackers G.K. Quantitative DNase footprint titration: a method for studying protein-DNA interactions// *Methods Enzymol*. 1986. Vol. 130. P. 132–181.
23. Buratowski S., Hahn S., Guarente L., Sharp P.A. Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymease II// *Cell*. 1989. Vol. 56. P.549-562.
24. Caldecott K.W. Protein ADP-ribosylation and the cellular response to DNA strand breaks// *DNA Repair*. 2014a. Vol. 19. P. 108–113.
25. Caldecott K.W. Single-strand break repair and genetic disease// *Nat. Rev. Genet*. 2008a. Vol. 9. № 8. P. 619–631.
26. Caldecott K.W. Single-strand break repair and genetic disease// *Nat. Rev. Genet*. 2008b. Vol. 9. № 8. P. 619–631.
27. Cardone G., Grünwald K., Steven A. C. A resolution criterion for electron tomography based on cross-validation // *Journal of structural biology*. 2005. Vol. 151. №. 2. P. 117-129.
28. Castaño-Díez D. et al. Fiducial-less alignment of cryo-sections// *Journal of structural biology*. 2007. Vol. 159. №. 3. P. 413-423.
29. Chacón P., Wriggers W. Multi-resolution contour-based fitting of macromolecular structures // *Journal of molecular biology*. 2002. Vol. 317. №. 3. P. 375-384.

30. Chandran V. et al. Structure of the outer membrane complex of a type IV secretion system //Nature. 2009. Vol. 462. №. 7276. P. 1011-1015.
31. 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. Vol. 42. № 3. P. 1619–1627.
32. Christmann M., Tomicic M., Roos W., Kaina B. Mechanisms of human DNA repair: an update // Toxicology. 2003. Vol. 193. №1-2. P. 3–34.
33. Ciolkowski M. L., Fang M. M., Lund M. E. A surface plasmon resonance method for detecting multiple modes of DNA–ligand interactions //Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 2000. Vol. 22. №. 6. P. 1037-1045.
34. Clapier, C.; Cairns B. The biology of chromatin remodeling complexes// Annu. Rev. Biochem. 2009. Vol. 78. P. 273–304.
35. Clark N.J., Kramer M., Muthurajan U.M., Luger K. Alternative modes of binding of poly(ADP-ribose) polymerase 1 to free DNA and nucleosomes// J. Biol. Chem. 2012. Vol. 287. № 39. P. 32430–32439.
36. Cocco S., Marco J., Monasson R. Theoretical models for single-molecule DNA and RNA experiments: from elasticity to unzipping// Comptes Rendus Physique. 2002. Vol. 3. № 5. P. 569-584.
37. Colasanti A. V., Lu X. J., Olson W. K. Analyzing and building nucleic acid structures with 3DNA//JoVE (Journal of Visualized Experiments). 2013. №. 74. P. e4401-e4401.
38. Colasanti AV, Lu X-J, Olson WK. Analyzing and Building Nucleic Acid Structures with 3DNA// Journal of visualized experiments : JoVE. 2013. Vol. 74. P. e4401-e4401.
39. Core L., Lis J. Transcription regulation through promoter-proximal pausing of RNA polymerase II// Science. 2008. Vol. 319. P. 1791–1792.
40. Cramer P., Bushnell D.A., Kornberg R.D. Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 Å resolution// Science. 2001. Vol. 292. P. 1863–1876.
41. Crowther R. A. Procedures for three-dimensional reconstruction of spherical viruses by Fourier synthesis from electron micrographs //Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences. 1971. Vol. 261. №. 837. P. 221-230.
42. Darden T.A., L.G. Pedersen. Molecular modeling: an experimental tool// Environ Health Perspect. 1993. Vol. 101. P. 410-412.
43. Darst S., Edwards A., Kubalek E., Kornberg R. Three-dimensional structure of yeast RNA polymerase II at 16 Å resolution// Cell. 1991. Vol. 66. №1. P. 121-128.
44. Darst S.A., Kubalek E.W., Kornberg R.D. Three-dimensional structure of *Escherichia Coli* RNA polymerase holoenzyme determined by electron crystallography// Nature. 1989. Vol.

340. P. 730-732.
45. 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. Vol. 319. P. 1097-1113.
46. Deal R., Henikoff J., Henikoff S. Genome-wide kinetics of nucleosome turnover determined by metabolic labeling of histones// *Science*. 2010. Vol. 328. P. 1161– 1164.
47. Demple B., DeMott M.S. Dynamics and diversions in base excision DNA repair of oxidized abasic lesions// *Oncogene*. 2002. Vol. 21. № 58. P. 8926–8934.
48. Dion M., Kaplan T., Kim M., Buratowski S., Friedman N., Rando O. Dynamics of replication independent histone turnover in budding yeast// *Science*. 2007. Vol. 315. P. 1405–1408.
49. Donnini S., Ahonen R. Computing Free Energies of Protein-ligand Association. – 2007.
50. Dorazi R., Götz D., Munro S., Bernander R., White M.F. Equal rates of repair of DNA photoproducts in transcribed and non-transcribed strands in *Sulfolobus solfataricus*// *Mol. Microbiol.* 2007. Vol. 63. № 2. P. 521–529.
51. Dube P. et al. The portal protein of bacteriophage SPP1: a DNA pump with 13-fold symmetry // *The EMBO journal*. 1993. Vol. 12.№ 4. P. 1303.
52. Dubochet J., Adrian M., Chang J.J., Homo J.C., Lepault J., McDowell A.W., Schultz P. Cryo-electron microscopy of vitrified specimens// *Q Rev Biophys.* 1988. Vol. 21. P. 129-228.
53. Engel C., Sainsbury S., Cheung A.C., Kostrewa D., Cramer P. RNA polymerase I structure and transcription regulation// *Nature*. 2013. Vol. 502.P. 650–655.
54. Enright H.U., Miller W.J., Hebbel R.P. Nucleosomal histone protein protects DNA from iron-mediated damage// *Nucl. Acids Res.* 1992. Vol. 20. P. 3341–3346.
55. Fabiola F., Chapman M. Fitting of High-Resolution Structures into Electron Microscopy Reconstruction Images// *Structure*. 2005. Vol. 13. P. 389–400.
56. Feng H.P., Scherl D.S., Widom J. Lifetime of the histone octamer studied by continuous-flow quasielastic light scattering: Test of a model for nucleosome transcription// *Biochemistry*. 1993. Vol. 32. №30. P. 7824–7831.
57. Fernandez-Tornero C., Moreno-Morcillo M., Rashid U.J., Taylor N.M., Ruiz F.M., Gruene T., Legrand P., Steuerwald U., Muller, C.W. Crystal structure of the 14-subunit RNA polymerase I// *Nature*. 2013. Vol. 502. P. 644–649.
58. Feser J., D.T., Das C., Carson J.J., Kieft J., Harkness T., Tyler J.K. Elevated histone expression promotes life span extension// *Mol. Cell*. 2010. Vol. 39. P. 724–735.
59. Finn R. D. et al. *Escherichia Coli* RNA polymerase core and holoenzyme structures // *The EMBO journal*. 2000. Vol. 19. №. 24. P. 6833-6844.
60. Förster F. et al. Classification of cryo-electron sub-tomograms using constrained

- correlation//Journal of structural biology. 2008. Vol. 161. № 3. P. 276-286.
61. Fourier J. Theorie analytique de la chaleur, par M. Fourier. – Chez Firmin Didot, père et fils, 1822.
62. Frank J. et al. SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields //Journal of structural biology. 1996. Vol. 116. № 1. P. 190-199.
63. Frank, J. Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies, 2nd ed. Oxford University Press, 2006.
64. Fu J., Gnatt A.L., Bushnell D.A., David P.R., Jensen G.J., Kornberg, R.D. Yeast RNA polymerase II at 6 Å resolution// Cell. 1999. Vol. 98. P. 799-810.
65. Garai A., Saurabh S., Lansac Y., Maiti P. DNA Elasticity From Short DNA to Nucleosomal DNA// J. Phys. Chem. B. 2015. Vol. 119. № 34., P. 11146–11156.
66. Gaykalova D. A., Kulaeva O. I., Volokh O., Shaytan A. K., Hsieh F. K., Kirpichnikov M. P., Studitsky V. M. Structural analysis of nucleosomal barrier to transcription// Proceedings of the National Academy of Sciences. 2015. Vol. 112. №43.P. E5787-E5795.
67. Gilchrist D., Dos Santos G., Fargo D., Xie B., Gao Y., Li L., Adelman K. Pausing of RNA polymerase II disrupts DNA-specified nucleosome organization to enable precise gene regulation// Cell. 2010. Vol. 143. P. 540–551.
68. Gilmour D. Promoter proximal pausing on genes in metazoans// Chromosoma. 2009. Vol. 118. P. 1–10.
69. Glaeser R. M. Physical Aspects of Electron Microscopy and Microbeam Analysis; Siegel, B., Beaman, D. R., Eds.; John Wiley & Sons: New York. 1975. P. 205.
70. Gnatt A., Cramer P., Fu J., Bushnell D., Kornberg R. Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution// Science. 2001. Vol. 292. P. 1876–1882.
71. Goddard T.D., Huang C.C., Ferrin T.E. Visualizing density maps with UCSF Chimera// J. Struct. Biol. 2007. Vol. 157. P. 281-287.
72. Gonen T. et al. Lipid–protein interactions in double-layered two-dimensional AQP0 crystals //Nature. 2005. Vol. 438. № 7068. P. 633-638.
73. Grigorieff N. FREALIGN: high-resolution refinement of single particle structures //Journal of structural biology. 2007. Vol. 157. № 1. P. 117-125.
74. Guenther M., Levine S., Boyer L., Jaenisch R., Young R. A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells// Cell. 2007. Vol. 130. P. 77–88.
75. Hagerman P.J. Investigations of the flexibility of DNA using transient electric birefringence// Biopolymers. 1981. Vol. 20. P. 1503-1535.

76. Hall M., Shundrovsky A., Bai L., Fulbright R., Lis J., Wang M. High-resolution dynamic mapping of histone-DNA interactions in a nucleosome// *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009. Vol. 16. P. 124–129.
77. Hanszen K. J. The optical transfer theory of the electron microscope: fundamental principles and applications// *Advances in optical and electron microscopy.* 1971. Vol. 4. P. 1-84.
78. Harauz G., Boekema E., van Heel M. Statistical image analysis of electron micrographs of ribosomal subunits// *Methods Enzymol.* 1988. Vol. 164. P. 35-49.
79. Hayes J.J., Tullius T.D., Wolffe A.P. The structure of DNA in a nucleosome// *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1990. Vol. 87. № 19. P. 7405–7409.
80. Hegde M.L., Hazra T.K., Mitra S. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells// *Cell Res.* 2008. Vol. 18. № 1. P. 27– 47.
81. Hirata A., Klein B.J., Murakami K.S. The X-ray crystal structure of RNA polymerase from archaea// *Nature.* 2008. Vol. 451. P. 851–854.
82. Hou, M.-H., Robinson, H., Gao, Y.-G., Wang, A.-H. Crystal Structure of Actinomycin D Bound to the CTG Triplet Repeat Sequences Linked to Neurological Diseases// *Nucleic Acids Res.* 2002. Vol. 30. P. 4910-4917.
83. Hsieh F.K., Fisher M., Ujvari A., Studitsky V., Luse D. Histone Sin mutations promote nucleosome traversal and histone displacement by RNA polymerase II// *EMBO Rep.* 2010. Vol. 11. P. 705–710.
84. Hsieh F.K., Kulaeva O., Patel S., Dyer P., Luger K., Reinberg D., Studitsky V. Mechanism of FACT action during Pol II transcription through chromatin// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. Vol. 110. P. 7654–7659.
85. Izban M., Luse D. Factorstimulated RNA polymerase II transcribes at physiological elongation rates on naked DNA but very poorly on chromatin templates// *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 267. P. 13647–13655.
86. Izban M.G, Luse D.S. Transcription on nucleosomal templates by RNA polymerase II in vitro: Inhibition of elongation with enhancement of sequence-specific pausing// *Genes Dev.* 1991. Vol. 5. №4. P. 683–696.
87. Jamai A., Imoberdorf R., Strubin M. Continuous histone H2B and transcription-dependent histone H3 exchange in yeast cells outside of replication// *Mol. Cell.* 2007. Vol. 25. P. 345–355.
88. Jensen, G. J., Ed. *Methods in Enzymology: Cryo-EM, Part C, Fitting*; Academic Press, Elsevier: San Diego, CA, 2010; Vol. 484.
89. Jin J., Bai L., Johnson D., Fulbright R., Kireeva M., Kashlev M., Wang M.D. Synergistic action of RNA polymerases in overcoming the nucleosomal barrier// *Nat. Struct. Mol. Biol.*

2010. Vol. 17. P. 745–752.
90. Jun, S.H.; Warner, B.A.; Murakami, K.S. RNA polymerase reaction in bacteria. In *Encyclopedia of Biological Chemistry*; Lane, W.J.L.D., Ed.; Academic Press: Waltham, MA, USA. 2013. P. 167–172.
91. Katan-Khaykovich Y., Struhl K. Splitting of H3-H4 tetramers at transcriptionally active genes undergoing dynamic histone exchange// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. Vol. 108. P. 1296–1301.
92. Kathe S.D., Shen G.-P., Wallace S.S. Single-stranded breaks in DNA but not oxidative DNA base damages block transcriptional elongation by RNA polymerase II in HeLa cell nuclear extracts// *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. № 18. P. 18511–18520.
93. Kim H., O’Shea E. A quantitative model of transcription factor activated gene expression// *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2008. Vol. 15. P. 1192–1198.
94. Kireeva M. L., Hancock B., Cremona G. H., Walter W., Studitsky V. M., Kashlev, M. Nature of the nucleosomal barrier to RNA polymerase II// *Molecular cell*. 2005. Vol. 18. №1. P. 97–108.
95. Kireeva M., Walter W., Tchernajenko V., Bondarenko V., Kashlev M., Studitsky V. Nucleosome remodeling induced by RNA polymerase II: loss of the H2A/H2B dimer during transcription// *Mol. Cell*. 2002. Vol. 9. P. 541– 552.
96. Kornberg R.D., Thomas J.O. Chromatin structure; oligomers of the histones // *Science*. 1974. Vol. 184. № 4139. P. 865–868.
97. Kristjuhan A., Svejstrup J. Evidence for distinct mechanisms facilitating transcript elongation through chromatin in vivo// *EMBO J*. 2004. Vol. 23. P. 4243–4252.
98. Kulaeva O. I. et al. Molecular mechanisms of transcription through a nucleosome by RNA polymerase II // *Molecular Biology*. 2013. Vol. 47. №. 5. P. 655-667.
99. Kulaeva O., Gaykalova D., Pestov N., Golovastov V., Vassilyev D., Artsimovitch I., Studitsky V. Mechanism of chromatin remodeling and recovery during passage of RNA polymerase II// *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009. Vol. 16. P. 1272–1278.
100. Kulaeva O., Hsieh F., Studitsky V. RNA polymerase complexes cooperate to relieve the nucleosomal barrier and evict histones// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. Vol. 107. P. 11325–11330.
101. Kumar R., Grubmüller H. do\_x3dna: a tool to analyze structural fluctuations of dsDNA or dsRNA from molecular dynamics simulations// *Bioinformatics*. – 2015. – P. btv190.
102. Lankaš F., Šponer J., Langowski J., Cheatham T.E. DNA Basepair Step Deformability Inferred from Molecular Dynamics Simulations. *Biophysical Journal*. 2003. Vol. 85. №5. P. 2872-2883.

103. Lawrenz M. et al. Independent-Trajectory Thermodynamic Integration: A Practical Guide to Protein-Drug Binding Free Energy Calculations Using Distributed Computing//*Computational Drug Discovery and Design*. 2012. – P. 469-486.
104. Le Cam E., Fack F., Ménessier-de Murcia J., Cognet J.A., Barbin A., Sarantoglou V., Révet B., Delain E., Murcia G. de. Conformational analysis of a 139 base-pair DNA fragment containing a single-stranded break and its interaction with human poly(ADP-ribose) polymerase// *J. Mol. Biol.* 1994. Vol. 235. № 3. P. 1062–1071.
105. Lebart L., Morineau A., Warwick K. M. Multivariate descriptive statistical analysis; correspondence analysis and related techniques for large matrices. – 1984.
106. Lee C., Shibata Y., Rao B., Strahl B., Lieb J. Evidence for nucleosome depletion at active regulatory regions genome-wide// *Nat. Genet.* 2004. Vol. 36. P. 900–905.
107. Lengauer T., Rarey M. Computational methods for biomolecular docking// *Current opinion in structural biology*. 1996. Vol. 6. № 3. P. 402–406.
108. Leschziner A. E., Nogales E. The orthogonal tilt reconstruction method: an approach to generating single-class volumes with no missing cone for ab initio reconstruction of asymmetric particles//*Journal of structural biology*. 2006. Vol. 153. №. 3. P. 284-299.
109. Leschziner A.E., Saha A., Wittmeyer J., Zhang Y., Bustamante C., Cairns B.R., Nogales E. Conformational flexibility in the chromatin remodeler RSC observed by electron microscopy and the orthogonal tilt reconstruction method// *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007. Vol. 104. P. 4913-4918.
110. Levitt M., Hirshberg M., Sharon R., Daggett V. Potential energy function and parameters for simulations of the molecular dynamics of proteins and nucleic acids in solution// *Computer Physics Communications*. 1995. Vol. 91. №1-3. P. 215-231.
111. Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Palmo, K., Maragakis, P., Klepeis, J. L., Dror, R. O., Shaw, D. E. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field// *Proteins*. 2010. Vol. 78. №8. P. 1950–1958.
112. Liu L.F., Wang J.C. Supercoiling of the DNA template during transcription// *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1987. Vol. 84. № 20. P. 7024–7027.
113. Ljungman M., Hanawalt P. Efficient protection against oxidative DNA damage in chromatin// *Mol. Carcinog.* 1992. Vol. 5. P. 264–269.
114. 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. Vol. 276. No 1. P. 19–42.
115. Lu X. J., Olson W. K. 3DNA: a software package for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic acid structures//*Nucleic acids research*. 2003. Vol.

31. №. 17. P. 5108-5121.
116. Lu, X.-J., Z. Shakked, and W. K. Olson. A-form conformational motifs in ligand-bound DNA structures// *J. Mol. Biol.* 2000. Vol. 300. P. 819–840.
117. Ludtke, S.J., Baldwin, P.R., Chiu, W. EMAN: Semi-automated software for high resolution single particle reconstructions// *J. Struct. Biol.* 1999. Vol.128. P. 82–97.
118. Ludwig A., Behnke B., Holtlund J., Hilz H. Immunoquantitation and size determination of intrinsic poly(ADP-ribose) polymerase from acid precipitates. An analysis of the *in vivo* status in mammalian species and in lower eukaryotes// *J. Biol. Chem.* 1988. Vol. 263. № 15. P. 6993–6999.
119. Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution// *Nature.* 1997. Vol. 389. №6648. P. 251–260.
120. Marco J., Cocco S. The microcromechanics of DNA. *Physics world*, N3, 37-41.
121. Martens J., Wu P.Y., Winston F. Regulation of an intergenic transcript controls adjacent gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*// *Genes Dev.* 2005. Vol. 19. P. 2695–2704.
122. Martin A.G., Depoix F., Stohr M., Meissner U., Hagner-Holler S., Hammouti K., Burmester T., Heyd J., Wriggers W., Markl J.. *Limulus polyphemus* Hemocyanin: 10 Å Cryo-EM Structure, Sequence Analysis, Molecular Modelling and Rigid-body Fitting Reveal the Interfaces Between the Eight Hexamers// *J. Mol. Biol.* 2007. Vol. 366. P.1332–1350.
123. Martinez-Rucobo F. W. et al. Molecular basis of transcription-coupled pre-mRNA capping // *Molecular cell.* 2015. Vol. 58. №. 6. P. 1079-1089.
124. Mavrich T., Jiang C., Ioshikhes I., et al. Nucleosome organization in the *Drosophila* genome// *Nature.* 2008. Vol. 453. P. 358–362.
125. Mehandzhynski A., Enrico Riccardi, Titus S. van Erp, Thuat T. Trinh, and Brian A. Grimes. Ab Initio Molecular Dynamics Study on the Interactions between Carboxylate Ions and Metal Ions in Water// *J. Phys. Chem. B.* 2015. Vol. 119. №33., P. 10710–10719.
126. Meyer P.A., Ye P., Zhang M., Suh M.H., Fu J. Phasing RNA polymerase II using intrinsically bound Zn atoms: an updated structural model// *Structure.* 2006. Vol.14. №6. P. 973-982.
127. Murakami K.S. X-ray crystal structure of *Escherichia Coli* RNA polymerase sigma 70 holoenzyme// *J. Biol. Chem.* 2013. Vol. 288. P. 9126–9134.
128. Murakami, K.S., Darst, S.A. Bacterial RNA polymerases: The whole story// *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2003. Vol. 13. P. 31–39.
129. Navaza J. Combining X-ray and electron-microscopy data to solve crystal structures // *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography.* 2008. Vol. 64. №. 1. P. 70-75.

130. Nechaev S., Adelman K. Promoter-proximal Pol II: when stalling speeds things up// *Cell Cycle*. 2008. Vol. 7. P. 1539–1544.
131. Nelson D., Lehninger A., Cox M. *Principles of biochemistry*. Edition 5, 2008.
132. Nguyen V.Q., Ranjan A., Stengel F., Wei D., Aebersold R., Wu C., Leschziner A.E. Molecular architecture of the ATP-dependent chromatin-remodeling complex SWR1// *Cell*. 2013. Vol. 154. P. 1220-1231.
133. Noll M. Internal structure of the chromatin subunit// *Nucleic Acids Res.* 1974. Vol. 1. № 11. P. 1573–1578.
134. Odell I.D., Wallace S.S., Pederson D.S. Rules of engagement for base excision repair in chromatin// *J. Cell. Physiol.* 2013. Vol. 228. № 2. P. 258–266.
135. Olson, W. K., and V. B. Zhurkin. Modeling DNA deformations// *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2000. Vol. 10. P.286–297.
136. Orlova E., Saibil H. Structural analysis of macromolecular assemblies by electron microscopy// *Chem. Rev.* 2011. Vol. 111. P. 7710-7748.
137. Orphanides G., LeRoy G., Chang C.H., Luse D.S., Reinberg D. FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes// *Cell*. 1998. Vol. 92. P. 105– 116.
138. Orphanides G., Wu W.H., Lane W.S., Hampsey M., Reinberg D. The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins// *Nature*. 1999. Vol. 400. P. 284–288.
139. Pandurangan A.P, Topf M. Finding rigid bodies in protein structures: Application to flexible fitting into cryoEM maps// *Journal of Structural Biology*. 2012. Vol. 177. № 2. P. 520–531.
140. Paramanathan, T., Vladescu, I., McCauley, M. J., Rouzina, I., & Williams, M. C. Force spectroscopy reveals the DNA structural dynamics that govern the slow binding of Actinomycin D// *Nucleic acids research* .2012. Vol. 40. №11. P. 4925-4932.
141. Penczek P. A. Chapter one-fundamentals of three-dimensional reconstruction from projections // *Methods in enzymology*. 2010. Vol. 482. P. 1-33.
142. Penczek P. A. Three-dimensional spectral signal-to-noise ratio for a class of reconstruction algorithms // *Journal of structural biology*. 2002. Vol. 138. №. 1. P. 34-46.
143. Penczek P., Radermacher M., Frank J. Three-dimensional reconstruction of single particles embedded in ice // *Ultramicroscopy*. 1992. Vol. 40. № 1. P. 33-53.
144. Pengwen C., Jie Y. Singapore-MIT Alliance, Mechanobiology Institute Singapore; HPC Newsletter on 11 Apr, 2013.
145. Petesch S., Lis J. Rapid, transcriptionindependent loss of nucleosomes over a large chromatin domain at Hsp70 loci// *Cell*. 2008. Vol. 134. P. 74–84.

146. Poglitsch C.L., Meredith G., Gnatt A., Jensen G.J., Chang W-H., Fu J., Kornberg, R.D. Electron crystal structure of an RNA polymerase II transcription elongation complex// *Cell*. 1999. Vol. 98. P. 791-798.
147. Pogozelski W.K., Tullius T.D. Oxidative Strand Scission of Nucleic Acids: Routes Initiated by Hydrogen Abstraction from the Sugar Moiety// *Chem. Rev.* 1998. Vol. 98. № 3. P. 1089–1108.
148. Prasad B. V. V. et al. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid // *Science*. 1999. Vol. 286. №. 5438. P. 287-290.
149. Price D.H. Poised polymerases: on your mark...get set...go!// *Mol. Cell*. 2008. Vol. 30. P. 7–10.
150. Quillin M. L., Matthews B. W. Accurate calculation of the density of proteins // *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 2000. Vol. 56. №. 7. P. 791-794.
151. Radermacher M. et al. Three-dimensional reconstruction from a single-exposure, random conical tilt series applied to the 50S ribosomal subunit of *Escherichia Coli* // *Journal of microscopy*. 1987. Vol. 146. №. 2. P. 113-136.
152. Radon J. On determination of functions by their integral values along certain multiplicities // *Ber. der Sachische Akademie der Wissenschaften Leipzig,(Germany)*. 1917. Vol. 69. P. 262-277.
153. Ricci C.G., de Andrade A.S., Mottin M., Netz P.A. Molecular dynamics of DNA: comparison of force fields and terminal nucleotide definitions// *J Phys Chem B*. 2010. Vol. 114. №30. P. 9882-9893.
154. Rossmann M.G. Fitting atomic models into electron-microscopy maps// *Acta Cryst.* 2000. Vol. 56. P. 1341-1349.
155. Rufiange A., Jacques P., Bhat W., Robert F., Nourani A. Genome-wide replication-independent histone H3 exchange occurs predominantly at promoters and implicates H3 K56 acetylation and Asf1// *Mol. Cell*. 2007. Vol. 27. P. 393–405.
156. Saxton W.O., Baumeister W. The correlation averaging of a regularly arranged bacterial cell envelope protein// *J. Microscopy*. 1982. Vol. 127. P. 127–138.
157. Schuster-Böckler B., Lehner B. Chromatin organization is a major influence on regional mutation rates in human cancer cells// *Nature*. 2012. Vol. 488. № 7412. P. 504–507.
158. Schwabish M., Struhl K. Evidence for eviction and rapid deposition of histones upon transcriptional elongation by RNA polymerase II// *Mol. Cell. Biol.* 2004. Vol. 24. P. 10111–10117.
159. Schwartz B., Ahmad K. Transcriptional activation triggers deposition and removal of the histone variant H3.3// *Genes Dev*. 2005. Vol. 19. P. 804–814.

160. Selth L., Sigurdsson S., Svejstrup J. Transcript elongation by RNA Polymerase II// *Annu Rev Biochem.* 2010. Vol. 79. P. 271–293.
161. Sengupta S.K., Anderson J.E., Kelley C. Carbon-7 Substituted actinomycin D analogues as improved antitumor agents: synthesis and DNA-binding and biological properties// *J.Med.Chem.* 1982. Vol. 25. P. 1214-1219.
162. Serysheva I. I. et al. Electron cryomicroscopy and angular reconstitution used to visualize the skeletal muscle calcium release channel // *Nature Structural & Molecular Biology.* 1995. Vol. 2. №. 1. P. 18-24.
163. Sobell H. Actinomycin and DNA transcription// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Biochemistry.* 1985. Vol. 82. P. 5328-5331.
164. Sobell H.M. Actinomycin and DNA transcription// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Biochemistry.* 1985. Vol. 82. P. 5328-5331.
165. Sousa D., Grigorieff N. Ab initio resolution measurement for single particle structures // *Journal of structural biology.* 2007. Vol. 157. №. 1. P. 201-210.
166. Strand J.M., Scheffler K., Bjørås M., Eide L. The distribution of DNA damage is defined by region-specific susceptibility to DNA damage formation rather than repair differences // *DNA Repair.* 2014. Vol. 18. P. 44–51.
167. Studitsky V., Clark D. J., Felsenfeld G. Overcoming a nucleosomal barrier to transcription// *Cell.* 1995. Vol. 83. P. 19–27.
168. Studitsky V., Clark D., Felsenfeld G. A histone octamer can step around a transcribing polymerase without leaving the template// *Cell.* 1994. Vol. 76. P. 371–382.
169. Studitsky V., Kassavetis G., Geiduschek E., Felsenfeld G. Mechanism of transcription through the nucleosome by eukaryotic RNA polymerase// *Science.* 1997. Vol. 278. P. 1960–1963.
170. Stuwe T., Hothorn M., Lejeune E., Rybin V., Bortfeld M., Scheffzek K., Ladurner A.G. The FACT Spt16 “peptidase” domain is a histone H3-H4 binding module// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. Vol. 105. P. 8884–8889.
171. Teytelman L., Eisen M.B., Rine J. Silent but not static: accelerated base-pair substitution in silenced chromatin of budding yeasts// *PLoS Genet.* 2008. Vol. 4. № 11. P. e1000247.
172. Thåström A., Lowary P.T., Widlund H.R., Cao H., Kubista M., Widom J. Sequence motifs and free energies of selected natural and non-natural nucleosome positioning DNA sequences// *J. Mol. Biol.* 1999. Vol. 288. № 2. P. 213–229.
173. Thiriet C., Hayes J. Replication-independent core histone dynamics at transcriptionally active loci in vivo// *Genes Dev.* 2005. Vol. 19. P. 677–582.

174. Thiriet C., Hayes J. Replication-independent core histone dynamics at transcriptionally active loci in vivo// *Genes Dev.* 2005. Vol. 19. P. 677–582.
175. Trabuco L.G., Schreiner E., Gumbarta J., Hsina J., Villad E., Schultena K. Applications of the molecular dynamics flexible fitting method// *J Struct Biol.* 2011. Vol. 173. №3. P. 420–427.
176. Trabuco L.G., Villa E., Mitra K., Frank J., Schulten K. Flexible Fitting of Atomic Structures into Electron Microscopy Maps Using Molecular Dynamics// *Structure.* 2008. Vol. 16. P. 673–683.
177. Ujvari A., Hsieh F.K., Luse S.W., Studitsky V.M., Luse D.S. Histone N-terminal tails interfere with nucleosome traversal by RNA polymerase II// *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283. P. 32236–32243.
178. Unser M. et al. Spectral signal-to-noise ratio and resolution assessment of 3D reconstructions // *Journal of structural biology.* 2005. Vol. 149. №. 3. P. 243-255.
179. Unser M., Trus B. L., Steven A. C. A new resolution criterion based on spectral signal-to-noise ratios // *Ultramicroscopy.* 1987. Vol. 23. №. 1. P. 39-51.
180. Unwin P. N. T. Electron microscopy of the stacked disk aggregate of tobacco mosaic virus protein: II. The influence of electron irradiation on the stain distribution// *Journal of molecular biology.* 1974. Vol. 87. №. 4. P. 657-670.
181. van der Spoel D., Lindahl E., Hess B., and the GROMACS development team; 2013, GROMACS User Manual version 4.6.5.
182. van Heel M. Angular reconstitution - a posteriori assignment of projection directions for 3-D reconstruction// *Ultramicroscopy.* 1987. Vol. 21. P. 111-123.
183. van Heel M., Gowen B., Matadeen R., Orlova E.V., Finn R., Pape T., Cohen D., Stark H., Schmidt R., Schatz M., Patwardhan A. Single-particle electron cryo-microscopy: towards atomic resolution// *Q Rev Biophys.* 2000. Vol. 33. P. 307-369.
184. van Heel M., Harauz G., Orlova E.V., Schmidt R., Schatz M. A new generation of the IMAGIC image processing system// *J. Struct. Biol.* 1996. Vol. 116. P. 17–24.
185. van Heel M., Schatz M. Fourier shell correlation threshold criteria// *J. Struct. Biol.* 2005. Vol. 151. P. 250-262.
186. Varanasi S., Guskova O. A., John A., Sommer J.-U. Water around fullerene shape amphiphiles: A molecular dynamics simulation study of hydrophobic hydration// *J Chem Phys.* 2015. Vol. 142. №22. P. 224-308.
187. Vassylyev D.G., Vassylyeva M.N., Perederina A., Tahirov T.H., Artsimovitch I. Structural basis for transcription elongation by bacterial RNA polymerase// *Nature.* 2007. Vol. 448. P. 157-162.

188. Vignali, M., Hassan, A., Neely, K., Workman, J. ATP-dependent chromatin-remodeling complexes// *Mol. Cell. Biol.* 2000. Vol. 20. P. 1899–1910.
189. Villa, A. Mark, A. E. Calculation of the free energy of solvation for neutral analogs of amino acid side chains// *J. Comput. Chem.* 2002. Vol. 23. №. 5. P. 548-553.
190. Volokh O. I., Bozdaganyan M. E., Shaitan K. V. Assessment of the DNA-binding properties of actinomycin and its derivatives by molecular dynamics simulation//*Biophysics.* 2015. Vol. 60. №. 6. P. 893-899.
191. Walter W., Kireeva M., Studitsky V., Kashlev M. Bacterial polymerase and yeast polymerase II use similar mechanisms for transcription through nucleosomes// *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. P. 36148–36156.
192. Wang J.C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective// *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002. Vol. 3. № 6. P. 430–440.
193. Weber, C.M., Ramachandran, S., Henikoff, S. Nucleosomes Are Context-Specific, H2A.Z-Modulated Barriers to RNA Polymerase// *Mol Cell.* 2014. Vol. 53. P. 819-830.
194. Weinfeld M., Chaudhry M.A., D'Amours D., Pelletier J.D., Poirier G.G., Povirk L.F., Lees-Miller S.P. Interaction of DNA-dependent protein kinase and poly(ADP- ribose) polymerase with radiation-induced DNA strand breaks// *Radiat. Res.* 1997. Vol. 148. № 1. P. 22–28.
195. Wigler M.H., Axel R. Nucleosomes in metaphase chromosomes// *Nucleic Acids Res.* 1976. Vol. 3. № 6. P. 1463–1471.
196. Winkler D.D., Luger K. The histone chaperone FACT: structural insights and mechanisms for nucleosome reorganization// *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286. P. 18369–18374.
197. Winkler D.D., Muthurajan U.M., Hieb A.R., Luger K. Histone chaperone FACT coordinates nucleosome interaction through multiple synergistic binding events// *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286. P. 41883–41892.
198. Winkler H. 3D reconstruction and processing of volumetric data in cryo-electron tomography//*Journal of structural biology.* 2007. Vol. 157. №. 1. P. 126-137.
199. Wittmeyer J., Formosa T. The *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase alpha catalytic subunit in teracts with Cdc68/Spt16 and with Pob3, a protein similar to an HMG1-like protein// *Mol. Cell Biol.* 1997. Vol. 17. P. 4178– 4190.
200. Wittschieben B., Otero G., de Bizemont T., Fellows J., Erdjument-Bromage H., Ohba R., Li Y., Allis C., Tempst P., Svejstrup J. A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme// *Mol. Cell.* 1999. Vol. 4. P. 123–128.
201. Woychik N., Young R. RNA polymerase II: subunit structure and function// *Trends Biochem Sci.* 1990. Vol. 15. №9. P. 347-351.

202. Xiong Q. et al. CTF determination and correction for low dose tomographic tilt series //Journal of structural biology. 2009. Vol. 168. № 3. P. 378-387.
203. Yamaguchi, H., Siebers, J. G., Furukawa, A., Otagiri, N., Osman, R. Molecular dynamics simulation of a DNA containing a single strand break// Radiation protection dosimetry. 2002. Vol. 99. №1-4. P. 103-108.
204. Yanga Z., Lasker K. Schneidman-Duhovny D., Webb B., Huang C.C., Pettersena E.F., Goddarda T.D., Menga E.C., Salib A., Ferrina T.E. UCSF Chimera, MODELLER, and IMP: An integrated modeling system// Journal of Structural Biology. 2012. Vol. 179. № 3. P. 269–278.
205. Zeitlinger J., Stark A., Kellis M., Hong J.W., Nechaev S., Adelman K., Levine M., Young R. RNA polymerase stalling at developmental control genes in the *Drosophila melanogaster* embryo// Nat. Genet. 2007. Vol. 39. P. 1512–1516.
206. Zhang X. et al. 3.3 Å cryo-EM structure of a nonenveloped virus reveals a priming mechanism for cell entry//Cell. 2010. Vol. 141. № 3. P. 472-482.
207. Zhao J., Herrera-Diaz J., Gross D. Domain-wide displacement of histones by activated heat shock factor occurs independently of Swi/Snf and is not correlated with RNA polymerase II density// Mol. Cell. Biol. 2005. Vol. 25. P. 8985–8999.
208. Zhou W., Doetsch P.W. Effects of abasic sites and DNA single-strand breaks on prokaryotic RNA polymerases// Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1993. Vol. 90. № 14. P. 6601–6605.
209. Zhou Z.H., Hardt S., Wang B., Sherman M.B., Jakana J., Chiu W. CTF determination of images of ice-embedded single particles using a graphics interface// J. Struct. Biol. 1996. Vol. 116. P. 216-222.
210. Ziegler A., Kisielowski C., Ritchie R. O. Imaging of the crystal structure of silicon nitride at 0.8 Å resolution//Acta Materialia. 2002. Vol. 50. № 3. P. 565-574.
211. Благой Ю. П. Взаимодействие ДНК с биологически активными веществами (ионами металлов, красителями, лекарствами) //Соросовский образовательный журнал. – 1998. – Т. 10. – №. 35. – С. 18-25.
212. Герасимова Н. 2015. Хроматин-специфичная остановка РНК-полимераз на повреждениях ДНК (на правах рукописи).
213. Григорьев Ф. В. Расчет энергии Гиббса образования межмолекулярных комплексов методом термодинамического интегрирования с использованием гармонических ограничений на движение атомов//Вычислительные методы и программирование. – 2012. – Т. 13. – №. 3. – С. 391-397.

## Приложение 1

### **Апробация метода молекулярной динамики для исследования взаимодействий ДНК с лигандами**

Апробация молекулярнодинамического подхода к исследованиям взаимодействий ДНК-лиганд была проведена на модельных объектах – комплексов ДНК с производными актиномицина Д.

#### **Литературный обзор**

##### Антибиотики актиномицинового ряда – блокаторы транскрипции

Актиномицин принадлежит к классу антибиотиков стрептомицетного происхождения, образуемыми представителями *Streptomyces antibioticus*. Стрептомицеты характеризуются высоким уровнем сложности вторичного метаболизма. Они являются продуцентами более 2/3 всех клинически используемых антибиотиков природного происхождения (неомицин, хлорамфеникол и др.). Род *Streptomyces* широко используется в производстве антибиотиков, противогрибковых препаратов, и других биологически активных соединений.

Антибиотики актиномицинового ряда в течение нескольких десятилетий используются для лечения инфекционных и опухолевых заболеваний. Такое применение основано на способности актиномицинов формировать специфический устойчивый комплекс с ядерной ДНК (молекула-интеркалятор, см. выше) и ингибировать этим РНК-полимеразную реакцию, в результате чего подавляется синтез белка и клеточное деление. Основным ограничением применения актиномицинов является их высокая токсичность и неизбирательность проникновения в клетки.

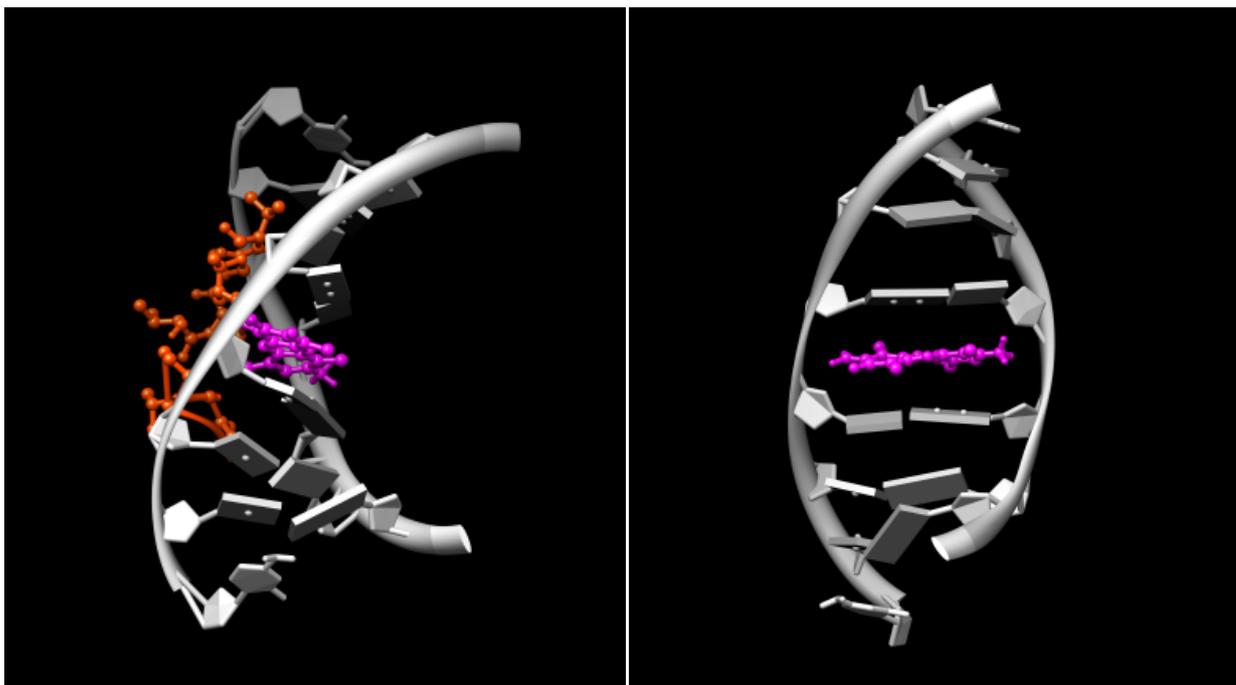


ДНК-матрицей, что свидетельствует о гораздо большем их сродстве к ДНК, чем самого фермента. Синтез рибосомальной РНК особенно чувствителен к присутствию актиномицина, что определяет его фармакологическую активность. При более высоких концентрациях он ингибирует также ДНК-полимеразу, а так же может способствовать образованию односторонних разрывов ДНК.

### Структура комплекса актиномицин - ДНК

Несколько лет назад была установлена трехмерная структура актиномициндіоксигуанозинового комплекса методом рентгенструктурной кристаллографии. На основании проведенных исследований была предложена модель, позволяющая понять основной принцип взаимодействия молекулы актиномицина со спиралью ДНК. Согласно этой модели, феноксазиновая система колец актиномицина встраивается между соседними парами азотистых GpC-оснований (интеркалируя через малый желоб ДНК, см. Рисунок 49), в то время как пентапептидные цепи располагаются в малом желобе спирали и образуют водородные связи с гуаниновым основанием на противоположной цепи. Именно мощные водородные связи между гуанинами НК и азотом феноксазина, а так же Thr( $\alpha$  и  $\beta$ ) пептидных частей антибиотика определяют его специфичность при встраивании в нуклеиновую кислоту. Метильная группа MVA из  $\alpha$ - и  $\beta$ - пептидных колец вклинивается между G и следующим за ним T цепи ДНК. 3-кетогруппа феноксазина ориентирована против GpC связи остова ДНК, а 2-аминогруппа феноксазина образует водородную связь с кислородом C (цитозина). Феноксазиновая группировка удерживается мощными стекинг-взаимодействиями с G-основаниями с двух сторон от хромофора. Интеркаляция АД вызывает изменения некоторых торсионных углов остова НК. Комплекс обладает неабсолютной двусторонней симметрией, так как молекула антибиотика располагается плотнее к одному остатку гуанина, то есть ближе к одной из спиралей ДНК. При образовании комплекса актиномицин - нуклеиновая кислота, молекула антибиотика встраивается в структуру так называемой  $\beta$ -ДНК, присутствующей в транскрипционном комплексе.  $\beta$ -ДНК состоит из повторяющихся единиц, называемых  $\beta$ -структурными элементами. Они принадлежат семейству структур динуклеотидных пар оснований, различающихся углом поворота несвязанных оснований.  $\beta$ -ДНК является метастабильной обязательной промежуточной структурой при плавлении ДНК, что помогает понять механизм взаимодействия антибиотика с нуклеиновой кислотой. Молекула актиномицина встраивается в  $\beta$ -ДНК, располагающуюся между нормальной двойной спиралью и расплавленной одноцепочечной ДНК в транскрипционном комплексе. Таким образом, молекула актиномицина иммобилизует комплекс, препятствуя перемещению фермента РНК-

полимеразы вдоль цепи ДНК. В результате этого останавливается синтез цепи РНК, идущий на матрице ДНК [Sobell, 1985].



**Рисунок 49. Схема встраивания актиномицина в двуцепочечную ДНК. Феноксазоновая группа вклинивается между парами гуанин - цитозин, пептидные кольца располагаются в малом желобе ДНК, стабилизируя структуру.**

Связь между образованием комплекса лиганд - ДНК и последующими биологическими эффектами легла в основу разработки и развития эффективных химиотерапевтических агентов. Некоторые более действенные и клинически пригодные противораковые агенты, как было показано, формируют обратимый комплекс с молекулой ДНК (помимо актиномицина D: адриамицин, даунорубицин, митоксантрон и др.). В 1981 году Sengupta с сотрудниками получили аналог актиномицина D, способный ковалентно связываться с ДНК. Аналог 7-(2,3-эпоксипропоксид)-актиномицин D демонстрировал более высокую противораковую активность для некоторых раковых линий. Считается, что повышенная активность аналога связана со способностью образовывать ковалентную связь с молекулой ДНК (эксперименты *in vitro*).

#### Медицинское применение и направления развития

В медицинской практике находят применение пока лишь два типа актиномицинов: актиномицин D (препараты космеген и дактиномицин) и некоторые препараты актиномицина С.

Поскольку в миллимолярных и субмиллимолярных концентрациях АДД трудно растворим в воде (а при температуре 37°C практически нерастворим), то его применение в качестве лекарственного препарата сильно затруднено.

Обычно АМД применяют в сочетании с другими лекарственными средствами (адриамицин, циклофосфан, и др.) и лучевой терапией при трофобластической болезни, хориокарциноме матки, хорионэпителиоме матки, опухоли Вильямса, саркоме Юинга, рабдомиосаркоме у детей, ретикулосаркоме, саркоме Юинга, лимфогранулематозе, тератобластоме яичка, меланобластоме, диссеминированной меланоме и прочих опухолях.

Применение АМД даже в низкой дозировке характеризуется широким спектром побочных эффектов, отражающих его неспецифические цитотоксические свойства. Блокировка синтеза рРНК и подавление переноса уже сформированных структурных компонентов рибосом из ядра в клетку – наиболее сильное проявление цитотоксического эффекта на клеточном уровне. Кроме того, являясь весьма гидрофобным соединением, АМД способен адсорбироваться на клеточных мембранах и взаимодействовать с окислительно-восстановительными группами белков. Акцептируя электрон, АМД превращается в свободнорадикальное производное, способное атаковать мембранные белки и липиды, приводя к подавлению различных функций мембран.

На организменном уровне при применении АМД относительно часто наблюдаются множественные осложнения. Использование актиномицина в клинической практике имеет множественные ограничения, поэтому практическое значение имеет разработка его модифицированной формы для потенциального снижения дозировки.

### Искусственная модификация актиномицинов

Искусственная химическая модификация актиномицинов связана с изменениями хромофорной группы. Химическому изменению подвергают группировку хромофора в положении 7. Модификации подвергался в основном актиномицин D. Данный выбор положения обусловлен способностью таких замещенных аналогов сохранять стерическую конформацию исходного антибиотика, сильнее связываясь при этом с НК.

## **Материалы и методы**

### Свободная энергия

#### Свободная энергия в термодинамике (ТД)

Термодинамическими потенциалами (термодинамическими функциями) называют функции состояния системы, убыль которых в равновесных процессах, протекающих при постоянстве значений соответствующих независимых параметров, равна полезной внешней работе.

В физико-химических и биологических исследованиях обычно используется свободная энергия Гиббса (или изобарно-изотермический потенциал),  $G$ , т.к. протекание биологических процессов, как правило, не сопровождается изменением давления системы.

Свободной энергией Гиббса называют термодинамический потенциал следующего вида:

$$G = U + pV - TS, \quad (34)$$

где  $U$  - внутренняя энергия,  $p$  - давление,  $V$  - объем,  $T$  - температура,  $S$  - энтропия.

Так как

$$H = U + pV, \quad (35)$$

можно выразить

$$G = H - TS. \quad (36)$$

Изменение свободной энергии Гиббса в ходе химической реакции показывает термодинамически предпочтительное направление процесса, т.е. с термодинамической точки зрения реакция самопроизвольно протекает в сторону уменьшения свободной энергии системы. Стабильному состоянию системы при заданной температуре соответствует минимум свободной энергии (свободной энергии Гиббса ( $\Delta G$ ) при постоянном давлении и свободной энергии Гельмгольца ( $\Delta F$ ) при постоянном объеме).

В нашей работе определялись значения свободной энергии связывания лигандов - антибиотиков с ДНК-мишенью. Эта величина соответствует изменению свободной энергии Гиббса в ходе следующего процесса:



Значение свободной энергии связывания говорит о сродстве молекулы лиганда - антибиотика к рецептору - молекуле ДНК, т.е. о том, насколько склонны две молекулы образовывать комплекс. Чем меньше значение свободной энергии связывания, тем сильнее связь между антибиотиком и ДНК в НК - лигандном комплексе.

Как и для любой химической реакции, для процесса образования комплекса ДНК-антибиотик верно выражение (38), устанавливающее связь между свободной энергией связывания и константой равновесия реакции (37):

$$\Delta G_{\text{св}} = -RT \ln \frac{[\text{DNA-L комплекс}]}{[\text{DNA}][\text{L}]} = -RT \ln K_{\text{св}}. \quad (38)$$

Таким образом, свободная энергия связывания говорит о константе связывания антибиотика с ДНК. А константа связывания, в свою очередь, является важным физико-химическим показателем. Вычисление свободной энергии в компьютерном эксперименте требует достаточно продолжительных расчетов, вследствие чего предполагается использование современной суперкомпьютерной техники.

Свободная энергия в молекулярной динамике (МД)

Свободная энергия системы из 2 молекул может быть рассчитана в Gromacs методом «термодинамического интегрирования» (ТИ). Метод ТИ заключается в том, что в ходе динамики Гамильтониан системы медленно меняется от одного вида (описывающего систему **A**), до другого (описывающего систему **B**). Изменение Гамильтониана должно происходить так медленно, чтобы система оставалась в равновесном состоянии на протяжении всего процесса; если это требование выполняется, то изменение системы обратимо. Следовательно, использование обратного подхода (т.е. метода ТИ) для перехода системы из состояния **B** в состояние **A** даст те же результаты, что и при переходе из **A** в **B**, только с противоположным знаком.

Требуемая модификация Гамильтониана **H** осуществляется представлением **H** функцией от набора параметров:  $H=H(p,q;\lambda)$  таким образом, что в случае  $\lambda=0$  Гамильтониан описывает систему в состоянии **A**:

$$H(p, q; 0) = H^A(p, q), \quad (39)$$

а при  $\lambda=1$  – систему в состоянии **B**:

$$H(p, q; 1) = H^B(p, q). \quad (40)$$

Фактически, от параметра  $\lambda$  зависит форма потенциала в составе Гамильтониана. В Gromacs функциональная зависимость потенциала от  $\lambda$  различается для разных силовых полей (формулу для интересующего потенциала можно найти в пособии по соответствующему силовому полю).

Свободная энергия Гельмгольца **A** определяется через функцию  $Q(N,V,T)$ , описывающую равновесный ансамбль частиц, наблюдаемый в МД при постоянных объеме и температуре:

$$A(\lambda) = -k_B T \ln Q, \quad (41)$$

$$Q = c \iint \exp[-\beta H(p, q; \lambda)] dp dq, \quad (42)$$

где  $\beta = \frac{1}{k_B T}$  и  $c = (N! h^{3N})^{-1}$ .

Фактически более полезной является свободная энергия Гиббса **G**, определяющаяся через функцию  $\Delta(N, p, T)$  для равновесного ансамбля частиц, генерируемого МД при постоянных давлении и температуре:

$$G(\lambda) = -k_B T \ln \Delta, \quad (43)$$

$$\Delta = c \iiint \exp[-\beta H(p, q; \lambda) - \beta pV] dp dq dV, \quad (44)$$

где  $\beta = \frac{1}{k_B T}$  и  $c = (N! h^{3N})^{-1}$ .

Энергии Гиббса (**G**) и Гельмгольца (**A**) связаны следующим образом:

$$G = U - TS + pV, \quad (45)$$

$$A = U - TS, \quad (46)$$

$$G = A + pV. \quad (47)$$

Интегралы  $A(\lambda)$  и  $G(\lambda)$  по фазовому пространству не могут быть получены сразу в ходе динамики, но можно получить производную соответствующей интересующей нас величины по  $\lambda$ :

$$\frac{dG}{d\lambda_{N,p,T}} = \frac{dA}{d\lambda_{N,V,T}} = \frac{\iint \left(\frac{\partial H}{\partial \lambda}\right) \exp[-\beta H(p, q; \lambda)] dp dq}{\iint \exp[-\beta H(p, q; \lambda)] dp dq} = \left\langle \frac{\partial H}{\partial \lambda} \right\rangle_{NVT;\lambda} = \left\langle \frac{\partial H}{\partial \lambda} \right\rangle_{NpT;\lambda}. \quad (48)$$

Изменение свободной энергии при переходе из состояния А в состояние В может быть найдено интегрированием соответствующего выражения по  $\lambda$ :

$$A^B(V, T) - A^A(V, T) = \int_0^1 \left\langle \frac{\partial H}{\partial \lambda} \right\rangle_{NVT;\lambda} d\lambda, \quad (49)$$

$$G^B(p, T) - G^A(p, T) = \int_0^1 \left\langle \frac{\partial H}{\partial \lambda} \right\rangle_{NpT;\lambda} d\lambda. \quad (50)$$

Gromacs позволяет посчитать любой из этих двух интегралов по спектру промежуточных состояний от А до В. Однако, если изменение  $\lambda$  между промежуточными состояниями достаточно большое и число и значение их известно, то зависимость  $dG/d\lambda$  можно проанализировать самостоятельно. Такой результат достигается путем задания шага `delta_lambda` равным 0 в `*mdp` файле (файл параметров молекулярной динамики). Таким образом, для каждого  $\lambda$  рассчитывается среднее значение  $\left\langle \frac{\partial H}{\partial \lambda} \right\rangle_{NpT;\lambda}$ , в нашей работе рассчитывалось путем усреднения по траектории. Затем суммарная свободная энергия (изменение ее при переходе из одного состояния в другое) определяется путем численного интегрирования соответствующих значений по  $\lambda$ .

### Совместное использование методики двойного сопряжения (double decoupling) и

#### Термодинамического интегрирования

Мы рассчитывали свободные энергии связывания антибиотиков с ДНК в данной работе, применяя методики т.н. двойного сопряжения (англ. double decoupling) [Donninni, 2007] и ТИ.

Метод двойного сопряжения получил свое название, т.к. при расчете свободной энергии по этой методике производится два раунда ТИ. Подход подразумевает полноатомное представление моделей исследуемых систем, в которых явным образом задан растворитель.

На первом этапе термодинамического цикла методом ТИ вычисляется свободная энергия сольватации лиганда (в нашем случае антибиотика). При этом в выражения в гамильтониане, отвечающие за невалентные взаимодействия антибиотик-растворитель, вводится сопрягающий параметр  $\lambda$ , и система моделируется при различных значениях  $\lambda$  (обычно порядка 10 точек).

Получается, что при  $\lambda=1$  взаимодействия между двумя подсистемами (сольвент и актиномицин) моделируются в полной мере, затем, по ходу уменьшения сопрягающего параметра  $\lambda$ , взаимодействия постепенно уменьшаются, пока не исчезают вовсе при  $\lambda=0$ . Полученная из молекулярной динамики статистика затем обрабатывается, строится зависимость  $\langle \frac{\partial H}{\partial \lambda} \rangle$  (эквивалентная зависимости  $dG/d\lambda$ ) от  $\lambda$ , интегрированием которой получают искомую величину свободной энергии сольватации лиганда-антибиотика:

$$\Delta G_1 = \int_0^1 \left( \frac{\partial H}{\partial \lambda} \right)_{NVT} d\lambda. \quad (51)$$

Аналогичная процедура производится на втором этапе, но уже без разделения лиганда и системы растворитель-ДНК, в результате чего получается величина некоторой свободной энергии, соответствующей взаимодействию актиномицина и его окружения, составленного нуклеиновой кислотой, противоионами и растворителем:

$$\Delta G_2 = \int_0^1 \left( \frac{\partial H}{\partial \lambda} \right)_{NVT} d\lambda. \quad (52)$$

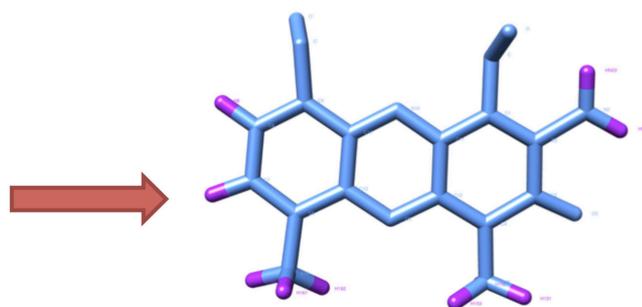
Итоговое значение свободной энергии связывания актиномицина с ДНК является разностью свободных энергий, полученных на предыдущих этапах:

$$\Delta G_{int} = \Delta G_2 - \Delta G_1. \quad (53)$$

#### Создание моделей исследуемых комплексов ДНК с производными актиномицина

Кристаллическая структура комплекса ДНК-актиномицин D была взята из RCSB Protein Data Bank (1MNV [Hou et al., 2002]). ДНК в структуре содержит следующую последовательность нуклеотидов: (3'-ATGCTGCAT-5'). Антибиотик располагается между 2 и 3 основаниями цепи, то есть (5'-ATG|CTGCAT-3'), где | - производное актиномицина. В исходной кристаллической структуре было представлено две молекулы антибиотика, вторая молекула была удалена в ходе подготовки структуры для исследования.

Структуры ДНК-7-гидроксиактиномицин и ДНК-7-аминоактиномицин были получены путем модификации исходной структуры 1MNV. Введение заместителей производилось в положение 7 феноксазиновой группировки (рисунок 50): атом водорода Н7 исходной структуры замещался на -ОН и -NH<sub>2</sub> группы соответственно в структурах ДНК-7-гидроксиактиномицин и ДНК-7-аминоактиномицин.



**Рисунок 50. Феноксазиновая группировка молекулы актиномицина D, красной стрелкой отмечено положение введения заместителей в структурах производных актиномицина D.**

Все МД расчеты в рамках данной работы проводились с использованием программного пакета Gromacs 4.6.5 [Spoel et al., 2013] и силового поля Amber99sb-ildn [Lindorff-Larsen et al., 2010], как хорошо подходящего для исследования нуклеиновых кислот [Ricci et al., 2010].

Топологии структур получены в Gromacs 4.6.5.

Расчет траекторий проводился в NPT-ансамбле при температуре 300 К (термостат Берендсена) и изотропном давлении – все компоненты давления 1 бар (баростат Берендсена), использованная модель воды — SPC-E [Berendsen et al., 1987]. Для потенциалов Леннарда-Джонса радиус отсечки составлял 1.8 нм [Levitt et al., 1995], для расчета электростатических взаимодействий использовался метод PME [Darden&Pedersen, 1993] с радиусом отсечки 1.8 нм [Darden&Pedersen, 1993]. Шаг интегрирования — 1 фс.

Валидация атомных структур производилась оценкой жесткости фрагментов ДНК и свободной энергии связывания производного актиномицина с фрагментом ДНК.

#### Релаксация систем ДНК-производные актиномицина: равновесная МД

Для созданных моделей были проведены расчеты равновесной молекулярной динамики комплексов ДНК-лиганд в водном растворе с физиологической концентрацией ионов хлорида натрия при 300К (термостат Берендсена) в течение 500 пс без баростата, и в течение 3 нс с баростатом (баростат Берендсена) с шагом интегрирования 1 фс.

**Таблица 6. Параметры расчетной ячейки структур ДНК-производное актиномицина и производных актиномицина для проведения релаксации систем, оценке влияния производных актиномицина на жесткость ДНК и расчета свободной энергии связывания ДНК с производными актиномицина.**

Система	Размер расчетной ячейки, нм	Количество атомов	Количество противоионов Na/Cl
Актиномицин	5,8×8,8×6,1	29214	29/29
ДНК+актиномицин	5,8×8,5×6,1	29800	45/29
7-аминоактиномицин	5,2×8,5×6,1	29219	29/29
ДНК+7-аминоактиномицин	5,2×8,5×6,1	29805	45/29
7-гидроксиактиномицин	5,8×8,5×6,1	29218	29/29
ДНК+7гидроксиактиномицин	5,8×8,5×6,1	29804	45/29

#### Оценка влияния производных актиномицина на жесткость ДНК.

Расчет модуля Юнга растяжения свободной ДНК и ДНК в комплексе с производным актиномицина производилась с применением управляемой молекулярной динамики. Параметры расчетных ячеек систем, исследованных в задаче приведены в таблице 6. Длина траектории составила 2,5 нс.

В ходе вычислительного эксперимента фиксировалась верхняя пара азотистых оснований DA5 и DT3, фиксация осуществляется по трем координатам (x,y,z). Противоположному концу фрагмента нуклеиновой кислоты сообщалось ускорение. Ускорения сообщались атомам фосфора цепи P8 и P11(предпоследняя пара оснований, так как на концевом DA5 нет фосфата). Величины ускорений равнялись: 6, 8, 10 (нм/пс<sup>2</sup>) по координате y для трех систем аналогично, соответствующие приложенные силы равнялись 9, 12, 15  $\frac{\text{ккал}}{\text{моль}\cdot\text{Å}}$ .

Расчет модуля растяжения производился по формуле 33 (см. Главу 2).

#### Оценка свободной энергии связывания производных актиномицина с ДНК

Для расчета свободной энергии связывания производных актиномицина с фрагментами ДНК проведены расчеты равновесной молекулярной динамики (длина траектории составила 10 нс).

Расчет свободной энергии производился методом «термодинамического интегрирования» [Lawrenz et al., 2012; Григорьев, 2012; Villa&Mark, 2002] для изменения свободной энергии системы при переходе из состояния А (свободный лиганд – производное актиномицина) в состояние В (комплекс ДНК-лиганд):

$$G^B(p, T) - G^A(p, T) = \int_0^1 \left\langle \frac{\partial H}{\partial \lambda} \right\rangle_{NpT; \lambda} d\lambda. \quad (54)$$

Метод «термодинамического интегрирования» является одним из основных и повсеместно применяемых приемов оценки свободной энергии методом молекулярной динамики [Darden&Pedersen, 1993; Varanasi et al., 2015; Bieler&Hunenberger, 2015; Mehandzhiynski et al. 2015].

Параметр  $\lambda$ , влияющий на форму потенциала в гамильтониане, дискретно изменялся от 0 до 1 (рассматривалось 14 точек:  $\lambda = 0, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 0.95, 0.975, 1.0$ ). Для каждого значения параметра проводилась динамика структур комплексов/производного актиномицина (длина траектории 10 нс). В ходе динамики на каждом шаге траектории рассчитывалось значение энергии, далее эти значения усреднялись по времени. В соответствии с алгоритмом термодинамического интегрирования, использованного в задаче [Spoel et al., 2013], рассчитывались два термодинамических цикла: антибиотик – вода ( $\Delta G1$ ) и антибиотик – ДНК – вода ( $\Delta G2$ ).

Значение свободной энергии связывания антибиотик – ДНК рассчитывалось как:

$$\Delta G_{\text{связ}} = \Delta G2 - \Delta G1. \quad (55)$$

Параметры расчетных ячеек для комплексов ДНК-производное актиномицина были аналогичными использованным в задаче по оценке влияния производных на жесткость ДНК, параметры ячеек для оценки энергии сольватации производных актиномицина приведены в таблице 6. Для оценки свободной энергии связывания были проведены расчеты равновесной молекулярной динамики в режиме расчета свободной энергии для комплексов ДНК-антибиотик и отдельно антибиотик в водном растворе с физиологической концентрацией ионов хлорида натрия при 300К (термостат Берендсена) и изотропном давлении 1 бар (баростат Берендсена), траектория составила 10 нс с шагом интегрирования 1 фс.

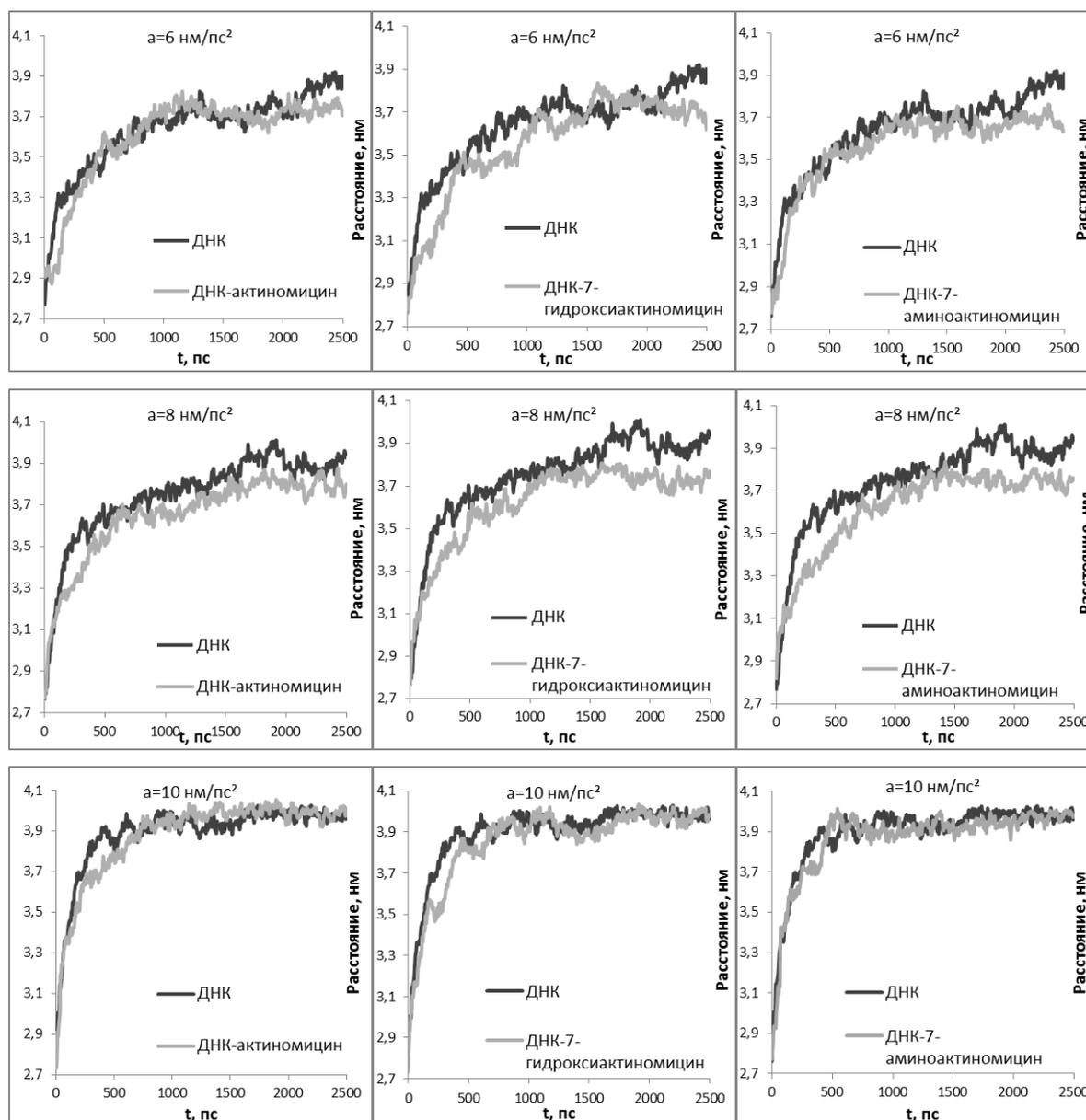
## Полученные результаты

### Влияние актиномицинов на эластичность фрагмента ДНК

Оценка влияния актиномицинов на жесткость фрагмента ДНК производилась путем вычисления модуля Юнга растяжения соответствующего фрагмента нуклеиновой кислоты: сравнивались значения для фрагмента свободной ДНК и соответствующих комплексов ДНК-производное актиномицина.

Относительное удлинение  $\Delta L$  фрагмента цепи ДНК оценивалось по расстоянию между центрами масс пар атомов фосфора второй и девятой нуклеотидных пар (концевые пары нуклеотидов не выбирались так как на 3' –конце фосфат отсутствует).

Полученные графики зависимости расстояния между центрами масс концевых пар атомов фосфора в расчетах актиномицин-ДНК/7-гидроксиактиномицин-ДНК/7-аминоактиномицин-ДНК/ДНК приведены на рисунке 51, результаты расчетов модуля Юнга для свободной ДНК и ДНК в комплексах с производными актиномицина приведены в таблице 7, полученные значения указаны со стандартным отклонением рассчитанной величины.



**Рисунок 51. Графики зависимости расстояния между центрами масс концевых пар атомов фосфора при соответствующих ускорениях для ДНК и комплексов ДНК-актиномицин , ДНК-7-гидроксиактиномицин, ДНК-7-амино-актиномицин [Волох с соавт., 2015].**

**Таблица 7. Значения модуля Юнга для ДНК и комплексов ДНК-актиномицин, ДНК-7-гидроксиактиномицин, ДНК-7-аминоактиномицин.**

Модуль Юнга, Е, Па			
ДНК	ДНК-актиномицин	ДНК-7-гидроксиактиномицин	ДНК-7-аминоактиномицин
$1.0 \times 10^9$	$1.9 \times 10^9$	$2.4 \times 10^9$	$2.7 \times 10^9$

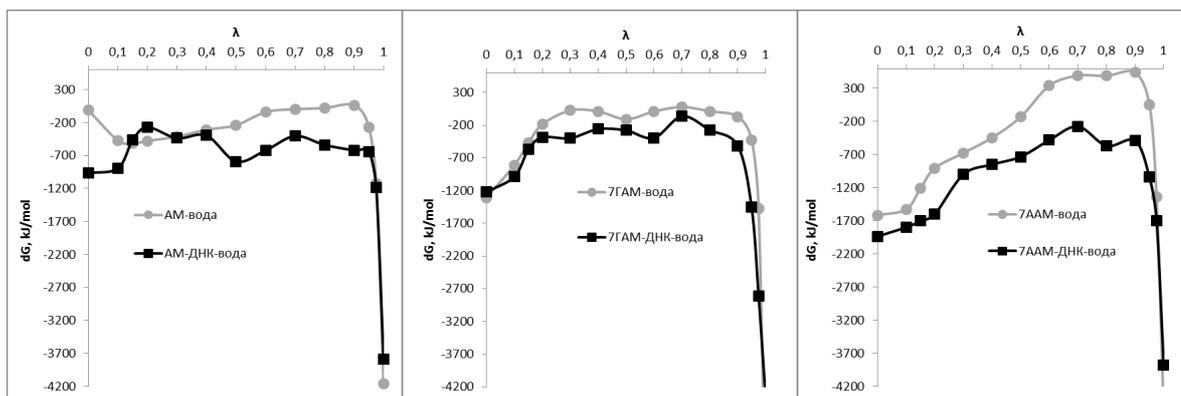
Как видно из полученных графиков (рисунок 51), антибиотики актиномицинового ряда влияют на жесткость фрагмента нуклеиновой кислоты на траекториях растяжения до 1 нс (нуклеиновая кислота с антибиотиком растягивается медленнее на соответствующих временах) в зависимости от приложенной силы. О большей жесткости комплекса ДНК-актиномицин говорит так же большее значение модуля Юнга по сравнению с ДНК без антибиотика (Таблица 7). После 1.5 нс различия в поведении структур практически исчезают, что может быть связано с уменьшением стэкинг – взаимодействий и увеличением расстояния между теми парами нуклеотидов, где есть вставка антибиотика (3я и 4я пары).

На основании полученных данных можно расположить производные актиномицина в ряду увеличения влияния на жесткость ДНК: актиномицин, 7-гидроксиактиномицин и 7-аминоактиномицин. Связывание ДНК с данными лигандами делают структуру фрагмента нуклеиновой кислоты более жесткой, что может быть обусловлено стэкинг-взаимодействиями феноксазиновой группировки с парами параллельных азотистых оснований в цепи ДНК, а так же образованием дополнительных водородных связей вводимыми заместителями в 7 положении феноксазиновой группировки. Результат подтверждается большим значением модуля Юнга для более жесткой структуры – комплекса нуклеиновой кислоты и антибиотика 7-аминоактиномицина. Также, при сравнении групп графиков, полученных для различных производных, видно, что 7-аминоактиномицин стабилизирует ДНК сильнее, чем его аналоги актиномицин и 7-гидроксиактиномицин (ускорение  $8 \text{ нм/пс}^2$ ). В ряду повышения модуля Юнга фрагмента ДНК промежуточное значение занимает комплекс ДНК-7-гидроксиактиномицин, располагаясь между комплексами ДНК-актиномицин и ДНК-7-аминоактиномицин. Об аналогичной тенденции поведения ДНК-актиномициновых комплексов (сравнение актиномицина Д и аминоактиномицина Д) так же говорится в литературе [Sobell, 1985].

Совпадение порядков величин расчетных данных с экспериментальными [Cocco et al., 2002; Marco&Cocco, 2003; Bloom, 2008], а также относительная корреляция результатов расчетов с литературой [Sobell, 1985] свидетельствуют в пользу адекватности МД моделей комплексов ДНК-лиганд (производные актиномицина) и информативности использованного подхода, что может позволить использовать данный подход для исследований других объектов ДНК.

#### Оценка свободной энергии связывания ДНК с лигандами-производными актиномицина

Оценка свободной энергии связывания ДНК с производными актиномицина производилась с использованием метода «термодинамического интегрирования». Полученные из молекулярно-динамических расчетов зависимости  $\langle \partial H / \partial \lambda \rangle$  (эквивалентная зависимости  $\langle \partial G / \partial \lambda \rangle$ ) от  $\lambda$  для каждого из антибиотиков приведены на рисунке 52.



**Рисунок 52.** Результаты расчета свободной энергии комплекса ДНК-антибиотик методом термодинамического интегрирования. Зависимость  $dG/d\lambda$  от  $\lambda$  для систем различных систем: 1 - АМ-вода и АМ-ДНК-вода. 2 - 7-гидроксиАМ-вода и 7-гидроксиАМ-ДНК-вода. 3 - 7-аминоАМ-вода и 7-аминоАМ-ДНК-вода [Волох с соавт., 2015].

**Таблица 8.** Рассчитанные свободные энергии связывания ДНК-лиганд, указаны значения стандартного отклонения величин.

Лиганд	$\Delta G(\text{ab-H}_2\text{O})$ , кДж/моль	$\Delta G(\text{ab-DNA-H}_2\text{O})$ , кДж/моль	$\Delta G(\text{ab-DNA})$ , кДж/моль
Актиномицин	-477( $\pm 0.02$ )	-549 ( $\pm 0.02$ )	-72( $\pm 0.04$ )
7-гидроксиактиномицин	-448( $\pm 0.01$ )	-562( $\pm 0.02$ )	-114( $\pm 0.03$ )
7-аминоактиномицин	-518( $\pm 0.04$ )	-647( $\pm 0.02$ )	-129( $\pm 0.06$ )

В результате расчетов были получены следующие значения для деформационной свободной энергии комплексов антибиотик-ДНК (таблица 8), составляющие порядка 100 кДж/моль, что говорит о практически необратимом связывании актиномицина и его производных с рассматриваемым участком ДНК.

Наибольшее значение свободной энергии было получено для немодифицированной формы антибиотика  $\Delta G(\text{АМ-ДНК}) = -72(\pm 0.04)$  кДж/моль. Следующим по величине было значение свободной энергии для гидрокси – замещенной формы АМ:  $\Delta G(7\text{-гидроксиАМ-ДНК}) = -114(\pm 0.03)$  кДж/моль. Наименьшим среди сравниваемых энергий было значение, полученное для амино – замещенной формы АМ:  $\Delta G(7\text{-аминоАМ-ДНК}) = -129(\pm 0.06)$  кДж/моль. Указанные погрешности учитывают стандартное отклонение величин.

Основываясь на полученных данных можно рассчитать вклад заместителей в 7 положении феноксазиновой группировки по сравнению с водородом в данном положении (таблица 9).

**Таблица 9. Энергетические вклады заместителей актиномицина в 7 положении в рассчитанную свободную энергию связывания.**

Вклад NH <sub>2</sub> - группы	-57(±0.1) кДж/моль
Вклад OH- группы	-42 (±0.07) кДж/моль

### Обсуждение и заключение

В исследованных случаях растяжения молекулы ДНК наличие производного актиномицина, встроенного в структуру фрагмента ДНК, приводит к увеличению жесткости фрагмента цепи. Согласно поставленным вычислительным экспериментам, фрагмент молекулы ДНК без антибиотика растягивался быстрее, чем та же структура с молекулой актиномицина и его аналога соответственно. Рассчитанные значения модуля Юнга для ДНК по порядку величины хорошо согласуются с экспериментальными данными (порядка  $10^9$  Па) [Cocco et al., 2002; Marco&Cocco, 2003; Bloom, 2008]. Увеличение жесткости ДНК при связывании ее с антибиотиками подтверждает предположение о возможной стабилизации структуры за счет стэкинг-взаимодействий и формирования дополнительных связей вводимыми заместителями. Большая стабилизация наблюдается для аминокзамещенной формы антибиотика, что можно объяснить способностью NH<sub>2</sub>-группировки образовывать дополнительную водородную связь.

Из полученных в вычислительном эксперименте по расчету свободной энергии данных видно, что свободная энергия связывания 7-аминоактиномицина с ДНК ниже, чем у гидроксизамещенного аналога и немодифицированной молекулы АМ. Большой вклад аминогруппы по сравнению с гидроксилем может быть обусловлен более низкой энергией образованных водородных связей. Полученные результаты качественно коррелируют с экспериментальными (сообщается [Sengupta et al., 1982], что наилучшие результаты по связыванию антибиотик - ДНК достигались так же в опытах с 7-аминоактиномицином), кроме того при пересчете константы связывания для актиномицина с ДНК наблюдается совпадения порядка величины с рассчитанной соответствующей свободной энергии [Ciolkowski et al., 2000; Paramanathan T. et al. 2012,].

Анализ полученных в двух описанных вычислительных экспериментах данных может позволить сделать вывод о том, что использованная методика позволяет получить качественную картину по оценке деформационной свободной энергии связывания, так как он не позволяет рассчитать энергию водородных связей и диполь-дипольных взаимодействий. Однако использование метода термодинамического интегрирования позволяет уменьшить время симуляции, получив качественно верную картину.

Полученные данные, их качественная и частично порядковая корреляция с экспериментальными данными могут свидетельствовать в пользу адекватности исследованных подходов и информативности использованных методов. Таким образом апробированные методики могут быть оптимизированы и использованы для расчета более сложных вариантов комплексов ДНК-лиганд, а так же для других расчетных задач по оценке механических свойств ДНК. В данной диссертационной работе апробированная методика оценки модуля Юнга ДНК была использована оценки влияния введения одностороннего разрыва на эластичность ДНК.

## Приложение 2

Нуклеотидная последовательность плазмиды со встроенной НПП 603 и односторонним разрывом в положении (+12) НПП.

pTZ57R-(+12\_603)

Длина 3170 пн.

Длина встройки 282 пн.

...GGATCC... – вставка

...TCTCCG... – НПП

CCGGGATCCAGATCCCGAAAATTTATCAAAAAGAGTATTGACTTAAAGTCTAACCTA  
TAGGATACTTACAGCCATCGAGAGGGACACGGCGAAAAGCCAACCCAAGCGACACC  
GGCACTGGGGCCCGGTGTCTCCGCCCGCTGCCAGTGAAATCGTCACTCGGGCTT  
CTAAGTACGCTTAGCGCACGGTAGAGCGCAATCCAAGGCTAACCACCGTGCATCGA  
TGTTGAAAGAGGCCCTCCGTCCTGAATTCTTCAAGTCCCTGGGGTACGGATCCGACG  
AATCGGATCCCGGGCCCGTCGACTGCAGAGGCCTGCATGCAAGCTTTCCTATAGTGAGT  
CGTATTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCT  
CACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAAT  
GAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCT  
GTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGG  
GCGCTCTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCG  
GTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGG  
AAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTG  
CTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGT  
CAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTC  
CCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTT  
CGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTTCGT  
TCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCC  
GGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCC  
ACTGGTAAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTG  
GTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCC  
AGTTACCTTCGGAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAACCACCGCTGGTAG  
CGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGA

TCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATT  
TTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTT  
TTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCA  
GTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGT  
CGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACC  
GCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGG  
CCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCG  
GGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTAC  
AGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGA  
TCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTT  
CCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTG  
CATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAA  
CCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATAC  
GGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTT  
CGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTC  
GTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAC  
AGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTC  
ATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGAT  
ACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAA  
AAGTGCCACCTGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGC  
GCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTC  
CTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGG  
TTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACCTTGATTAGGGTGATGGTTCAC  
GTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTT  
TAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTT  
GATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAA  
AAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGCTTACAATTTCCATTTCGCCATTCAGGCT  
GCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAA  
AGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCCAGGACG  
TTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTAC CTCGCGAATGCATCTAGATT