

**А. В. Сиволоб, К. С. Афанасьєва**

**Молекулярна організація хромосом**

УДК 577.32

Рецензенти:

д-р біол. наук, проф., чл.-кор. НАН України В.М. Кавсан  
(Інститут молекулярної біології і генетики НАН України);

д-р біол. наук, проф., чл.-кор. НАН України С.О. Костерін  
(Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України);

д-р біол. наук, проф., чл.-кор. НАН України А.В. Риндич  
(Інститут молекулярної біології і генетики НАН України)

Сиволоб А.В., Афанасьєва К.С. Молекулярна організація хромосом

Викладено сучасні уявлення про структурно-функціональну організацію еукаріотичних хромосом. Описано білки хроматину, структуру та структурну динаміку інтерфазного хроматину на різних рівнях його організації, зміни хроматину при активації транскрипції, механізми інактивації транскрипції та епігенетичної спадковості в складі гетерохроматину, механізми реплікації ДНК, компактизації та сегрегації хромосом під час мітозу. Розглянуто також структурне розмаїття еукаріотичних хромосом та їх перетворення в процесі еволюції.

Для студентів біологічних факультетів університетів, а також для аспірантів та науковців, які цікавляться молекулярною біологією та генетикою.

Іл. 131. Бібліогр.: 239.

## ЗМІСТ

## Вступ

1. Еукаріотична хромосома: загальний огляд
2. Структурні білки хроматину
  - 2.1. Корові гістони
    - 2.1.1. Структура корових гістонів
    - 2.1.2. Гістонові комплекси
    - 2.1.3. Варіанти корових гістонів
  - 2.2. Лінкерний гістон H1
  - 2.3. Посттрансляційні модифікації гістонів
    - 2.3.1. Ацетилювання
    - 2.3.2. Метилування
    - 2.3.3. Фосфорилування
    - 2.3.4. Убіквітинування
    - 2.3.5. Полі(ADP)-рибозилування
    - 2.3.6. Гістоновий код
  - 2.4. Білки HMG
    - 2.4.1. HMGA
    - 2.4.2. HMGB
    - 2.4.3. HMGN
3. Нуклеосома
  - 3.1. Структура нуклеосоми
    - 3.1.1. ДНК-гістонові взаємодії та просторова організація нуклеосоми
    - 3.1.2. Структура ДНК у нуклеосомі
  - 3.2. Механізми стабілізації нуклеосоми
  - 3.3. Конформаційна рухливість нуклеосоми
    - 3.3.1. Тимчасове розгортання кінцевих ділянок нуклеосомної ДНК
    - 3.3.2. Конформаційна рухливість нуклеосоми в циркулярних ДНК
    - 3.3.3. Зміна хіральності нуклеосоми: реверсома
  - 3.4. Варіабельність нуклеосомних частинок у хроматині
4. Наднуклеосомна організація інтерфазного хроматину
  - 4.1. Позиціонування нуклеосом
  - 4.2. Структура та динаміка хроматинової фібрили

- 4.3. Хроматинова фібрила у клітинному ядрі
- 5. Функціональні процеси в інтерфазному хроматині
  - 5.1. Механізми транскрипції в еукаріотів: загальний огляд
    - 5.1.1. РНК-полімераза та її робочий цикл
    - 5.1.2. Базальні фактори транскрипції
    - 5.1.3. Структурна організація транскрипційної системи у клітинному ядрі
    - 5.1.4. Промотори
    - 5.1.5. Енхансери
    - 5.1.6. Регуляція транскрипції
      - 5.1.6.1. мікроРНК
      - 5.1.6.2. Транскрипційні фактори
      - 5.1.6.3. Зміни в хроматині та регуляція транскрипції
  - 5.2. Ремоделювання промоторів
  - 5.3. Комплекси ремоделювання хроматину
  - 5.4. Елонгація транскрипції у хроматині
  - 5.5. Конститутивна репресія транскрипції: гетерохроматин
    - 5.5.1. Теломера і субтеломерний гетерохроматин
    - 5.5.2. HP1-залежна система репресії
    - 5.5.3. Метилування ДНК
  - 5.6. Реплікація ДНК у хроматині
- 6. Мітотична хромосома
  - 6.1. Білкові компоненти мітотичної хромосоми
    - 6.1.1. Модифікації гістонів, що супроводжують компактизацію хромосом
    - 6.1.2. Топоізомераза II
    - 6.1.3. Білки SMC
    - 6.1.4. Конденсини
    - 6.1.5. Когезини
  - 6.2. Іонні взаємодії у мітотичній хромосомі
  - 6.3. Механічні властивості мітотичної хромосоми
  - 6.4. Моделі структури мітотичної хромосоми
- 7. Сегрегація мітотичних хромосом
  - 7.1. Структура центромери

- 7.1.1. Центромерна ДНК
- 7.1.2. Механізм визначення центромери та структура центромерного хроматину
- 7.2. Структура кінетохору
- 7.3. Веретено поділу
  - 7.3.1. Полімеризація мікротрубочок веретена поділу
  - 7.3.2. Взаємодія мікротрубочок з кінетохором
- 7.4. Розділення хромосом і система контролю збірки веретена поділу
- 7.5. Завершення процесу сегрегації хромосом
- 8. Різноманітність хромосом
  - 8.1. Еволюція каріотипів
    - 8.1.1. Методи аналізу каріотипів
    - 8.1.2. Загальні механізми еволюції каріотипів
    - 8.1.3. Статеві хромосоми та їх еволюція
  - 8.2. Особливі типи хромосом
    - 8.2.1. Мейотичні хромосоми
    - 8.2.2. Політенні хромосоми
    - 8.2.3. В-хромосоми
    - 8.2.4. Хромосоми дріжджів, що брунькуються
    - 8.2.5. Хромосоми інфузорій
  - 8.3. Хромосоми прокаріотів

## Вступ

Загальна довжина ДНК в ядрі клітини, наприклад, ссавців – близько 2 м. Така кількість ДНК в еукаріотичних клітинах вимагає її щільної упаковки, яка, з одного боку, пригнічує функціональні активності у значній частині геному, а з іншого – дозволяє здійснювати такі активності у певних ділянках у певні моменти часу. Ці альтернативні завдання вирішуються завдяки тому, що молекули ДНК існують в клітинному ядрі у вигляді складних та динамічних нуклеопротейнових комплексів – хромосом.

Хромосоми (від грецького *χρῶμα* і *σῶμα*) – "забарвлені тільця" – були вперше описані у клітинах, що діляться, у XIX столітті. Після того, як Морганом (Thomas Hunt Morgan) на початку минулого століття була сформульована хромосомна теорія спадковості, ці тільця стали центральним об'єктом у генетиці. А після відкриття у 70-х роках минулого століття нуклеосомної організації хроматину (нуклеопротейнового "матеріалу", з якого побудовані хромосоми) хромосома – один з контрапунктів сучасної молекулярної біології, в якому сходяться такі різноманітні "теми" як структура ДНК і білків, механізми білково-нуклеїнових взаємодій, регуляція транскрипції та реплікації, репарації і рекомбінації ДНК, молекулярні механізми сегрегації генетичного матеріалу при клітинному поділі та багато інших.

Мета цієї книги – ознайомити студентів біологічних факультетів із сучасними уявленнями про молекулярну організацію хромосом на різних стадіях клітинного циклу. Книга передбачає попереднє знайомство читача з основами цитології, біохімії, генетики та молекулярної біології. Основна увага приділяється структурним аспектам та впливу структури хромосом на їхню функціональну активність.

У першому розділі представлено загальний огляд принципів структурної організації хромосом: вводяться основні поняття, зміст яких більш детально розглядається у наступних розділах. Розділ 2 присвячено основним білкам хроматину, які

визначають структурну організацію ДНК у його складі. У розділі 3 розглядається будова та конформаційна рухливість базової структурної одиниці хроматину – нуклеосоми, у розділі 4 – організація хроматину на наднуклеосомних рівнях. Розділ 5 присвячено механізмам головних функціональних процесів, що відбуваються в хроматині, – транскрипції та реплікації. У розділах 6 і 7 описуються молекулярні механізми надкомпактизації хромосом та їхнього розходження до дочірніх клітин у процесі клітинного поділу. Останній розділ присвячено розмаїттю структурних та морфологічних типів еукаріотичних хромосом та питанням їхнього еволюційного перетворення.

З метою полегшення сприйняття кількість посилань на оригінальні роботи в тексті зведена до мінімуму. Перелік рекомендованої літератури наведено наприкінці кожного розділу, при цьому зазначено конкретне коло питань, до якого відносяться певні джерела. Перелік літератури, наведений наприкінці першого розділу, є загальним до матеріалу книги в цілому.

Атомні координати структур макромолекул, якими проілюстровано книгу, отримано з Банку даних білкових структур (PDB – Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb/>), коди PDB наведено у підписах до рисунків. Зображення структур створено за допомогою програм PyMOL (DeLano Scientific LLC, США, <http://www.pymol.org/>) та UCSF Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>).

## Розділ 1. Еукаріотична хромосома: загальний огляд

Ядро еукаріотичної клітини відокремлене від цитоплазми ядерною оболонкою, яка складається з двох мембран – зовнішньої та внутрішньої. Зовнішня мембрана формує з мембранами ендоплазматичного ретикулуму спільну мембранну систему. Зовнішня та внутрішня ядерна мембрани у багатьох місцях на поверхні ядра з'єднуються, утворюючи ядерні пори, де розміщені мультимолекулярні порові комплекси, що забезпечують ядерно-цитоплазматичний транспорт. Всередині ядра внутрішню мембрану вистилає *ламiна* – сітка, що утворена білковими філаментами завтовшки близько 10 нм. Філаменти ламіни протягнуті від однієї пори до іншої, визначаючи позиції пор на поверхні ядра та взагалі форму та розмір ядра. Ламіна та ядерна оболонка утворюють єдину структуру, яку називають *ядерним конвертом*.

В ядрі кожної клітини багатоклітинного організму знаходиться кілька (до кількох десятків і навіть сотень) досить довгих лінійних молекул ДНК – набір молекул є ідентичним для усіх клітин. Соматична клітина містить подвійний – диплоїдний – набір молекул ДНК, утворений з двох гаплоїдних наборів батьків при заплідненні. Тобто, молекули ДНК диплоїдного набору представлені парами гомологічних молекул, однаковими за розміром та подібними за нуклеотидною послідовністю. Сукупність послідовностей ДНК у клітинах даного організму називається *геномом*. Під геномом виду розуміють сукупність послідовностей ДНК у гаплоїдному наборі.

Еукаріотичні геноми містять значну кількість ДНК – наприклад, у ссавців, близько  $3 \cdot 10^9$  пар основ у гаплоїдному наборі. Переважна частина цієї ДНК не є кодуючою. Білковим генам еукаріотів (їхня кількість у вищих багатоклітинних є близькою до 20–30 тис.) притаманний мозаїчний принцип будови кодуючої частини: власне кодуюча частина представлена послідовністю окремих змістовних ділянок – *екзонів*, розділених беззмістовними *інтронами*. У ссавців кодуючі послідовності –



екзони – займають лише ~1,5 % геному. Решта припадає на міжгенну ДНК (де містяться також регуляторні ділянки), інтрони (~30 %) і, більше половини генома, – на послідовності, що повторюються (ділянки, представлені багатьма копіями).

Серед повторів зазвичай розрізняють:

- Деякі гени, що представлені кількома (іноді до 1000) копіями.

- Псевдогени – послідовності, що є гомологічними до певних генів, але не експресуються внаслідок мутацій, пошкоджень системи регуляції транскрипції тощо.

- Багатократні повтори коротких послідовностей (тандемні повтори), частина яких розподілена по всьому геному, але більшість – зосереджена в окремих особливих зонах (див. нижче).

- Інтерсперсні (мобільні) елементи, здатні до переміщення і розмноження в межах геному (або ділянки, які були здатні до переміщення в минулому, а після втрати такої активності просто залишились у геномі). Мобільні елементи займають значну частину еукаріотичного геному (від 30 до 50 %), але розподілені нерівномірно: є довгі ділянки, що на 90% представлені мобільними елементами, і такі зони, де інтерсперсні елементи відсутні.

Кожна молекула ДНК, що знаходиться у клітинному ядрі, має особливу **центромерну ділянку**, що розділяє молекулу на два плеча різної довжини. Плечі позначають латинськими літерами р (коротке плече) та q (довге плече). Довжина центромерної ділянки варіює від 125 пар основ у дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* до 0,1–4 млн пар основ у людини. Найчастіше послідовність ДНК в цій зоні представлена тандемними АТ-збагаченими повторами і не містить активних генів. На обох кінцях кожної молекули ДНК знаходиться ще одна особлива зона – **теломерна**, що складається з коротких елементів послідовності (у хребетних та більшості вищих рослин – ТTAGGG), що повторюються багато разів. Довжина теломерної ділянки варіює у різних організмів (наприклад, у миші більше 30 тис пар основ, у людини 10–15 тис пар основ). Ще одна особлива ділянка ДНК деяких хромосом – **ядерцевий**

**організатор** – містить кластер генів рибосомної РНК, що тандемно повторюється від 100 до 1000 разів. Кожний кластер представлений трьома генами рРНК – 18S, 5,8S та 28S – і має довжину приблизно 11 тис пар основ. В інтерфазному ядрі ядерцеві організатори кількох різних хромосом розташовуються поруч і формують щільну структуру, яка називається **ядерцем**. До складу ядерця входять також транскрипти генів рРНК, рибосомні білки та велика кількість інших білків (до 700 у людини) – ядерце є "фабрикою", де відбувається синтез рибосомних РНК і збірка рибосомних субодиниць.

Типова довжина однієї молекули ДНК у клітинному ядрі – кілька сантиметрів (наприклад, у людини, середня довжина дорівнює ~5 см, найдовша молекула – майже 10 см). Зрозуміло, що полімери такої довжини мають бути компактизовані всередині ядра, яке має мікронні розміри, – молекули ДНК існують у ядрі не самі по собі, а у вигляді комплексів з білками. Розміщений в клітинному ядрі нуклеопротейіновий комплекс, до складу якого входить *одна* молекула ДНК та білки певних типів, називають **хромосомою**. Нуклеопротейіновий матеріал, з якого побудовані хромосоми, називають **хроматином**. Організація хроматину відрізняється наявністю ієрархії кількох структурних рівнів.

Головними структурними білками хроматину є **гістони** – білки двох класів, збагачені на позитивно заряджені амінокислотні залишки (загальна маса гістонів приблизно дорівнює масі ДНК). Крім гістонів до складу хроматину входять також численні негістонові білки (загальна маса яких приблизно дорівнює масі гістонів) – транскрипційні фактори, різноманітні ферменти, білки, що виконують специфічну структурну роль, тощо. На першому рівні структурної організації хроматину ДНК формує за рахунок взаємодії з **коровими гістонами** (перший клас гістонів) елементарні утворення – **нуклеосоми**. Білковий компонент нуклеосоми (кор) складається з 8 молекул корових гістонів H2A, H2B, H3 та H4 – по дві молекули кожного типу. Октамерний комплекс гістонів має на своїй поверхні своєрідний трек позитивно заряджених амінокислотних залишків, який використовується для взаємодії з нуклеосомною ДНК довжиною

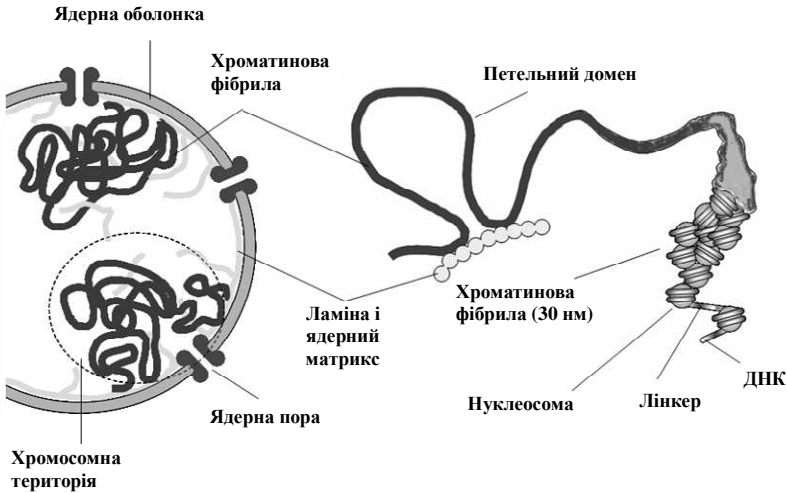
145–147 пар основ: ДНК формує на поверхні октамера ~1,7 витка лівої суперспіралі (рис. 1, кольор. вст.).

Нуклеосоми утворюються вздовж усієї ДНК хроматину із середньою щільністю 1 нуклеосома на ~200 пар основ, сусідні нуклеосоми з'єднані міжнуклеосомними *лінкерними* ділянками. Нуклеосомна ДНК + лінкерна ділянка складають так званий *нуклеосомний повтор*, довжина якого варіює як уздовж полінуклеосомного ланцюга, так і в залежності від функціонального стану, типу клітин тощо. Характер розподілу нуклеосом уздовж геномної ДНК має важливе функціональне значення: зрозуміло, що лінкерна ДНК є більш доступною для зовнішніх регуляторних впливів.

Як показано на рис. 1, кольор. вст., кінцеві невпорядковані ділянки корових гістонів (хвости) виходять за межі нуклеосоми. Завдяки своїй структурній лабільності вони беруть участь в організації хроматину на наднуклеосомному рівні, а також відіграють важливу роль платформи для зв'язування різноманітних негістонових білків. Така взаємодія гістонових хвостів з білками має важливі функціональні наслідки для регуляції генної активності і залежить від численних посттрансляційних модифікацій хвостів.

З нуклеосомами в хроматині взаємодіють (не більше однієї молекули на нуклеосому) *лінкерні гістони* (другий клас гістонів, представлений гістоном H1 та його варіантами). Ця взаємодія додатково стабілізує нуклеосому та забезпечує "докручування" нуклеосомної ДНК приблизно до двох повних витків. Частинку, що складається з октамеру корових гістонів, однієї молекули гістона H1 та ДНК довжиною 160–180 пар основ, називають *хроматосомою*. За рахунок взаємодії з ДНК невпорядкованих хвостів корових гістонів та лінкерних гістонів полінуклеосомна нитка конденсується із утворенням на другому рівні компактизації хроматину (рис. 1.1) так званої *фібрили 30 нм* (мається на увазі приблизний діаметр). На кожні 11 нм уздовж такої фібрили припадає зазвичай 11 нуклеосом. Таким чином, загальна довжина фібрили суттєво скорочується у порівнянні з контурною довжиною ДНК в її складі – до кількох сотень мікронів.

Фібрила 30 нм є основною формою існування хроматину та хромосом під час інтерфази – між клітинними поділами (див. нижче), тобто тоді, коли на ДНК відбуваються всі функціональні процеси. Але у хроматині існує значна гетерогенність за ступенем конденсації. З одного боку, передумовою активації окремих ділянок хроматину є часткова тимчасова деконденсація фібрили. Така структурна динаміка на рівні стабільності хроматинової фібрили, а також окремих нуклеосом, є найважливішим шляхом регуляції транскрипційної активності. З іншого боку, у репресованих ділянках хроматинова фібрила може бути як додатково стабілізованою у компактному стані, так і піддаватися компактизації більш високого порядку. Частина хроматину, що зберігає стан підвищеної компактизації протягом інтерфази, називається *гетерохроматином* (решта хроматину, де в принципі може відбуватися активація транскрипції, позначається як *еухроматин*). Гетерохроматинові зони було описано у цитологічних дослідженнях ще в 1928 році як зони клітинного ядра, що інтенсивно забарвлюються основними барвниками, і, відповідно, характеризуються підвищеною компактністю. Сьогодні під гетерохроматином частіше розуміють репресовані ділянки ДНК, де значно пригнічена транскрипція. Утворення гетерохроматину відбувається, в першу чергу, у ділянках, що містять повтори – у центромерних, теломерних та суміжних прицентромерних і субтеломерних ділянках, зонах концентрації мобільних елементів (*конститутивний* гетерохроматин), а також у специфічних для даного типу клітин геномних зонах, де забезпечується гарантована репресія генної активності (*факультативний* гетерохроматин). Додаткова компактизація гетерохроматину забезпечується особливими білками. Специфічні білки рекрутуються і до зазначених вище особливих зон хромосомної ДНК: комплекс таких білків та теломерної ДНК на кінцях хромосоми називають *теломерою*, а білково-нуклеїновий комплекс, що утворюється на центромерній ділянці, – *центромерою*.



**Рис. 1.1.** Рівні структурної організації хроматину в інтерфазному ядрі.

На наступному рівні структурної організації хроматинова фібрила (принаймні її частина) формує петлі, кінці яких є жорстко закріпленими на **ядерному матриксі** – білкових скелетних філаментах ядра (рис. 1.1). Деякі петельні домени не є чітко детермінованими – петля в певній ділянці хроматину може утворюватись тільки в клітинах певного типу і бути постійною або виникати тимчасово у відповідь на регуляторні сигнали. Питання про те, наскільки розвинутою є мережа філаментів внутрішнього матриксу залишається недостатньо з'ясованим – можливо, ця мережа пронизує увесь простір ядра, можливо – являє собою лише окремі порівняно короткі білкові філаменти. Частина таких філаментів протягується всередину ядра від периферійної частини матриксу – ламіни, існування якої та її роль у підтриманні цілісності ядра, а також взаємодія з нею петельних домів хроматину, не викликають сумніву.

На ламіні фіксується значна частина гетерохроматину, зокрема центромери та теломери хромосом. Еухроматинова

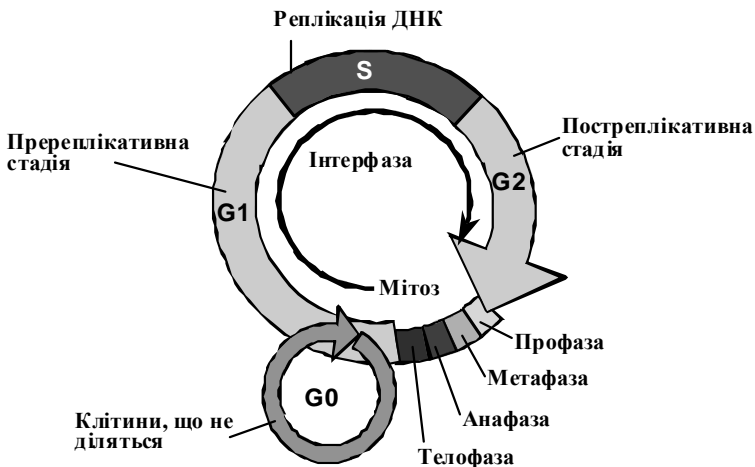
частина хромосоми “звішується” всередину ядра, де, можливо, взаємодіє з елементами внутрішнього матриксу. В результаті хромосома у вигляді хроматинової фібрили, вздовж якої чергуються еу- та гетерохроматинові ділянки, займає певну більш-менш чітко визначену зону в об’ємі ядра – **хромосомну територію**.

У деяких клітинах (різноманітні тканини личинок комах, клітини трофобласту у ссавців, клітини зародкового міхура у рослин тощо) присутні хромосоми особливого типу, які є виключенням зі сформульованого вище визначення хромосоми – вони містять не одну, а кілька сотень або навіть тисяч ідентичних молекул ДНК (і, відповідно, хроматинових фібрил 30 нм, зв’язаних між собою по всій довжині). Ці молекули ДНК накопичуються в результаті багаторазової реплікації без наступних клітинних поділів. Такі хромосоми, що їх називають **політенними**, мають гігантські розміри і є видимими в оптичний мікроскоп постійно. Біологічна роль політенії ймовірно пов’язана з високою метаболічною активністю певних клітин.

У переважній більшості еукаріотичних клітин в процесі підготовки до клітинного поділу відбувається однократна реплікація ДНК і, відповідно, подвоєння диплоїдного набору хромосом. Взагалі всі клітини багатоклітинного організму в процесі свого розвитку проходять ряд послідовних стадій – клітинних циклів – від одного поділу до іншого. Клітинний цикл складається з двох великих періодів – **інтерфази** (періоду між двома поділами) та власне поділу (**мітозу**). Інтерфаза, в свою чергу, поділяється на 3 фази – **пресинтетичну** (G1, від англ. gap – проміжок), **синтетичну** (S) та **постсинтетичну** (G2) (рис. 1.2).

Кожна стадія інтерфази характеризується певним набором подій, які необхідні для того, щоб клітина вступила до поділу: фактично, для клітин, які активно діляться, інтерфаза – період постійної підготовки до поділу. Ключовим моментом при цьому є подвоєння молекул ДНК для того, щоб при поділі кожна дочірня клітина отримала по одному диплоїдному набору хромосом. Власне процес реплікації ДНК відбувається під час S-

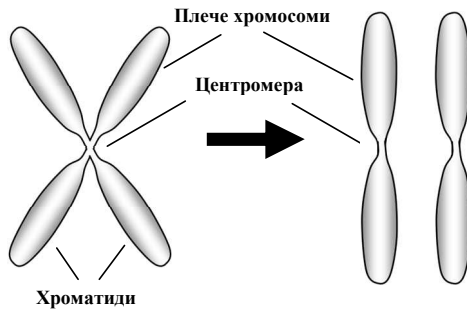
фази і триває в середньому 10–12 годин. Синтез усіх білків, необхідних для цього процесу, відбувається в G1-фазі (синтез гістонів – одночасно з реплікацією в S-фазі). Під час G2-фази синтезуються і накопичуються усі елементи, необхідні для клітинного поділу. Мітоз розділяють на чотири етапи (профаза, метафаза, анафаза, телофаза), у процесі яких відбувається **каріокінез** (поділ ядра) та **цитокінез** (наприкінці телофази – поділ цитоплазми з утворенням двох дочірніх клітин). Клітини, які остаточно диференційовані і більше не вступають до поділу, виходять із циклічного процесу і знаходяться на стадії G0 (саме на цій стадії усі клітини багатоклітинного організму виконують притаманні їм функції). Стадія G0 закінчується, як правило, програмованою загибеллю клітини. У процесі розвитку статевих клітин останній клітинний цикл закінчується не мітозом, а **мейозом** – клітинним поділом, в результаті якого утворюються чотири клітини з гаплоїдними наборами хромосом.



**Рис. 1.2.** Схема клітинного циклу.

Отже, в процесі реплікації ДНК під час S-фази кожна хромосома (у стані хроматинової фібрили) перетворюється на дві ідентичні дочірні хромосоми, які залишаються зв'язаними між собою за рахунок білок-білкових взаємодій. Після цього у

профазі мітозу за участі особливих білків починається надкомпактизація хромосом: компактні мітотичні хромосоми мають зазвичай витягнуту форму в середньому довжиною порядку кількох мікронів (іноді до 50 мкм) та діаметром близько 1 мкм, і стають видимими в оптичний мікроскоп (ядерце при цьому, навпаки, зникає). Єдине значення процесу надкомпактизації хромосом полягає в тому, щоб забезпечити швидке переміщення хромосом у процесі клітинного поділу – надкомпактна мітотична хромосома, ДНК у складі якої є функціонально неактивною, являє собою щільно упаковану “порцію” спадкової інформації. Одночасно з компактизацією хроматинової фібрили “розчиняється” ядерний конверт.



**Рис. 1.3.** Схема морфології мітотичних хромосом до (ліворуч) та після (праворуч) розходження хроматид (дочірніх хромосом).

Характерною морфологічною ознакою мітотичної хромосоми є так звана первинна перетяжка, що утворюється в зоні центромери (рис. 1.3). Центромера є ділянкою хромосоми, на якій відбувається утворення складного мультибілкового комплексу – *кінетохору*, необхідного для прикріплення мікротрубочок веретена поділу. В залежності від розміщення центромери хромосоми розподіляють на три типи: *метацентричні* (два плеча приблизно однакові за довжиною); *субметацентричні* (плечі суттєво розрізняються за довжиною); *ахроцентричні* (коротке плече є настільки маленьким, що під мікроскопом його не помітно взагалі). Хромосоми, що містять



ядерцевий організатор, мають також так звану *вторинну перетяжку* в місці його локалізації. Сукупність морфологічних ознак, за якими можна охарактеризувати набір мітотичних хромосом організму називають *каріотипом* (рис. 1.4). Особливості каріотипу – кількість, розмір та морфологія хромосом – є паспортною характеристикою даного біологічного виду.



**Рис. 1.4.** Хромосоми людини на стадії метафази – кожна хромосома представлена двома хроматидами, з'єднаними в області центромер. Фото люб'язно предоставлено С. Р. Рушковським.

На перших стадіях мітозу зберігається зв'язок між дочірніми хромосомами в зоні центромер за допомогою спеціальних білків. Саме у такому надкомпактному стані хромосоми були відкриті та вперше описані, при цьому вважалося, що хромосома складається з двох половин – *хроматид*. Цей термін широко використовується і досі, але слід розуміти, що хроматида – це просто дві копії материнської хромосоми, що утворились унаслідок реплікації ДНК. У процесі мітозу (під час анафази) зв'язок між центромерами руйнується, і веретено поділу забезпечує розходження дочірніх хромосом до полюсів

клітини. У дочірніх клітинах знову формуються ядерні оболонки навкруг хромосом, а хромосоми декомпактизуються – переходять у стан хроматинової фібрили.

### Рекомендована література

*Сиволоб, А.В.* Молекулярна біологія. – К.: Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2008.

*Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J. et al.* Molecular biology of the cell. – N.Y. : Garland Science, 2007.

*Brown T.A.* Genomes. – N.Y. : Garland Science, 2002.

Chromatin structure and gene expression: frontiers in molecular biology / eds. S. Elgin, J.L. Workman. – Oxford : Oxford University Press, 2002.

Chromatin structure and dynamics: state-of-the-art. New Comprehensive Biochemistry / eds. J. Zlatanova, S.H. Leuba. Amsterdam : Elsevier, 2004. – Vol. 39.

*Cook, P.R.* Principles of nuclear structure and function. – N.Y. : Wiley-Liss, 2001.

*Kornberg, R.* Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA // Science. – 1974. –Vol. 184. – P. 868-871.

*Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L.S. et al.* Molecular cell biology. – New York : W.H. Freeman and Company, 2007.

*Samner, A.T.* Chromosomes: organization and function. – Oxford : Blackwell Science, 2003.

*van Holde, K.E.* Chromatin. – N.Y. : Springer-Verlag, 1988.

*Wolffe, A.P.* Chromatin structure and function. – San Diego : Academic Press, 1999.

## Розділ 2. Структурні білки хроматину

Структурна організація хроматину залежить від взаємодії з ДНК білків, що входять до його складу. У цьому розділі розглянуто структуру та властивості загальних неспецифічних білків, які відіграють основну роль в організації нуклеосом та хроматинової фібрили.

### 2.1. Корові гістони

До категорії корових – таких, які визначають структуру нуклеосом – відносяться чотири гістони: H2A, H2B, H3 та H4. Ці білки є одними з найбільш еволюційно консервативних за амінокислотною послідовністю. В той самий час, гістони є мішенями численних посттрансляційних модифікацій, що створює значну гетерогенність у хроматині за різними формами гістонів щодо модифікацій. Крім того, поряд із "канонічними" гістонами (що розглядаються у підпідрозд. 2.1.1), в хроматині всіх еукаріотів існує кілька більш спеціалізованих гістонових варіантів (підпідрозд. 2.1.3)

**2.1.1. Структура корових гістонів.** Амінокислотні послідовності "канонічних" корових гістонів представлено на рис. 3, кольор. вст. Слід відмітити дві загальні характеристики цих послідовностей:

- Гістони відрізняються підвищеним вмістом позитивно заряджених амінокислотних залишків Lys та Arg. У складі гістонів H3 та H4 (так звана аргінін-збагачена група) вміст Arg становить 13,3 та 13,7 % відповідно, Lys – 9,6 та 10,8 %. У складі гістонів H2A та H2B (помірно лізин-збагачені гістони) відповідні відсотки Arg дорівнюють 9,3 та 6,4, Lys – 10,9 та 16. Відношення кількості позитивних залишків до кількості негативних дорівнює для гістонів H2A, H2B, H3 та H4 1,4; 1,7; 1,8 та 2,5 відповідно.

- Амінокислотні залишки різних типів розподілені вздовж ланцюгів нерівномірно – гідрофобні залишки зосереджені в С-кінцевих та центральних частинах молекули, на N-кінцях їх

практично немає (рис. 3, кольор. вст.). Відповідно, в області, де знаходяться гідрофобні залишки, формується глобулярна структура, N-кінцеві ділянки (хвости) довжиною від 15 до 44 амінокислот залишаються неупорядкованими. Гістон H2A має також помітний C-кінцевий хвіст. Неупорядковані хвости збагачені позитивно зарядженими амінокислотами і є субстратами для численних посттрансляційних ковалентних модифікацій.

Позитивно заряджені амінокислотні залишки присутні у досить великій кількості і в глобулярних частинах. На рис. 3, кольор. вст. позначено залишки Arg, котрі відіграють особливу роль – занурюються у маленький жолобок ДНК у нуклеосомі, реалізуючи міцні електростатичні контакти з фосфатами (розділ 3). Глобулярна частина всіх корових гістонів має спільні риси. Вона виглядає як характерний триспіральний гістоновий мотив (histone fold), у якому одна довга  $\alpha$ -спіраль ( $\alpha 2$ ) фланкована двома короткими ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ ), приєднаними до неї петлями L1, L2 (рис. 2, кольор. вст.). Гістон H3 містить також додаткову  $\alpha$ -спіраль з боку N-кінця мотиву ( $\alpha N$ -спіраль), гістон H2B – додаткову  $\alpha C$ -спіраль, дві короткі  $\alpha$ -спіралі знаходяться з двох боків поза гістоновим мотивом у складі гістона H2A. Гістоновий мотив зустрічається також в деяких еукаріотичних факторах транскрипції.

Таким чином, основним типом вторинної структури гістонів є  $\alpha$ -спіралі, невеличкі ділянки  $\beta$ -структури (рис. 3, кольор. вст.) утворюються при взаємодії між гістонами (наступний підпідрозділ). Глобулярні структури індивідуальних корових гістонів, показані на рис. 2, кольор. вст., насправді не існують окремо: гістоновий мотив не формує гідрофобного ядра, заекранованого від розчинника, – значна кількість гідрофобних залишків опиняється на поверхні. Внаслідок цього одна молекула корового гістона не може існувати як окремий глобулярний білок у водному розчині.

**2.1.2. Гістонові комплекси.** Мінімальними стабільними структурними одиницями, які можуть існувати в розчині за фізіологічних умов, є гетеродимери H2A-H2B та H3-H4, які

мають спільну будову – так званий "мотив рукостискання" (handshake motif, рис. 4, кольор. вст.).

Два гістонові мотиви формують у складі димерів щільне гідрофобне ядро: можна сказати, що гістонові димери – це глобулярні білки з четвертинною структурою. Структури димерів стабілізовані в основному гідрофобними взаємодіями між спіралями  $\alpha 2$ – $\alpha 2$  та  $\alpha 1$ – $\alpha 2$  різних молекул. Специфічність утворення гетеродимерів залежить, головним чином, від додаткових взаємодій, що здійснюють із загальним мотивом рукостискання  $\alpha N$ - та  $\alpha C$ -спіралі гістонів H3 та H2B відповідно. У наближених одна до одної петлях L1 та L2 різних молекул у складі димерів утворюються невеличкі елементи міжмолекулярної  $\beta$ -структури (рис. 4, кольор. вст.), які надають петлям конфомаційної жорсткості.

Крім високої спорідненості в парах H3–H4 та H2A–H2B, гістони здатні також і до інших взаємодій між собою: у розчині двох різних гістонів можуть утворюватись менш стабільні комплекси у складі H2B–H4, H3–H3 та H2A–H3, що відображає здатність гістонових гетеродимерів до утворення комплексів більш високого порядку та ієрархію міжгістонових взаємодій у нуклеосомі.

У розчині за фізіологічних умов два гетеродимери H3–H4 взаємодіють між собою за рахунок утворення чотириспірального пучка між спіралями  $\alpha 3$  та C-кінцевими частинами довгих спіралей  $\alpha 2$  гістонових мотивів молекул H3. У результаті формується тетрамер  $(H3-H4)_2$  (рис. 5, кольор. вст.), стабілізований гідрофобними взаємодіями та водневими зв'язками між двома гістонами H3. Структура тетрамера нагадує підкову, яка характеризується хіральністю – утворює елемент лівої спіралі. Вісь симетрії другого порядку тетрамерного комплексу проходить через інтерфейс між двома молекулами H3 (вісь симетрії другого порядку – лінія, обертання навкруг якої на  $180^\circ$  переводить одну частину структури в іншу).

Аналогічний за своєю структурою чотириспіральний пучок між гістоновими мотивами молекул H4 та H2B (рис. 2.1) служить для забезпечення взаємодій між тетрамером  $(H3-H4)_2$  та димером H2A–H2B. Таким чином, "підкова" тетрамера

симетрично продовжується двома димерами H2A-H2B в обидва боки, результатом чого є утворення білкового кора нуклеосоми – октамера (H2A-H2B-H3-H4)<sub>2</sub> (рис. 6, кольор. вст.).

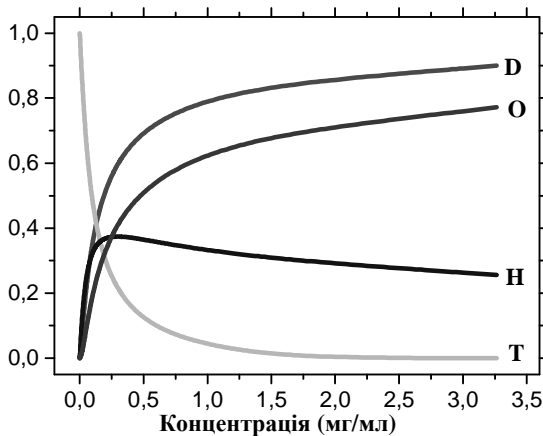


**Рис. 2.1.** Контакт між гістонами H2B та H4 у нуклеосомі (код PDB 1KX5).

Контакт між гістонами H2B та H4, як і контакт H3–H3 у тетрамері (H3-H4)<sub>2</sub>, стабілізується за рахунок гідрофобних взаємодій та водневих зв'язків. Крім того, між гістонами H2B та H4 утворюється кластер із трьох ароматичних залишків Туг, які здійснюють між собою стекінг-взаємодії. На відміну від контакту H3–H3, в області контакту H2B–H4 спостерігається скупчення позитивно-заряджених залишків. Відповідно, взаємодія між димером H2A-H2B та тетрамером (H3-H4)<sub>2</sub> є чутливою до іонної сили, і у відсутності ДНК контакт між димером та тетрамером може бути стабільним тільки за умови нейтралізації зарядів неорганічними аніонами у досить високій концентрації – у 2 М NaCl. За фізіологічних умов роль аніонів беруть на себе фосфатні залишки ДНК – нейтралізація позитивних зарядів гістонів за рахунок взаємодії з ДНК є передумовою утворення октамера гістонів, який, у свою чергу, забезпечує укладання ДНК у нуклеосомі.

Отже, гістоновий октамер складається з трьох структурних блоків: тетрамера (H3-H4)<sub>2</sub> та двох димерів H2A-H2B. Вісім молекул гістонів взаємодіють при цьому у послідовності, що закручена в ліву спіраль: H2A–H2B–H4–H3–H3'–H4'–H2B'–H2A'. Основний внесок у стабілізацію октамера дають контакти між гістонами H2B і H4, але додатково октамер стабілізується за рахунок взаємодій між гістонами H2A–H3' і між двома димерами H2A–H2B. Відповідно, збірка октамера *in vitro* у 2 М

NaCl характеризується позитивною кооперативністю – зв'язування другого димера  $H2A-H2B$  із гексамером  $(H3-H4)_2(H2A-H2B)$  відбувається з підвищеною спорідненістю. За даними ізотермічної калориметрії константа зв'язування першого димера з одним із двох доступних сайтів на тетрамері у 2 М NaCl становить  $2,12 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ , константа зв'язування другого димера з гексамером дорівнює  $9,96 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  – спорідненість підвищується приблизно в п'ять разів. Такі константи означають, що в еквімолярній суміші чотирьох гістонів у 2 М NaCl у відсутності ДНК октамер гістонів присутній у помітній кількості за концентрації білків  $\sim 1 \text{ мг/мл}$ , зниження загальної концентрації зсуває рівновагу в бік комплексів більш низького порядку (рис. 2.2).



**Рис. 2.2.** Частка тетрамера  $(H3-H4)_2$  у вільному стані (Т), у складі гексамера  $(H3-H4)_2(H2A-H2B)$  (Н) і октамера гістонів (О) та частка зв'язаних димерів  $H2A-H2B$  (D) як функція загальної концентрації білка в еквімолярній суміші чотирьох гістонів у 2 М NaCl. За даними Benedict *et al.* (1984).

Наведені значення констант зв'язування димера з тетрамером свідчать про загальну енергію взаємодії між двома типами

гістонових комплексів на рівні 16–17 одиниць  $kT$  (міра кінетичної енергії теплового руху,  $k$  – константа Больцмана,  $T$  – абсолютна температура) або  $\sim 10$  ккал/моль.

**2.1.3. Варіанти корових гістонів.** Основна кількість корових гістонів кодується гістоновими генами, які у всіх організмів зібрані у кластери (по п'ять генів – чотири гени корових гістонів плюс ген лінкерного гістона H1), що тандемно повторюються багато разів. На відміну від більшості інших еукаріотичних генів, гістонові гени характеризуються двома особливостями: вони не містять інтронів, та їхня мРНК не піддається поліаденилуванню на 3'-кінці. Найбільш активна експресія гістонових генів відбувається в S-фазі клітинного циклу – одночасно з реплікацією ДНК, тобто тоді, коли утворюється вдвічі більше нуклеосом на подвоєній кількості ДНК. Узгоджена з реплікацією доставка гістонів до хроматину у вигляді гістонових комплексів здійснюється за допомогою гістонових шаперонів (факторів збірки нуклеосоми) CAF-1 (Chromatin Assembly Factor, складається з трьох субодиниць), який забезпечує доставку гістонів H3 та H4 (у формі гетеродимера), та NAP-1 (Nucleosome Assembly Protein), що відповідає за завантаження у хроматин димера (H2A-H2B). У яйцеклітинах та клітинах зародку хребетних присутні інші гістонові шаперони – нуклеоплазмін (Nr) та N1.

Гени у гістонових кластерах характеризуються певним незначним поліморфізмом, і, відповідно, кодують гістони, що розрізняються кількома амінокислотними замінами. Такі варіанти гістонів називають *гомоморфними*. Наприклад, у людини всі гістонові гени кодують один варіант гістона H4 та, як і у більшості тварин, три варіанти гістона H3 (H3.1, H3.2, H3.3). H3.1 та H3.2 розрізняються однією амінокислотою заміною, H3.3 відрізняється від H3.2 по чотирьох амінокислотних позиціях. Гомоморфні варіанти H2A і H2B у людини розрізняються по десяти позиціях, подібний рівень поліморфізму спостерігається у миші, морського їжака та інших тварин. Частина гістонових генів зберігає активність і поза S-фазою – з метою "підкачки" гістонів у хроматин. Зокрема, це



стосується гістона H3.3, який називають "гістоном підстановки" на відміну від інших гомоморфних варіантів. На варіант H3.3 збагачені транскрипційно активні ділянки – процеси транскрипції викликають тимчасове видалення гістонів, після чого частина цих гістонів замінюється на синтезовані *de novo*. Незалежна від реплікації доставка H3.3 (у складі тетрамера з гістоном H4) забезпечується шапероновим комплексом HIRA.

Крім гомоморфних, у хроматині існують і *гетероморфні* гістонові варіанти – такі, що більш суттєво відрізняються від канонічних гістонів. Відповідні унікальні гени (що не входять до складу гістонових кластерів) містять інтрони, мРНК піддається поліаденилуванню, активність цих генів не залежить від реплікації ДНК. Серед гетероморфних варіантів корових гістонів розрізняють один спеціалізований варіант гістона H3 та кілька – гістона H2A.

**CenH3** – варіант гістона H3, який замінює звичайний H3 у центромерних зонах хромосом (відомий також як CENP-A у ссавців, Cse4 у дріжджів, CID у дрозофіли). Глобулярна частина CenH3 має ~60% гомології з такою звичайного H3, N-кінцеві хвосту двох білків не мають нічого подібного між собою. Більше того, N-кінцевий хвіст CenH3 різних організмів сильно варіює за послідовністю та довжиною – від 27 до 196 амінокислотних залишків. При цьому CenH3 не має специфічної спорідненості до повторів, з яких у багатьох організмів складається центромерна ДНК (і які відрізняються значною варіабельністю нуклеотидних послідовностей у різних видів). Доставка CenH3 в центромерні зони здійснюється завдяки особливим гістоновим шаперонам (розділ 7).

У глобулярній частині CenH3 також спостерігаються певні відмінності від звичайного H3: більш довгою є петля L1, кілька важливих залишків Arg (серед тих, що занурюються у маленький жолобок ДНК, рис. 3, кольор. вст.) замінені іншими амінокислотами. Нуклеосома, що містить CENP-A, відрізняється зниженням стабільності нуклеосомної суперспіралі ДНК на її кінцях – по 7 пар основ на кінцях нуклеосомної ДНК слабко взаємодіють з поверхнею октамера. При цьому сама структура нуклеосоми, реконструйованої *in vitro* за участі CenH3, суттєво

не відрізняється від звичайної. Але *in vivo* у центромерах дрозофіли та людини формуються особливі частинки, що містять гетеротетрамер CenH3-H4-H2A-H2B замість октамера гістонів. Деякі результати свідчать, що ДНК у складі цих частинок, можливо, утворює праву, а не ліву суперспіраль.

Основна функція CenH3 полягає у визначенні центромери як такої: наявність цього гістонового варіанта забезпечує взаємодію з білками кінетохору; часткове розкручування нуклеосомної ДНК або більш радикальна перебудова нуклеосом у частинки, що містять гетеротетрамер, – доступ до ДНК інших центромерних білків. Наявність CenH3, напевно, запобігає надкомпактизації мітотичної хромосоми в центромерній зоні, що сприяє формуванню кінетохору під час мітозу.

**H2A.Z** – варіант, який становить у хроматині 5–10% від загальної кількості гістона H2A та має зі звичайним H2A ~60% гомології амінокислотної послідовності. Відмінності послідовності стосуються С-кінцевого хвоста, а також елементів глобулярної структури, які залучені до контактів з гістоном H3 при взаємодії з тетрамером (H3-H4)<sub>2</sub> – ця взаємодія послаблюється. Заміна димерів H2A-H2B на H2A.Z-H2B забезпечується одним із АТР-залежних комплексів ремоделювання хроматину (розділ 5). На гістон H2A.Z збагачені нуклеосоми, що займають певні специфічні позиції в промоторах (розділ 4) – H2A.Z маркує промотор, де відбулась ініціація транскрипції. Крім того, H2A.Z зустрічається з підвищеною частотою в енхансерах.

**H2A.X** – ще один універсальний для більшості організмів варіант H2A, рівномірно розподілений по хроматину. Його вміст у хроматині становить 2–10% від загального H2A, 120 перших амінокислотних залишків ідентичні звичайному H2A, але С-кінцевий хвіст на 13 залишків довший та містить 22 залишки, не гомологічні звичайному H2A. У межах цієї зони амінокислотної послідовності є характерний олігопептидний мотив Ser-Gln-Glu/Asp-Φ, де Φ – гідрофобний залишок. Залишок Ser є сайтом фосфорилювання специфічною кіназою. Фосфорилювання здійснюється у відповідь на появу в ДНК дволанцюгових розривів (будь-яким шляхом – пошкоджуючий вплив

іонізуючого випромінювання, апоптоз, гомологічна рекомбінація, V(D)J-рекомбінація імуноглобулінових генів тощо) – від 100 до 1000 молекул H2A.X піддаються фосфорилуванню в області розриву. Таким чином, фосфорильований H2A.X (позначається як  $\gamma$ H2A.X) є сенсором розривів, який рекрутує до зони розриву елементи репараційної системи негомологічного з'єднання кінців ДНК (NHEJ – Non-Homologous End Joining).

**MacroH2A**, поліпептидний ланцюг якого в 3 рази довший звичайного H2A, являє собою гібридну білкову молекулу – звичайна амінокислотна послідовність H2A плюс велика негістонова частина на С-кінці, гомологічна деяким вірусним РНК-зв'язувальним білкам. MacroH2A зустрічається переважно у складі інактивованої Х-хромосоми самок ссавців (яка знаходиться у надкомпактному стані під час інтерфази – у вигляді так званого тільця Барра, Barr body). Напевно, MacroH2A взаємодіє з молекулами РНК Xist (продукт гена *Xist*, активного тільки у складі інактивованої Х-хромосоми), зв'язаними з тільцем Барра, та приймає участь у підтриманні інактивованого стану. Проте, MacroH2A зустрічається також у самців ссавців та у комах (у яких не відбувається інактивація Х-хромосоми), приймаючи, ймовірно, участь у додатковій компактизації певних геномних ділянок.

**H2A.Bbd** (від Barr body deficient) – специфічний для ссавців варіант H2A, на який збіднені інактивовані Х-хромосоми. За рахунок скорочення С-кінцевого хвоста, він коротший за звичайний H2A та гірше взаємодіє з тетрамером (H3-H4)<sub>2</sub> (подібно до H2A.Z). Нуклеосома, до складу якої входить H2A.Bbd, частково розкручена – містить 110–130 пар основ ДНК. Крім того, такі нуклеосоми сприяють деконденсації хроматинової фібрили 30 нм. На варіант H2A.Bbd збагачені транскрипційно-активні зони хроматину.

Розглянуті варіанти гістонів є властивими для соматичних клітин. У хроматині сперматоцитів та спермій усіх тварин та рослин присутні особливі спермій-специфічні варіанти гістонів, а також спермій-специфічні протаміни та протамін-подібні білки (протаміни – порівняно невеликі олігопептиди, збагачені

на Arg), які забезпечують щільну компактизацію хроматину. У деяких видів хроматин спермій містить спермій-специфічні гістони та має нуклеосомну структуру. У інших (зокрема, у ссавців та осетрових риб) у процесі сперматогенезу гістони повністю або майже повністю замінюються на протаміни. У людини лише від 4 до 15% ДНК у сперматозоїдах входить до складу нуклеосом, решта – зв'язана з протамін-подібними білками. При цьому CENP-A залишається в хроматині сперматозоїдів, маркуючи центромерні зони.

Говорячи про гістонові варіанти, слід згадати також гістон-подібні білки археїв. Ці білки містять характерний гістоновий мотив, але не мають неупорядкованих хвостів. Гістони археїв, як і еукаріотичні, формують димери, а також тетрамери, схожі за своєю структурою на тетрамер  $(H3-H4)_2$ . Такий тетрамер взаємодіє з ДНК, внаслідок чого утворюється частинка, у складі якої ділянка подвійної спіралі довжиною ~60 пар основ закручується в елемент (менше одного витка) лівої або правої суперспіралі.

## 2.2. Лінкерний гістон H1

Вміст гістона H1 у хроматині є тканиноспецифічним (розділ 4), але зазвичай не перевищує однієї молекули на октамер корових гістонів. На відміну від корових, лінкерний гістон H1 (позначається також як лізин-збагачений) – мономерний білок, який містить трохи більше 200 амінокислотних залишків: неупорядкований N-кінцевий хвіст довжиною ~40 залишків (збагачений на Lys та Ala), невеликий глобулярний домен (GH1), довгий (половина молекули) C-кінцевий неупорядкований хвіст, збагачений на Lys, Ala та Pro. Відношення кількості позитивних амінокислотних залишків до негативних у гістоні H1 дорівнює приблизно 5.

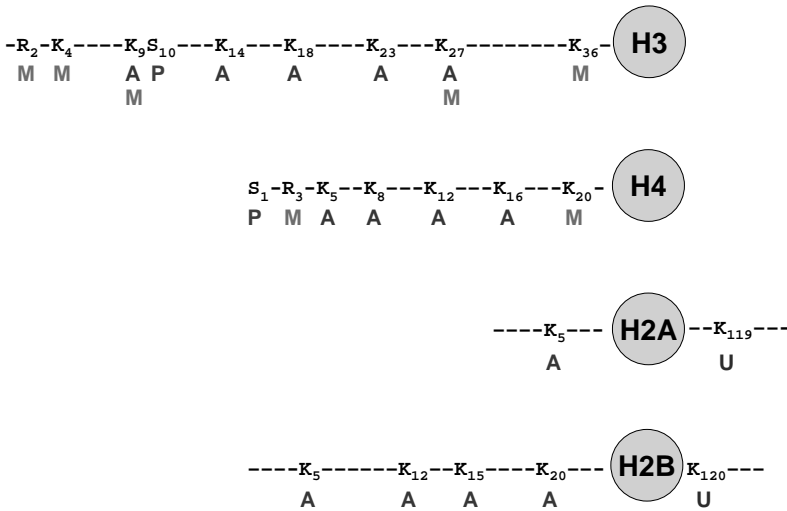
Гістон H1 існує у вигляді досить великої кількості варіантів – родини лінкерних гістонів. Наприклад, у ссавців у соматичних клітинах усіх тканин зустрічаються чотири варіанти H1, які позначаються як H1<sup>s</sup>-1, 2, 3, 4. Крім того, у термінально диференційованих клітинах присутній варіант H1<sup>0</sup>, у сім'яниках,

селезінці та тимусі – H1a, а також кілька ізоформ H1<sup>t</sup> у сперматоцитах. У неактивному хроматині еритроцитів птахів міститься аналог гістона H1 – гістон H5. Усі ці варіанти розрізняються, головним чином, по невпорядкованих хвостах, глобулярний домен досить консервативний. Лінкерний гістон активного хроматину дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* Hho1 містить два глобулярні домени замість одного (гомологічні GH1) та лізин-збагачений С-кінцевий хвіст. У хроматині інфузорії *Tetrahymena*, навпаки, міститься лінкерний гістон, в якому відсутній глобулярний домен.

За своєю структурою глобулярний домен H1 відноситься до родини ДНК-зв'язувальних білків типу "спіраль-поворот-спіраль із крильцем" (winged helix-turn-helix). Дві  $\alpha$ -спіралі (у складі досить стандартного для глобулярних білків триспірального пучка) розташовані приблизно під прямим кутом одна до одної, роль крильця відіграє невеликий  $\beta$ -структурний шар (рис. 7, кольор. вст.). Поверхня глобули є загалом позитивно зарядженою і, відповідно, має спорідненість до ДНК. Зрозуміло, що позитивно заряджені хвости також ефективно взаємодіють з ДНК. У хроматині глобулярний домен взаємодіє з нуклеосою на вході/виході нуклеосомної ДНК, С-кінцевий хвіст – із лінкерами (звідки й походить назва родини). Гістон H1 є одним з головних факторів стабілізації хроматинової фібрили 30 нм (розділ 4).

### 2.3. Посттрансляційні модифікації гістонів.

Різноманітні посттрансляційні модифікації здійснюються по консервативних амінокислотних залишках, розташованих у невпорядкованих хвостах (або на межі хвоста та глобулярної частини). Основні типи цих модифікацій (ацетилювання лізінів, метилювання лізінів та аргінінів, фосфорилування серинів та убіквітинування лізінів) та залишки, які є їхніми мішенями в корових гістонах, показано на рис. 2.3. Гістон H1 піддається фосфорилуванню, а також ще одній модифікації, яка зустрічається і для корових гістонів, – полі(ADP)-рибозилуванню.



**Рис. 2.3.** Основні типи та сайти посттрансляційних модифікацій корових гістонів (А – ацетилювання, М – метилювання, Р – фосфорилування, U – убіквітинування).

**2.3.1. Ацетилювання** залишків Lys полягає у приєднанні до ε-аміногрупи залишку оцтової кислоти (ацетату):



Джерелом ацетатних груп є ацетил-кофермент А, каталізує реакцію гістон-ацетилтрансфераза (HAT, Histone AcetylTransferase). Приєднання ацетату видаляє позитивний заряд на залишку лізину. Ацетилювання відноситься до короткотермінових модифікацій – гістон-деацетилази (HD, Histone Deacetylase, позначаються також як HDAC) здатні видаляти ацетатний залишок.

Гістон-ацетилтрансферази підрозділяються на два класи. Клас В – цитоплазматичні ферменти, які здійснюють ацетилювання гістонів відразу після синтезу. В ацетилюваній формі гістонові комплекси транспортуються гістоновими шаперонами-переносниками до ядра, де завантажуються на ДНК. У хроматині статус ацетилювання у певній зоні залежить від балансу активностей деацетилаз та ацетилтрансфераз класу А – ядерних ферментів.

Ядерні ацетилтрансферази завжди працюють у складі великих мультибілкових комплексів, деякі приклади наведено у таблиці 2.1. Аналогічно, до мультибілкових комплексів залучені і деацетилазні активності (наприклад, до складу комплексів Sin3, NuRD).

**Таблиця 2.1. Приклади гістон-ацетилтрансфераз**

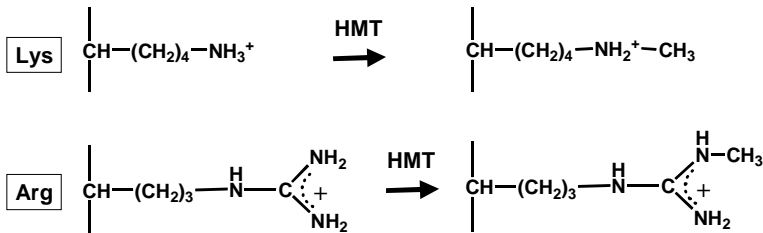
Родина ацетил-трансфераз	Представники	Комплекс, до складу якого входить	Специфічність	Процеси, до яких залучена
GNAT	GCN5	SAGA Ada	H3/H2B	Транскрипція
	PCAF	PCAF	H3	Транскрипція
MYST	Tir60	Tir60	H4/H2A	Транскрипція, репарація
	HBO 1	HBO 1	H3/H4	Реплікація
p300/CBP	p300 CBP	p300 CBP	4 гістони	Транскрипція, репарація, реплікація
TAF <sub>II</sub> 250	TAF <sub>II</sub> 250	TFIID	H3/H4	Транскрипція

Ацетилювання є єдиною з модифікацій, про яку можна сказати однозначно, що вона завжди корелює з підвищенням активності транскрипції та інших функціональних процесів, що відбуваються у хроматині. Так, гіперацетилювані гістони завжди присутні у транскрипційно активних ділянках хроматину, у репресованих підтримується деацетилюваний статус гістонів. Як видно з таблиці 2.1, ацетилтрансферазна активність є, зокрема, компонентом загального фактору

транскрипції TFIIID. Крім того, компоненти цього фактора – фактори, асоційовані з білком ТВР (TAFs), – входять також і до складу інших ацетилтрансферазних комплексів (SAGA, PCAF). Таким чином, ацетилювання гістонів є невід’ємним елементом загальної системи регуляції транскрипції (розділ 5).

Існує два типи механізмів впливу ацетилювання гістонів на структурно-функціональний стан хроматину. Перший полягає в тому, що видалення позитивних зарядів з численних лізинових залишків (рис. 2.3) призводить до зниження спорідненості гістонів до ДНК. Як буде показано у наступному розділі, це не викликає суттєвої зміни структури нуклеосоми, але зумовлює деяке зниження її стабільності, а також сприяє деконденсації хроматинової фібрили. Другий, більш важливий механізм, є спільним для ацетилювання та інших модифікацій: ацетильовані лізини впізнаються численними негістоновими білками, що має певні функціональні наслідки (підпідрозд. 2.3.6).

**2.3.2. Метилювання** залишків лізину та аргініну здійснюється за схемою:



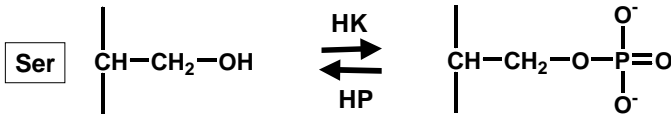
де HMT – гістон-метилтрансфераза – фермент, що переносить метильні групи з S-аденозилметіоніну на аміногрупу Lys або гуанідинову групу Arg. На аміногрупу може приєднатись не тільки одна (як на схемі), а дві або три метильні групи, на гуанідинову групу – одна або дві. Як показано на схемі, позитивний заряд не зникає внаслідок метилювання. Проте, деякі неспецифічні наслідки можуть мати місце: метилювання дещо підвищує гідрофобність залишку та знижує його здатність утворювати водневі зв'язки. Головний наслідок метилювання – впізнання метильованих залишків певними білками. Чіткої



кореляції між метилюванням та транскрипційною активністю немає – наприклад, метильований H3Lys4 (четвертий Lys в гістоні H3) зазвичай присутній в транскрипційно активних ділянках, а H3Lys9 – у репресованих.

Гістон-метилтрансферази – високоспецифічні ферменти, кожен з яких здійснює метилювання лише конкретного залишку у конкретному гістоні. Деякі залишки можуть піддаватись деметилюванню за рахунок деметилазних активностей. Але для багатьох залишків – на відміну від інших модифікацій – метилювання є довготривалим: метильовані гістони зберігаються у певних ділянках хроматину довгий час і зникають з хроматинової ділянки тільки разом з гістоном внаслідок його заміни на неметилювану молекулу. Наприклад, метильовані гістони H3 при активації транскрипції можуть (і це супроводжується ацетилюванням гістонів) замінюватись на неметилюваний варіант H3.3. Довготривалість метилювання гістонів робить цю модифікацію одним із важливим механізмів епігенетичної спадковості (розділ 5).

**2.3.3. Фосфорилювання** гістонів здійснюється по кількох залишках серіну:



Фосфорилювання – перенесення фосфату з АТФ на ОН-групу Ser за рахунок активності гістон-кіназ (HK) – є оборотним за рахунок гістон-фосфатазних (HP) активностей. Хоча фосфорилювання призводить до появи двох негативних зарядів, зважаючи на невелику кількість мішеней фосфорилювання в корових гістонах (рис. 2.3), ефект цієї модифікації на спорідненість гістонів до ДНК не є важливим. Головна роль фосфорилювання корових гістонів (головним чином мова йде

про H3Ser10) полягає в його впливі на інші модифікації (підпдрозд. 2.3.6).

Фосфорилуванню піддається також і гістон H1, і тут вплив фосфорилування на зниження спорідненості до ДНК є більш суттєвим: один Ser в N-кінцевому хвості, два Ser та два Thr – у C-кінцевому.

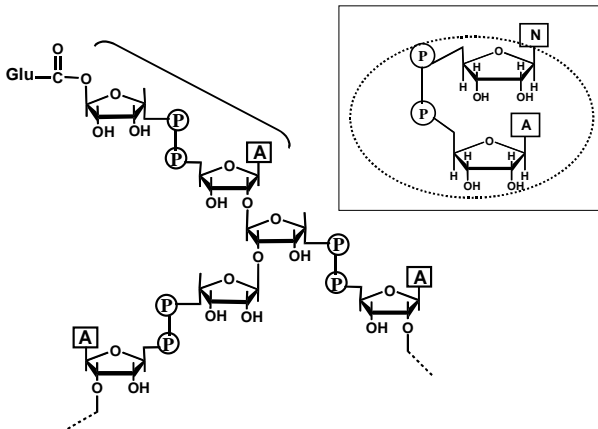
Функціональна роль фосфорилування є подвійною. З одного боку, в період інтерфази фосфорилування H1 призводить до деконденсації хроматинової фібрили і часто спостерігається в активованих промоторах. Аналогічно, фосфорилування H3Ser10 часто слугує сигналом для зв'язування гістон-ацетилтрансфераз у транскрипційно активних ділянках. З іншого боку, фосфорилування H1 та H3 зростає під час мітотичної надконденсації хромосом (розділ б). Можливо, тут також відбувається послаблення взаємодії H1 з ДНК з метою дати доступ до неї іншим білкам, від яких залежить надкомпактизація.

**2.3.4. Убіквітинування** гістонів здійснюється по двом залишкам Lys в гістонах H2A і H2B (рис. 2.3). Убіквітин (ubiquitin) – невеликий глобулярний білок, який містить 76 амінокислот. Реакція убіквітинування полягає в ковалентному приєднанні C-кінцевої карбоксильної групи убіквітину до ε-аміногрупи Lys – утворюється ізопептидний зв'язок. До реакції залучено три типи ферментів: фермент типу E1 АТР-залежним шляхом активує молекулу убіквітину, фермент E2 приєднує його до власного залишку Cys, фермент E3 (убіквітин-лігаза) переносить убіквітин з E2 на аміногрупу того чи іншого білка. Як добре відомо для багатьох білків, на приєднаний убіквітин переноситься ще одна молекула убіквітину, далі ще кілька, і такий поліубіквітин є маркером системи протеолітичної деградації у протеасомах. Гістони також можуть бути субстратом такої деградації, але тут мова йде про *моноубіквітинування*, яке не має жодного відношення до протеолізу. У хроматині зазвичай до 10% гістонів H2A є убіквітинованими по Lys119 і до 1–2% гістонів H2B – по Lys120. Приєднаний до гістонів убіквітин відщеплюється

убіквітин-специфічною протеазою – убіквітин у складі модифікованих гістонів швидко обмінюється із загальним пулом вільного убіквітину в ядрі. Убіквітинування/деубіквітинування гістонів H2A і H2B здійснюється різними наборами специфічних ферментів.

Функціональні наслідки убіквітинування є різноманітними (у залежності від контексту інших модифікацій), але спостерігається наступна тенденція: убіквітинований H2A є частіше маркером репресії, убіквітинований H2B часто залучений до активації транскрипції (див. підпдрозд. 2.3.6).

**2.3.5. Полі(ADP)-рибозилування** – модифікація, яка суттєво змінює фізичні властивості гістонів. ADP-рибоза (аденозиндифосфат, до якого приєднаний ще один залишок рибози, рис. 2.4) переноситься на гістони (та деякі інші білки) зв'язаним із хроматином ферментом полі(ADP)-рибозополімеразою (PARP, poly(ADP)-ribose polymerase), донором ADP-рибози є нікотинамідаденіндинуклеотид ( $NAD^+$ ).



**Рис. 2.4.** Полі(ADP)-рибоза, приєднана до карбоксильної групи залишку Glu, дужкою позначено мономер – (ADP)-рибозу. На вставці:  $NAD^+$ , овалом обведено (ADP)-рибозу. N – нікотинамід, A – аденін, P – фосфатний залишок.

Залишок (ADP)-рибози приєднується до карбоксильної групи (частіше у складі Glu). Модифікація може полягати у приєднанні одного такого залишку або багатьох (до 200) – полімерний ланцюг (полі(ADP)-рибоза), який може розгалужуватись, утворюється за рахунок приєднання мономерів до OH-груп рибоз (рис. 2.4).

Основна мішень полі(ADP)-рибозилування в хроматині – гістон H1 (два Glu в N-кінцевому хвості, один у C-кінцевому поряд із глобулярним доменом та C-кінцева карбоксильна група). Проте іноді модифікуються також і корові гістони – зокрема залишок Glu в N-кінцевому хвості H2B.

На відміну від інших модифікацій гістонів, полі(ADP)-рибоза являє собою масивний негативно заряджений (завдяки фосфатних залишків) полімер, дуже схожий на нуклеїнові кислоти. Такий поліаніон, по-перше, суттєво знижує спорідненість модифікованих гістонів до ДНК. По-друге, полі(ADP)-рибоза може нековалентно взаємодіяти з гістоновими комплексами, сприяючи їх тимчасовому видаленню з ДНК. При цьому PARP, присутня у багатьох локусах хроматину, часто після певних регуляторних сигналів полі(ADP)-рибозилує сама себе, а цей полімер вже адсорбує гістонові комплекси.

Полі(ADP)-рибозилування іноді спостерігається при гіперактивації транскрипції деяких генів, сприяючи тимчасовому видаленню гістонових комплексів у кодуючих ділянках. Іншим добре вивченим процесом, до якого залучена ця модифікація, є репарація: активність PARP стимулюється у місцях накопичення розривів ДНК. Полі(ADP)-рибоза видаляє гістони, завдяки чому забезпечує доступ до ДНК елементів репараційних систем, після чого поліаніон досить швидко деградується спеціальними ферментами (період напіврозпаду полі(ADP)-рибози в хроматині від 30 с до 10 хв), і гістонові комплекси повертаються на ДНК.

**2.3.6. Гістоновий код.** Зважаючи на кількість модифікацій (рис. 2.3), можливо існування кількох тисяч різноманітних ізоформ нуклеосом, що розрізняються набором модифікованих

амінокислотних залишків. Різноманітні комбінації (патерни) модифікацій залучені до регуляції функціональних процесів у хроматині – несуть певну інформацію, система зчитування цієї інформації базується на впізнанні модифікованих залишків негістоновими білками. Відповідність між патернами модифікацій та набором білків, що їх впізнають (і функціональними наслідками такого впізнання), називається *гістоновим кодом*. Білки, здатні взаємодіяти з модифікованими гістонами, називають *ефекторами*.

Деякі найбільш поширені структурні модулі, що здатні впізнавати модифіковані залишки в гістонах та зустрічаються в багатьох негістонових білках:

- **Бромодомен** (bromodomain) – структурний домен в білках, що впізнає ацетильовані лізини в гістонах (рис. 8, кольор. вст.). Досить часто бромодомени є специфічними – такими, що здатні взаємодіяти тільки з конкретним ацетильованим Lys. Зокрема, білки, що містять бромодомен, часто входять до складу гістон-ацетилтрансферазних комплексів: НАТ здатна впізнати ацетильований Lys однієї нуклеосоми та здійснити ацетилювання іншого, на тій самій нуклеосомі чи на іншій – ацетилювання гістонів у певній геномній зоні може розповсюджуватись за таким каскадним механізмом. Багато інших білків, залучених до активації транскрипції (зокрема, компоненти загального фактору транскрипції TFIIID) також містять бромодомени.

- **Хромодомен** (chromodomain) взаємодіє з метильованими лізинами. Наприклад, хромодомен у складі гетерохроматинового білка HP1 специфічно взаємодіє з метильованим H3Lys9, і ця взаємодія є суттєвим елементом системи підтримання гетерохроматинового стану (розділ 5).

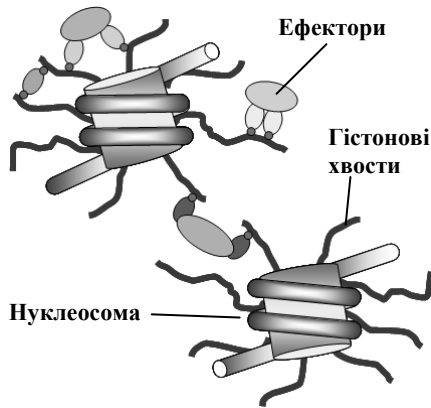
- **PHD-палець** (PHD-finger, Plant HomeoDomain) також впізнає метильовані лізини – зокрема такі, що є маркерами активованого щодо транскрипції стану хроматину. Прикладом двохвалентного ефектора є транскрипційний фактор BPTF (bromodomain + PHD) – у його складі бромодомен, що впізнає ацетильований Lys, приєднаний  $\alpha$ -спіральним лінкером до PHD-

пальця, що зв'язується з триметильованим Lys4 у гістоні H3 (рис. 8, кольор. вст.).

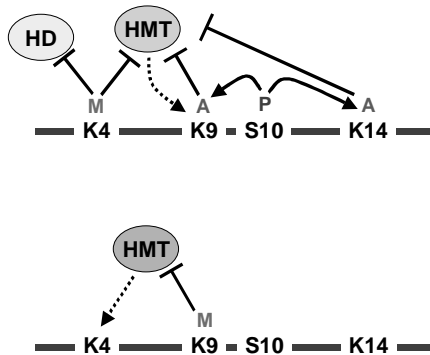
Фізичною основою гістонового коду є те, що елементи системи регуляції транскрипції впізнають відразу *багато* різноманітних модифікацій: взаємодія з кожною окремою модифікованою групою є досить слабкою, але в цілому спорідненість одного чи кількох білків-ефекторів до даної нуклеосоми може бути достатньо високою. Така мультивалентна взаємодія забезпечує динамічний характер зв'язування: одну з певного набору взаємодій можна легко зруйнувати за рахунок якогось конкурента, що знизить загальну спорідненість та порушить комплекс. Різноманітні варіанти мультивалентних взаємодій з гістоновими хвостами схематично показано на рис. 2.5.

Мультивалентна взаємодія різноманітних ефекторів забезпечує не тільки специфічне зв'язування модифікованих гістонів, а й взаємний вплив модифікацій одна на одну. Наприклад, в активованих ділянках хроматину метилювання H3Lys4 інгібує зв'язування гістон-деацетилаз та гістон-метилтрансферази, яка відповідає за метилювання H3Lys9. Одночасно, фосфорилування H3Ser10 індукує ацетилювання останнього лізину та H3Lys14, ці залишки в ацетилюваному стані додатково блокують зв'язування НМТ (рис. 2.6). Деацетилювання вказаних лізинів, навпаки, стимулює зв'язування НМТ, яка здійснює метилювання H3Lys9, а цей останній метильований залишок інгібує метилювання H3Lys4 іншою гістон-метилтрансферазою – така комбінація модифікацій в N-кінцевому хвості H3 є ознакою репресованих ділянок (рис. 2.6).

Зазвичай, як у розглянутому прикладі, метильований H3Lys4 є маркером активних, а H3Lys9 – репресованих та гетерохроматинових ділянок. Проте, комбінація метильованих H3Lys4, H3Lys9 та H4Lys20 впізнається одним із активаторів транскрипції.



**Рис. 2.5.** Мультивалентна взаємодія ефекторів з модифікованими залишками, розташованими в межах одного хвоста, двох хвостів різних гістонів однієї нуклеосоми або на різних нуклеосомах.



**Рис. 2.6.** Приклади гістонового коду: верхня комбінація модифікацій в N-кінцевому хвості гістона H3 відповідає транскрипційно активному стану, нижня – репресованому (пояснення в тексті).

До загальної системи гістонового коду залучене також і убіквітинування гістонів H2A та H2B. Як вже згадувалось вище, убіквітинований H2A (uH2A) є зазвичай маркером репресії. В нуклеосомі С-кінцевий хвіст H2A розташований в зоні входу/виходу нуклеосомної ДНК – там, де з нуклеосою взаємодіє гістон H1 (див. рис. 15, кольор. вст.). Поява убіквітину підвищує спорідненість до H1 і, відповідно, стабілізує компактний стан хроматинової фібрили. Крім того, uH2A інгібує метилювання H3Lys4 (маркера активних ділянок). І навпаки, деубіквітиназа uH2A рекрутується до міжмолекулярних комплексів, що збираються на промоторах при активації транскрипції.

Убіквітинований H2B (uH2B) є важливим активатором метилювання H3Lys4 – убіквітин упізнається фактором, необхідним для активації відповідної гістон-метилтрансферази. Після того, як метилювання (довгострокова модифікація) відбулось, убіквітин видаляється, виконавши свою роль, – в активних ділянках до 5% H2B є убіквітинованими, але до 35% H3 – метильованими по Lys4. Крім того, uH2B вірогідно слугує бар'єром для нормального руху РНК-полімерази при транскрипції – його видалення після ініціації транскрипції з нуклеосоми, що знаходиться відразу за стартовою точкою, є необхідною умовою нормального продовження руху полімерази.

Деякі найбільш характерні комбінації гістонових модифікацій, за якими розрізняються різні функціональні стани хроматину клітинної лінії дрозофіли, наведені у табл. 2.1. Насправді, комбінаторний аналіз дозволяє виділити 30 таких груп комбінацій – 30 станів хроматину, що розрізняються за функціональними властивостями та патернами гістонових модифікацій.

**Таблиця 2.1. Характерні комбінації модифікацій гістонів у ділянках хроматину, що знаходяться в різних функціональних станах**



Стан	H3K36me3	H3K79me1	H2B-ubiq	H3K79me2	H3K4me2	H3K4me3	H3K9ac	H4K16ac	H3K4me1	H3K36me1	H3K18ac	H3K27ac	H3K9me3	H3K9me2
Міжгенний еухроматин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Відкритий (потенційно активний) хроматин	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Активні стартові точки транскрипції, екзони	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Активні екзони, зони елонгації транскрипції	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Активні інтрони, енансери	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Гетерохроматин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Позначення: ac – ацетилювання, me – метилювання (1, 2, 3 – кількість метильних груп), ubiq – убіквітинування. За даними The modENCODE Consortium (2010).

Таким чином, гістоновий код дає можливість тонкої регуляції та модуляції транскрипції за рахунок впізнання

гістонових модифікацій численними ефекторами – факторами й кофакторами транскрипції, ферментами, що здійснюють модифікації гістонів і ДНК, комплексами ремоделювання хроматину тощо.

## 2.4. Білки HMG

Назва HMG (High Mobility Group, мається на увазі висока рухливість при електрофорезі) об'єднує три, структурно абсолютно різні, родини білків. Всі вони присутні в хроматині у досить великій кількості та суттєво модулюють його структурну динаміку – їх іноді називають "архітектурними білками" або "хроматиновими шаперонами".

**2.4.1. HMGA** (інша назва HMG-I/Y) – білки, що не мають впорядкованої структури та існують у вигляді трьох варіантів: HMGA-1a та HMGA-1b (продукти альтернативного сплайсингу одного гена) та HMGA-2 (продукт іншого гена). Гени HMGA є протоонкогенами – їхня гіперактивність може викликати злоякісну трансформацію. Ці гени є мішенями численних шляхів сигнальної трансдукції, що призводять як до зміни активностей промоторів генів, так і забезпечують різноманітні посттрансляційні модифікації їхніх продуктів.

Поліпептидний ланцюг HMGA містить 107 амінокислотних залишків, у первинній структурі є три характерні мотиви: так звані *АТ-гаки* (AT-hooks) – паліндромні пентапептиди Pro-Arg-Gly-Arg-Pro. АТ-гак має підвищену спорідненість до невеликого АТ-збагаченого сайту ДНК (звідки походить назва мотиву) довжиною ~5 пар основ. АТ-гак зв'язується з маленьким жолобком подвійної спіралі, де набуває витягнутої конформації – він добре укладається у звужений маленький жолобок ділянки, збагаченої АТ-парами. Головний внесок у стабілізацію комплексу дають два занурені в жолобок залишки Arg, що утворюють водневі зв'язки з екзоциклічними групами тиміну (рис. 9, кольор. вст.).

Конформаційна рухливість поліпептидних з'єднань між АТ-гаками дозволяє білку впізнавати різноманітні комбінації АТ-

збагачених сайтів, що знаходяться на різній відстані один від одного: білок взаємодіє або з АТ-збагаченою ділянкою довжиною ~15 пар основ, або з трьома АТ-збагаченими сайтами, віддаленими по ланцюгу один від одного. Такі АТ-збагачені треки досить часто зустрічаються в промоторах. При цьому сайти зв'язування з АТ-гаком по маленькому жолобку часто перекриваються з сайтами для транскрипційних факторів по великому. Оскільки сайт взаємодії має маленький розмір, він може бути доступним і на поверхні нуклеосомної ДНК.

Конформаційно лабільні з'єднання між АТ-гаками використовуються далі як платформи для збірки мультибілкових комплексів, що активують/блокують транскрипцію. Отже, зв'язування HMGB на промоторах та енхансерах часто ініціює збірку мультибілкових комплексів, які залучені до регуляції транскрипції.

**2.4.2. HMGB** – білки, які містять у своєму складі особливі глобулярні структурні домени – так звані **HMGB-бокси**. В білках HMGB дріжджів, комах та рослин знаходиться один такий бокс, у хребетних – два. Загальна довжина поліпептидного ланцюга HMGB хребетних – 215 амінокислотних залишків (два HMGB-бокси поряд один з одним та негативно заряджений С-кінцевий хвіст). Два варіанти цього білка – HMGB-1,2 (стара назва HMG-1,2) присутні у клітинному ядрі в досить великій кількості – у ссавців 10–20 копій на нуклеосому. Спорідненість HMGB до ДНК є невисокою (білок повністю дисоціює від ДНК у 0,35 М NaCl). Негативний С-кінцевий хвіст дає свій додатковий внесок у зниження спорідненості, крім того, він, імовірно, здатен взаємодіяти з іншими білками.

HMGB-бокс має L-подібну структуру, що складається з трьох  $\alpha$ -спіралей. Дві з них (більш короткі) вбудовуються у маленький жолобок ДНК, що супроводжується розкрученням подвійної спіралі та її вигином на  $\sim 80^\circ$  у протилежний по відношенню до білка бік – у великий жолобок. У взаємодії між ДНК та білком беруть участь гідрофобні поверхні двох  $\alpha$ -спіралей та деформованого маленького жолобка, при цьому здійснюється

часткова інтеркаляція двох гідрофобних залишків (зазвичай Met, Phe або Ile) між парами основ. У складі білка HMGb бокс фланкований позитивно зарядженою N-кінцевою неупорядкованою ділянкою, яка додатково стабілізує комплекс, електростатично взаємодіючи з ДНК із внутрішнього боку вигину (рис. 10, кольор. вст.).

HMG-бокс є дуже розповсюдженим структурним мотивом у багатьох ДНК-зв'язувальних білках. Серед HMG-боксів є як специфічні до певних послідовностей пар основ (зокрема, в транскрипційних факторах LEF-1, Sox-5, SRY), так і неспецифічні. Неспецифічний білок HMGb виконує функцію фактора, що підвищує конформаційну рухливість ДНК у клітині: білки зв'язуються на короткий проміжок часу, індукують вигин, після чого дисоціюють та зв'язуються в іншому місці. Результатом є полегшення різноманітних маніпуляцій з ДНК, які потребують деформацій подвійної спіралі: рекомбінація, ремоделювання хроматину (розділ 5), зв'язування транскрипційних факторів у зоні тимчасового вигину тощо.

**2.4.3. HMGn** – неупорядкований поліпептид довжиною ~100 амінокислот, який існує у двох варіантах: HMGn-1,2 (стара назва HMG-14, 17). Вміст HMGn у хроматині варіює для різних тканин, але не перевищує однієї копії на нуклеосому. В ланцюзі є дві зони (домени): позитивно заряджений NBD (Nucleosome Binding Domain) – ділянка від ~10-ї до 40-ї амінокислоти, що взаємодіє з нуклеосою; та негативно заряджений C-кінцевий CUD (Chromatin UnfoldinG Domain). NBD взаємодіє з двома сусідніми витками нуклеосомної суперспіралі ДНК, і ця взаємодія стабілізує структуру нуклеосом. З однією нуклеосою кооперативно (підвищуючи спорідненість одна одній) зв'язуються дві молекули HMGn, причому завжди одного типу (1 чи 2). C-кінцева негативно заряджена частина молекули конкурує з ДНК за гістонові хвости. У результаті HMGn, який накопичується у транскрипційно активних ділянках, сприяє деконденсації хроматинової фібрили. Взаємодія HMGn з нуклеосою – слабка, тобто він, як і HMGb, лише на короткий

час (середній час імобілізації ~30 с) підвищує доступність ДНК для інших елементів системи активації транскрипції. На деяких нуклеосомах (у залежності від компактності фібрили, контексту модифікацій, кофакторів) HMGN може затримуватись на більш довгий час і тоді стимулювати транскрипцію.

## Рекомендована література

### *Загальна*

*Isenberg, I.* Histones // *Ann. Rev. Biochem.* – 1979. – Vol. 48. – P. 159-191.

*Sullivan, S., Sink, D.W., Trout, T.L. et al.* The histone database // *Nucl. Acids Res.* – 2002. – Vol. 30. – P. 341-342.

### *Корові гістони та гістонові комплекси*

*Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.-C., Love, W.E., Moudrianakis, E.N.* The nucleosomal core histone octamer at 3.1 resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1991. – Vol. 88. P. 10148-10152.

*Arents, G., Moudrianakis, E.N.* The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization // 1995. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – Vol. 93. P. 11174-11179.

*Benedict, R.C., Moudrianakis, E.N., Ackers, G.K.* Interactions of the nucleosomal core histones: a calorimetric study of octamer assembly // *Biochemistry.* – 1984. – Vol. 23. – P. 1214-1218.

*D'Anna, J.A., Isenberg, I.* A histone cross-complexing pattern // *Biochemistry.* – 1974. – Vol. 13. – P. 4992-4997.

*Davey, C.A., Sargent, D.F., Luger, K., Mäder, 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.

*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. – P. 251-260.

### *Лінкерні гістони*

*Happel, N., Doenecke, D.* Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function // *Gene*. – 2009. – Vol. 431. – P. 1-12.

*Ramakrishnan, V.* Histone H1 and chromatin higher-order structure // *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* – 1997. – Vol. 7. – P. 215–230.

### *Варіанти гістонів*

*Banaszynski, L.A., Allis, C.D., Lewis, P.W.* Histone variants in metazoan development // *Dev. Cell*. – 2010. – Vol. 19. – P. 662-674.

*Bao, Y., Konesky, K., Park, Y.-J., Rosu, S., Dyer, P.N., Rangasamy, D., Tremethick, D.J., Laybourn, P.J., Luger, K.* Nucleosomes containing the histone variant

H2A.Bbd organize only 118 base pairs of DNA // *EMBO J.* – 2004. – Vol. 23. – P. 3314-3324.

*Dalal, Y., Wang, H., Lindsay, S., Henikoff, S.* Tetrameric structure of centromeric nucleosomes in interphase *Drosophila* cells // *PLoS Biol.* – 2007. – Vol. 5. – P. 1798-1809.

*Dimitriadis, E.K., Weber, C., Gill, R.K., Diekmann, S., Dalal, Y.* Tetrameric organization of vertebrate centromeric nucleosomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2010. – Vol. 107. – P. 20317-20322.

*Henikoff, S., Furuyama, T., Ahmad, K.* Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance // *Trends Genet.* – 2004. – Vol. 20. – P. 320-326.

*Pereira, S.L., Reeve, J.N.* Histones and nucleosomes in Archaea and Eukarya: a comparative analysis // *Extremophiles*. – 1998. – Vol. 2. – P. 141-148.

*Suto, R.K., Clarkson, M.J., Tremethick, D., Luger, K.* Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z // *Nat. Struct. Biol.* – 2000. – Vol. 7. – P. 1121-1124.

*Talbert, P.B., Henikoff, S.* Histone variants – ancient wrap artists of the epigenome // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2010. – Vol. 11. – P. 264-275.

### ***Посттрансляційні модифікації гістонів***

*Grunstein, M.* Histone acetylation in chromatin structure and transcription // *Nature*. – 1997. – Vol. 389. – P. 349-352.

*Hassa, P.O., Haenni, S.S., Elser, M., Hottiger, M.O.* Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2006. – Vol. 70. – P. 789-829.

*Kuo, M. H., Allis, C. D.* Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation // *Bioessays*. – 1998. – Vol. 20. – P. 615-626.

*Lee, J.S., Smith, E., Shilatifard, A.* The language of histone crosstalk // *Cell*. – 2010. – Vol. 142. – P. 682-685.

*Marmorstein, R.* Protein modules that manipulate histone tails for chromatin regulation // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2001. – Vol. 2. – P. 422-432.

*Strahl, D.D., Allis, C.D.* The language of covalent histone modifications // *Nature*. – 2000. – Vol. 403. – P. 41-45.

*Roth, S.Y., Denu, J.M., Allis, C.D.* Histone acetyltransferases // *Ann. Rev. Biochem.* – 2001. – Vol. 70. – P. 81-120.

*Ruthenburg, A.J., Li, H., Patel, D.J., Allis, C.D.* Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 8. – P. 983-994.

*Suganuma, T., Workman, J.L.* Crosstalk among histone modifications // *Cell*. – 2008. – Vol. 135. – P. 604-607.

*Weake, V.M., Workman, J.L.* Histone ubiquitination: triggering gene activity // *Mol. Cell*. – 2008. – vol. 29. – P. 653-663.

### ***Білки HMG***

*Agresti, A., Bianchi, M.E.* HMGB proteins and gene expression // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2003. – Vol. 13. – P. 170-178.

*Bustin, M.* Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins // *Mol. Cell Biol.* – 1999. – Vol. 19. – P. 5237-5246.

*Bustin, M.* Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins // Trends Biochem. Sci. – 2001. – Vol. 26. – P. 152-153.

*Reeves, R.* Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function // Gene. – 2001. – Vol. 277. – P. 63-81.

*Thomas, J.O., Travers, A.A.* HMG1 and 2, and related ‘architectural’ DNA-binding proteins // Trends Biochem. Sci. – 2001. – Vol. 26. P. 167-174.



## Розділ 3. Нуклеосома

Нуклеосома є базовою структурною одиницею хроматину. В цьому розділі більш детально розглянуто її структуру, механізми стабілізації та структурної динаміки.

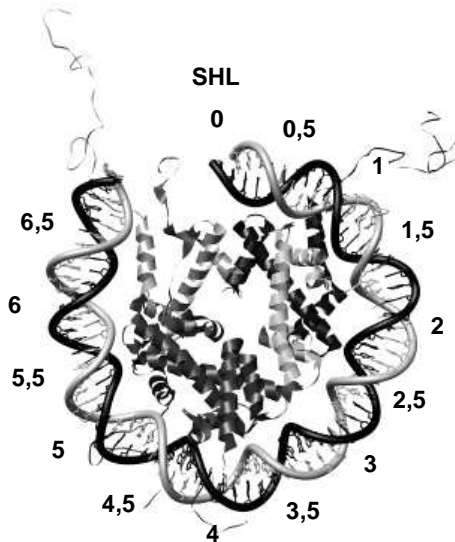
### 3.1. Структура нуклеосоми

**3.1.1. ДНК-гістонові взаємодії та просторова організація нуклеосоми.** Кожен гістоновий гетеродимер (рис. 4, кольор. вст.) має на своїй глобулярній поверхні три зони скупчення позитивно заряджених амінокислотних залишків, які здатні взаємодіяти з ДНК за електростатичним механізмом: у місцях взаємодії між петлями L1 та L2 різних субодиниць (які є конформаційно жорсткими за рахунок елементів міжмолекулярної  $\beta$ -структури, підпідрозд. 2.1.2) та в зоні контакту між N-кінцями спіралей  $\alpha 1$ . Разом ці три сайти створюють платформу для зв'язування ділянки ДНК довжиною 27-28 пар основ (~2,5 витка подвійної спіралі, рис. 11, кольор. вст., див також рис. 4, кольор. вст.).

Тетрамер  $(H3-H4)_2$  (рис. 5, кольор. вст.) займає центральну позицію в структурі нуклеосоми та зв'язує ~ 55 пар основ (рис. 12, кольор. вст.). Комплекс тетрамера з ДНК називають **тетрасомою**. Структура тетрасоми, як і тетрамера, нагадує підкову, яка утворює елемент лівої суперспіралі. Вісь симетрії другого порядку тетрасоми (яка водночас є і віссю симетрії другого порядку всієї нуклеосоми) проходить через інтерфейс між двома молекулами H3 та центральну пару основ.

Два димери H2A-H2B (взаємодіючи при цьому з ДНК, що нейтралізує позитивні заряди гістонів, див. підпідрозд. 2.1.2) продовжують тетрасомну суперспіраль в обидва боки, утворюючи нуклеосомну частинку. Результатом реалізації ДНК-гістонових та гістон-гістонових взаємодій є формування на поверхні октамера ~1,7 витка лівої суперспіралі ДНК. Структуру нуклеосоми, що містить ДНК довжиною 147 пар основ, встановлену методом рентгеноструктурного аналізу кристалів нуклеосом у лабораторії Ричмонда (Timothy

Richmond), показано на рис. 13, кольор. вст. (див. також рис. 3.1, 1, кольор. вст.).



**Рис. 3.1.** Одна з симетричних половин нуклеосоми (зі структури на рис. 13, кольор. вст.). Позначено суперспіральні позиції (SHL) нуклеосомної ДНК.

Як зазначено вище, вісь симетрії нуклеосоми проходить точно через центральну пару основ (не через проміжок між двома парами) нуклеосомної ДНК – у цій точці великий жолобок подвійної спіралі є зверненим до поверхні октамера гістонів (рис. 12, 13, кольор. вст.). ДНК-гістонові взаємодії здійснюються у позиціях, де маленький жолобок контактує з октамером – з позитивно зарядженими сайтами на поверхні гістонових димерів (рис. 3.1, 11–13, кольор. вст.). Один із прикладів таких контактів зображено на рис. 14, кольор. вст. – занурення залишку аргініну (див. також рис. 3, кольор. вст.) в маленький жолобок відбувається в кожному сайті взаємодії. У кожному сайті два фосфатні залишки різних ланцюгів ДНК (по обидва боки від маленького жолобка) жорстко фіксуються на поверхні октамера, яка, таким чином, задає певну конформацію

нуклеосомної ДНК, що розглядатиметься у наступному підпідрозділі.

Із зазначеними вище сайтами на поверхні чотирьох гістонових димерів взаємодіє центральна частина – ~121 пара основ (~12 витків подвійної спіралі) – нуклеосомної ДНК (12 контактів з маленьким жолобком). Два останні контакти (перед виходом ДНК з нуклеосоми) з маленькими жолобками реалізуються за допомогою  $\alpha$ N-спіралей гістонів H3 (рис. 3.1, 13, кольор. вст.). Загалом нуклеосомна ДНК містить трохи більше 14 витків подвійної спіралі, невеликі додаткові фрагменти на кінцях стабілізуються частинами N-кінцевих хвостів H3, які фланкують  $\alpha$ N-спіралі. Центральну точку нуклеосомної ДНК, через яку проходить вісь симетрії і в якій великий жолобок подвійної спіралі є зверненим до поверхні октамера гістонів, прийнято позначати як SHL 0 (SuperHelical Location – суперспіральна позиція). Позиції, де великий жолобок знову опиняється зверненим до поверхні октамера (через кожен виток подвійної спіралі), позначають цілими числами від 1 до 6 (при русі від центру до периферії за годинниковою стрілкою, рис. 3.5) та від –1 до –6 (у протилежному напрямі). Відповідно, SHL  $\pm 0,5$ ;  $\pm 1,5$  і т.д. є позиціями, де маленький жолобок контактує з поверхнею октамера (рис. 3.1): нуклеосомна ДНК на ділянці від SHL –2,5 до +2,5 зв'язана з тетрамером (H3-H4)<sub>2</sub>, від SHL  $\pm 3,5$  до  $\pm 5,5$  – з димерами H2A-H2B, в SHL  $\pm 6,5$  – з  $\alpha$ N-спіралями гістонів H3.

В основному, гістони взаємодіють з цукрофосфатним остовом ДНК: головну роль відіграють електростатичні контакти, до яких залучаються залишки аргініну та лізину, а також N-кінцеві частини диполей гістонових спіралей  $\alpha 1$  (кожна  $\alpha$ -спіраль в білках являє собою диполь – на N-кінці спіралі утворюється частковий позитивний, на C-кінці – негативний заряд). При цьому реалізуються численні водневі зв'язки з цукрофосфатним остовом (до більшої їх частини залучені залишки Arg та Lys), як безпосередні між ДНК та гістонами, так і опосередковані молекулами води (вода відіграє роль біфункціональної зшивки, утворюючи водневі зв'язки з ДНК та білковою поверхнею). Спостерігаються також водневі зв'язки з

азотистими основами, які не можуть відігравати значної ролі в зв'язуванні, – 13% від загальної кількості безпосередніх водневих зв'язків. Взагалі, водневі зв'язки в даному випадку слід розглядати як приблизно ізоенергетичний наслідок заміни частини водневих зв'язків з водою на контакти між полярними поверхнями – головним чинником зв'язування є неспецифічні щодо нуклеотидної послідовності ДНК електростатичні взаємодії.

Нуклеосомна ДНК зв'язана з глобулярною частиною октамера гістонів, кінцеві неупорядковані хвости гістонів практично не беруть у цьому участі. N-кінцеві хвости гістонів H3 та H2B виходять за межі нуклеосоми через канали, сформовані маленькими жолобками двох дуплексів сусідніх витків нуклеосомної суперспіралі (рис. 15, кольор. вст.) – один з чотирьох хвостів H3 та H2B проходить через такий канал через кожні ~20 пар основ уздовж нуклеосомної ДНК: між SHL +6,5 та -0,5 і -6,5 та +0,5 (H3); між SHL +4,5 та -2,5 і -4,5 та +2,5 (H2B). Ділянки хвостів, які безпосередньо розташовані в каналах, є позитивно зарядженими і, таким чином, додатково скріплюють сусідні витки суперспіралі. Іншим наслідком такого розташування чотирьох хвостів є сама необхідність створення каналів, тобто точного розташування маленьких жолобків сусідніх витків один напроти одного, що накладає певні обмеження на спіральну періодичність нуклеосомної ДНК. N-кінцеві хвости гістонів H4 та H2A взаємодіють з маленьким жолобком зовні нуклеосомної суперспіралі. Особливе місце – входу/виходу нуклеосомної ДНК – займають найбільш довгі N-кінцеві хвости гістона H3. Позитивно заряджений хвіст H3 стабілізує структуру нуклеосоми в цій зоні, де спостерігається найвища щільність негативних зарядів ДНК.

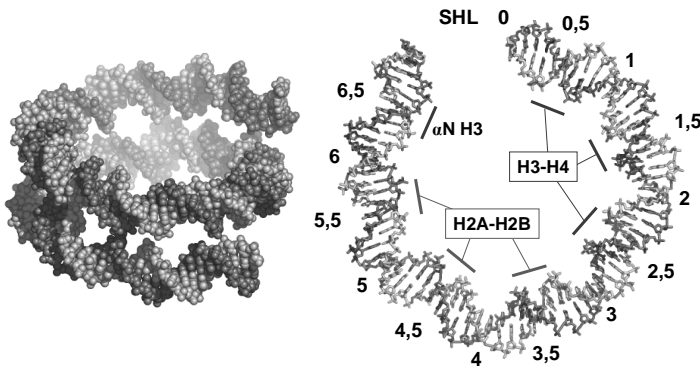
Зазначеним внеском у стабілізацію нуклеосоми роль хвостів не обмежується. Значна частина гістонових хвостів просто виходить за межі нуклеосоми (рис. 15, кольор. вст.). Завдяки своїй структурній лабільності вони приймають участь в організації хроматину на наднуклеосомному рівні (розділ 4), а також відіграють важливу роль платформи для зв'язування різноманітних білків, спорідненість до яких визначається

посттрансляційними модифікаціями хвостів (підрозділ 2.3). Остання роль хвостів є одним із ключових елементів системи регуляції транскрипції (розділ 5).

Оскільки позитивно заряджені хвости дають внесок у додаткову стабілізацію нуклеосоми, одна з модифікацій, яка знижує позитивний заряд хвостів, – ацетилювання (загалом більше 30 залишків може бути ацетильовано в складі нуклеосоми) – призводить до часткової дестабілізації структури. Ацетилювання не впливає на структуру нуклеосоми (яка практично не залежить від хвостів), але змінює характер структурної динаміки як нуклеосоми (підрозділ 3.3), так і хроматинової фібрили на наднуклеосомному рівні її організації (розділ 4).

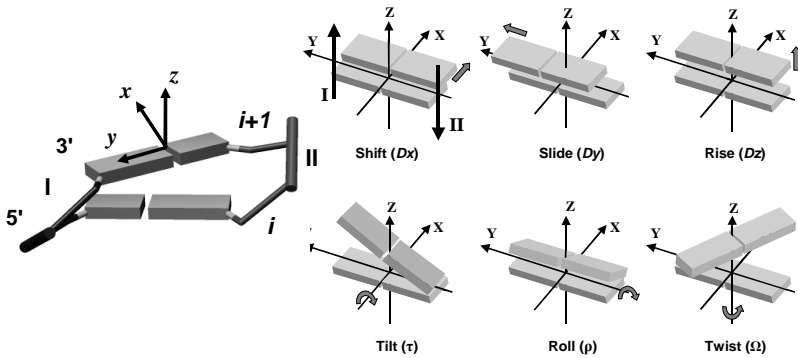
**3.1.2. Структура ДНК у нуклеосомі.** На рис. 3.2 зображено нуклеосомну ДНК та одну з її симетричних половин. Очевидно, що подвійна спіраль є значно вигнутою на поверхні октамера гістонів, а загальна конфігурація її осі може бути апроксимована ідеальною лівою суперспіраллю із радіусом 41,9 Å і кроком 25,9 Å. Центральні 133 пари основ такої суперспіралі дають 1,67 витка, дві ділянки по 7 пар основ на вході/виході просто продовжують хід нуклеосомної ДНК по прямій. Нуклеосомна суперспіраль є майже ідеальною. Щоб з'ясувати, що означає “майже“ в попередньому реченні, слід спочатку зупинитись на тому, як має змінитись конформація дуплекса для утворення *ідеальної* суперспіралі.

Ідеальна спіральна лінія характеризується, зокрема, тим, що в кожній точці має постійне значення кривизни, яка однозначно визначається радіусом та кроком спіралі. Для ДНК “кожна точка“ – це кожен динуклеотидний крок уздовж подвійної спіралі, а кривизна є пропорційною до кута вигину  $\Gamma$  між сусідніми парами основ, який, у свою чергу, залежить від значень конформаційних кутів ролла  $\rho$  та тилта  $\tau$  (див. нижче).



**Рис. 3.2.** ДНК довжиною 147 пар основ у нуклеосомі (зі структури на рис. 13, кольор. вст.) та одна з її симетричних половин (73 + одна центральна пара основ). Вказано суперспіральні позиції SHL та сайти взаємодії з гістоновими димерами й  $\alpha$ N-спіраллю H3.

Взагалі для визначення конформації подвійної спіралі необхідно та достатньо для кожного динуклеотидного кроку визначити шість конформаційних параметрів, що задають відносні орієнтації сусідніх пар основ. До кожної пари ставиться у відповідність локальна декартова система координат (рис. 3.3). Два ланцюги, яким належать основи пари, позначаються як ланцюги I та II (довільно, але за ланцюг I приймається той, для якого записується послідовність нуклеотидів у напрямку від 5'-до 3'-кінця; абсолютні значення описаних нижче параметрів не залежать від нумерації ланцюгів). Вісь Y лежить у площині пари основ та спрямована від ланцюга II до ланцюга I (позитивний напрям). Перпендикулярна вісь Z (нормаль до пари основ) спрямована на наступну (у напрямку 5'-3' по першому ланцюгу) пару основ. Напрямок осі X обирається за правилами утворення правої декартової системи координат – жолобок, на який вона спрямована, позначається як “великий“ (для В-форми ДНК цей жолобок є дійсно більшим за розмірами). Шість параметрів, графічно представлених на рис. 3.3, характеризують конформацію динуклеотидного кроку – двох сусідніх пар основ:



**Рис. 3.3.** Дві пари основ у молекулі ДНК і локальна декартова система координат, пов'язана з однією з них. Праворуч: шість параметрів, що описують конформацію двох сусідніх пар основ.

Пари основ орієнтовані до глядача маленьким жолобком, для першої структури позначено полінуклеотидні ланцюги. Стрілочками позначено позитивний напрямок зміни параметрів (для кутів – обертання за годинниковою стрілкою, якщо дивитись вздовж позитивного напрямку осі).

- *шифт* (shift,  $Dx$ ) – зміщення вздовж осі  $X$  – характеризує зсув другої пари основ відносно першої (у порядку нумерації по першому ланцюгу) у напрямку одного з жолобків (позитивне значення відповідає зсуву у великий жолобок, при зміні нумерації ланцюгів шифт змінює знак);
- *слайд* (slide,  $Dy$ ) – зміщення вздовж осі  $Y$  – характеризує зсув у напрямку цукрофосфатного остова (позитивне значення відповідає зсуву у напрямку першого ланцюга, знак слайда не залежить від нумерації ланцюгів);
- *райз* (rise,  $Dz$ ) – зміщення вздовж осі  $Z$  – характеризує відстань між парами основ уздовж нормалі до першої пари;
- *тилт* (tilt,  $\tau$ ) – кут обертання другої пари відносно першої навкруг осі  $X$  – характеризує локальний вигин у напрямку цукрофосфатного остова (позитивне значення відповідає вигину

в бік другого ланцюга, при зміні нумерації ланцюгів тилт змінює знак);

- *ролл* (roll,  $\rho$ ) – кут обертання навкруг осі Y – характеризує локальний вигин подвійної спіралі у напрямку одного з жолобків (позитивне значення відповідає вигину в бік великого жолобка, знак ролла не залежить від нумерації ланцюгів);

- *twist* (twist,  $\Omega$ ) – кут обертання другої пари навкруг нормалі до першої, який характеризує ступінь спірального закручення (позитивне значення відповідає правій спіралі, негативне – лівій).

Серед трьох перелічених конформаційних кутів *twist* описує ступінь торсійного закручення подвійної спіралі, а тилт та ролл – її вигину. Сумарний локальний кут вигину між двома парами основ  $\Gamma = (\tau^2 + \rho^2)^{1/2}$ , конкретний напрямок вигину визначається співвідношенням між роллом та тилтом. Одна з можливостей реалізувати постійну кривизну полягає в тому, щоб конформаційні кути змінювались від одного кроку до іншого періодично та зі зсувом по фазі на чверть періоду:

$$\begin{aligned}\rho &= \Gamma \cos(i\Omega_{loc}), \\ \tau &= \Gamma \sin(i\Omega_{loc}),\end{aligned}\tag{3.1}$$

де  $i$  – порядковий номер пари основ (другої пари кроку), який приймає позитивні та негативні значення, починаючи від центральної пари нуклеосомної ДНК із нульовим номером,  $\Omega_{loc}$  – певний кут, що визначає періодичність. Легко бачити, що в такому випадку сума квадратів двох кутів є для кожного кроку постійною величиною – рівняння (3.1) визначають суперспіральну конфігурацію із постійною кривизною. Крок такої суперспіралі залежить від співвідношення між кутом *twist*  $\Omega$  на кожному кроці та  $\Omega_{loc}$ . Нехай  $\Omega_{loc} = \Omega$  і на деякому кроці аргумент тригонометричних функцій в рівн. (3.1) є кратним до  $360^\circ$  – ролл набуває максимального позитивного значення  $\Gamma$  (вигин у великий жолобок), тилт дорівнює нулю. Через чверть витка подвійної спіралі у тому ж напрямі на поверхні дуплекса, де на вихідному кроці розміщувався великий

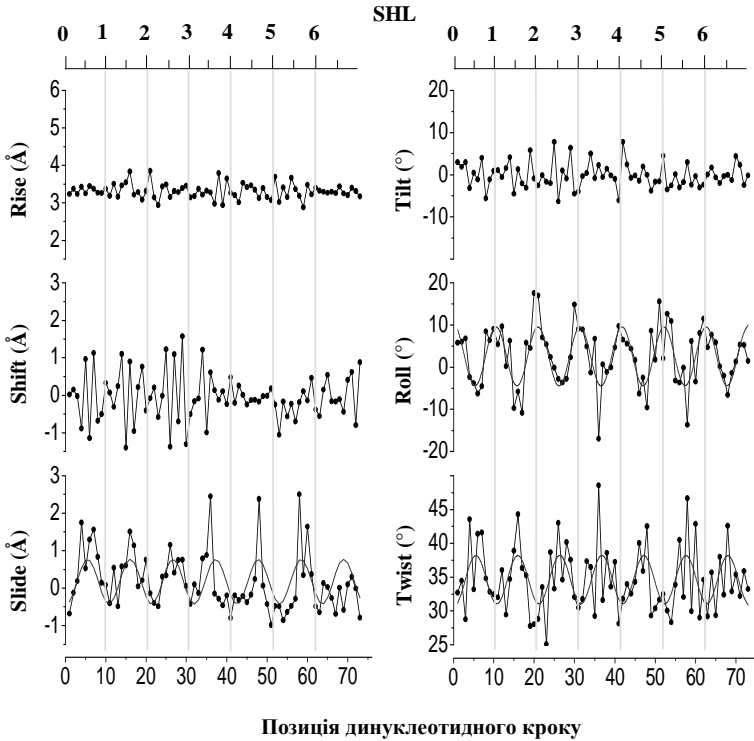


жолобок, знаходиться один з ланцюгів; в цій точці ( $\Omega_{loc} = \Omega$  змінився на  $90^\circ$ )  $\rho = 0$ ,  $\tau = \Gamma$  – вигин в бік цукрофосфатного остова, але в тому самому напрямі, що й на вихідному кроці. Через піввитка місце великого жолобка займає маленький жолобок –  $\rho = -\Gamma$ ,  $\tau = 0$ ; через виток знову маємо максимальний ролл у тому самому напрямі, що на вихідному кроці. Тобто, реалізується вигин ДНК в одній площині: крок суперспіралі дорівнює нулю. Щоб суперспіраль була лівою, точки максимального значення ролла та тилта мають бути розділеними дещо меншою кількістю пар основ, ніж укладається на повний виток дуплекса. Тобто необхідно, щоб виконувалась умова  $\Omega_{loc} > \Omega$  (для правої суперспіралі – навпаки). Різниця  $\Omega_{loc} - \Omega$  є при цьому пропорційною до так званого геометричного кручення, а величина  $\Omega_{loc}$  – це кут локального твіста, який визначає періодичність контактів ДНК із поверхнею октамера гістонів.

Отже, для створення ідеальної лівої суперспіралі ДНК необхідно, щоб ролл та тилт змінювались періодично вздовж подвійної спіралі з однаковою амплітудою за рівн. (3.1), а також щоб кут локального твіста, який визначає цю періодичність, був більшим за кут твіста подвійної спіралі. Реальні конформаційні параметри нуклеосомної ДНК, які демонструють відхилення від такої “ідеальної поведінки”, представлено на рис. 3.4.

По-перше, у відповідності з анізотропією подвійної спіралі щодо вигину (ДНК значно легше вигинається в бік жолобків, а не цукрофосфатного остова), ролл дає значно більший внесок у вигин нуклеосомної ДНК, ніж тилт. Якщо варіації останнього є досить безладними, то ролл змінюється періодично з високою амплітудою. При цьому вигин у бік великого жолобка (позитивний ролл) є суттєво більшим у порівнянні з вигином в бік маленького жолобка. Крім того, спостерігаються різкі вигини в декількох місцях, імовірно пов’язані з особливостями конкретної послідовності ДНК: наприклад, три різкі негативні вигини в SHL 3,5; 4,5 та 5,5 (рис. 3.4) трапляються на кроках CA/TG. Такі залежні від послідовності особливості конформації ДНК відображають певний структурний поліморфізм нуклеосом

(див. нижче). Отже, вигин нуклеосомної ДНК головним чином визначається змінами ролла.



**Рис. 3.4.** Конформаційні параметри половини нуклеосомної ДНК, розраховані зі структури на рис. 3.5 за допомогою програмного пакету 3DNA (Lu, X.-J., Olson, W.K. 3DNA: a software package for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic acid structures // Nucl. Acids Res. – 2003. – V. 31. – P. 5108-5121). Динуклеотидні кроки пронумеровано від центру нуклеосомної ДНК до периферії. Суцільні криві – апроксимації залежностей синусоїдами.

Періодична зміна твіста є цілком очікуваною і відображає добре відому негативну кореляцію між цим параметром та

роллом (підвищення одного кута зазвичай супроводжується зниженням іншого, інакше кажучи, вигин у великий жолобок часто супроводжується розкручуванням спіралі, а вигин у маленький – закручуванням). Середнє значення твіста відповідає періодичності 10,4 п.о./виток подвійної спіралі в нуклеосомі – тобто, дещо менше, ніж для вільної ДНК у розчині (зазвичай  $\sim 10,5$  п.о./виток). При цьому осциляція ролла відбувається практично з таким самим періодом – всупереч очікуванням, твіст та локальний твіст практично не відрізняються один від одного в нуклеосомній суперспіралі.

Натомість, спостерігається неочікувана періодична зміна слайда: кожного разу, коли великий жолобок є орієнтованим до поверхні октамера гістонів (цілі значення SHL), слайд має негативні значення (у середньому  $\sim -0,5$  Å): реалізується зсув пари основ у напрямку другого ланцюга, тобто зсув відбувається вздовж осі нуклеосомної суперспіралі у напрямку, що відповідає самі лівій спіралі (праворуч на рис. 3.3., див. також рис. 13, 16, кольор. вст.). Коли до поверхні октамера орієнтований маленький жолобок, слайд має позитивні значення (більш ніж вдвічі більші за абсолютною величиною в порівнянні з великим жолобком): зсув до першого ланцюга, який через піввитка дуплекса займає місце другого ланцюга на поверхні ДНК (рис. 16, кольор. вст.).

Таким чином, суперспіральність нуклеосомної ДНК визначається періодичною зміною слайда: якщо в структурі нуклеосомної ДНК зберегти всі конформаційні параметри як вони є, але задати нульове значення слайда на кожному кроці, реалізується вигин подвійної спіралі в одній площині (рис. 16, кольор. вст.).

Що стосується двох інших конформаційних параметрів зсуву, шифт варіює безладно (іноді в досить широких межах), відображаючи певні нерегулярності в структурі ДНК, залежні від вигинів (кореляцій між різними параметрами) та/або від особливостей послідовності. Райз варіює в дуже вузьких межах (середнє значення  $3,35$  Å), що вказує на збереження міцних стекінг-взаємодій між парами основ у нуклеосомній ДНК.

Повертаючись до кутових параметрів, слід особливо зупинитись на різниці між середнім твістом ДНК у нуклеосомі та в розчині, яка свідчить про торсійну деформацію подвійної спіралі (закручування) на поверхні октамера гістонів. Це закручування, так само як і вигин, зумовлене ДНК-гістоновими взаємодіями – розподіл позитивно заряджених сайтів зв'язування по поверхні октамера вимагає зміни твіста для підведення фосфатних залишків під міцні контакти. Крім того, обмеження на твіст накладаються необхідністю сформувати канали виходу гістонових хвостів між двома витками суперспіралі (попередній підпідрозд.). Проте, структура нуклеосомі допускає досить значні залежні від послідовності варіації твіста, як локальні, так і в середньому по нуклеосомній ДНК.

Досі в цьому розділі обговорювалась одна кристалічна структура нуклеосомі (нуклеосома-147), яка містить спеціально сконструйовану молекулу ДНК довжиною 147 пар основ: два однакові за послідовністю інвертовані фрагменти довжиною по 73 пари основ (фрагмент походить з  $\alpha$ -сателітної – центромерної – ДНК людини) плюс одна пара між ними. Тобто, загальна послідовність являє собою паліндром – за винятком центрального нуклеотиду, читається однаково по обом ланцюгам від 5'- до 3'-кінця. Таким чином, і послідовність, і структура нуклеосомі характеризуються ідеальною симетрією другого порядку. У більшості кристалографічних робіт щодо структури нуклеосомі (за єдиним виключенням, див. нижче), крім цього фрагменту ДНК, були використані ще три інші (які також походять з  $\alpha$ -сателіту людини) – дві довжиною по 146 пар основ, та одна – 145 пар основ. Послідовність ДНК нуклеосомі-145 відрізняється від нуклеосомі-147 відсутністю двох симетричних пар основ на кінцевих ділянках. Обидві послідовності в складі нуклеосом-146 складаються з двох інвертованих повторів по 73 пари основ кожен. Повтор першої нуклеосомі практично співпадає за послідовністю (за винятком однієї пари основ) з повтором, використаним у нуклеосомі-147. Послідовність повтору другої нуклеосомі-146 є іншою (використано інший  $\alpha$ -сателітний повтор). Оскільки вісь

симетрії другого порядку проходить точно через пару основ, обидві структури зі 146 парами основ виявились дещо асиметричними – одна центральна пара та дві половини нуклеосомної ДНК довжиною 73 та 72 пари основ.

Асиметрія нуклеосомної ДНК довжиною 146 пар основ проявляється в тому, що більш коротка половина змушена, заради реалізації контактів з поверхнею октамера гістонів (який зберігає симетрію), трохи розтягнутися (дещо зростає райз) та збільшити закручення – сумарна кількість витків дуплекса залишається такою самою, що й для більш довгої половини, а кількість пар основ є зменшеною на 1. В результаті середній кут твіста коротшої половини зростає (кількість пар основ на виток дуплекса зменшується). Середнє значення твіста в двох нуклеосомах-146 відповідає періодичності подвійної спіралі 10,23 та 10,15 п.о./виток. В першій нуклеосомі довша та коротша половини мають, відповідно, 10,3 та 10,16 п.о./виток, в другій – 10,22 та 10,08 п.о./виток.

Зростання кута твіста та розтягування реалізуються локально на ділянках довжиною по ~12 пар основ, але в різних місцях для двох нуклеосом: в області SHL  $-2$  або  $-5$  (якщо для довшої половини використовувати позитивні значення SHL). У довшій половині саме ці місця характеризуються меншими, у порівнянні з іншими ділянками, значеннями твіста – локальне розтягування/закручування (stretching/overtwisting) відбувається там, де подвійна спіраль більш легко може здійснити торсійну деформацію. Нуклеосома-145 є симетричною, але в ній в обох половиних спостерігається розтягування/закручування в SHL  $\pm 2$  (на ділянці довжиною ~9 пар основ зростає райз до 3,63 Å та кут твіста); і середній кут твіста відповідає 10,26 п.о./виток. Таким чином, навіть одна й та сама послідовність (у нуклеосомах-145 та -147) при утворенні нуклеосоми має "вибір" – або зберегти мінімальне значення райза та твіста, або трохи розтягнутись та збільшити закручення у певному невеликому сайті.

Найімовірніше, такий сайт розтягування/закручування може бути локалізований тільки в двох місцях – в SHL  $\pm 2$  або  $\pm 5$ , тобто в позиціях, які фланковані однотипними сайтами взаємодії ДНК з поверхнею гістонових димерів H3-H4 та H2A-

H2В відповідно (рис. 3.1, 3.2). Ця закономірність була підтверджена у ще одній кристалографічній роботі, де досліджувалась структура нуклеосоми, що містить так звану "послідовність 601" – синтетичну випадкову нуклеотидну послідовність, відібрану як така, що має підвищений потенціал щодо позиціонування нуклеосоми (розділ 4). Нуклеосома-601 містить 145 пар основ ДНК (послідовність є асиметричною), середній кут твіста відповідає 10,09 п.о./виток, розтягування/закручування реалізується локально на ділянках по ~13 пар основ в оточенні SHL  $\pm 5$ . Слід зауважити, що, не дивлячись на асиметрію послідовності 601, дві половини октамера гістонів у складі нуклеосоми-601 характеризуються симетрією, більше того – структура октамера у складі нуклеосом-147 та 601, не дивлячись на відмінності у конформації ДНК, є дуже подібною. Отже, октамер гістонів, зберігаючи більш-менш жорстку структуру, "вимагає" від ДНК реалізувати контакти з гістонами, а подвійна спіраль адаптується під ці контакти, змінюючи свою конформацію у певних межах залежно від своєї нуклеотидної послідовності.

Спіральна періодичність ДНК для нуклеосом, що містять інші послідовності, досить широко досліджувалася за допомогою футпринтинга – розщеплення ДНК у нуклеосомі ДНКазою I або вільними радикалами. ДНКаза I та вільні OH<sup>\*</sup>-радикали розщеплюють тільки експоновані зони кожного ланцюга ДНК з боку маленького жолобка; ділянки, які зв'язані з гістонами, залишаються захищеними. М'яка обробка ферментом чи радикалами дає, таким чином, набір фрагментів, розмір яких є кратним до періодичності експонування, що можна проаналізувати за допомогою електрофорезу в денатуруючих умовах. За цими даними періодичність варіює від 9,9 до 10,5 п.о./виток, в середньому дорівнює 10,2-10,3 п.о./виток.

Отже, властивості конкретної послідовності, яка входить до складу нуклеосоми, визначають особливості її конформації – у відповідності до загальних уявлень щодо білково-нуклеїнових взаємодій, відбувається тонка підгонка конформації ДНК під поверхню октамера гістонів. Відповідно, нуклеосомам притаманний певний структурний поліморфізм – саме такий

поліморфізм, власне, і не дозволяє отримати структурну інформацію високого розділення на кристалах нуклеосом, приготованих просто з тотального препарату нуклеосом хроматину.

### 3.2. Механізми стабілізації нуклеосоми

Як і для будь-якої іншої структури, стабільність нуклеосоми можна описати в термінах вільної енергії, яка характеризує імовірність реалізації того чи іншого стану тієї чи іншої системи. Зниження вільної енергії завжди відповідає підвищенню імовірності – зростанню стабільності. Вільна енергія будь-якої системи складається з певного набору стабілізуючих (із негативним знаком) і дестабілізуючих (із позитивним знаком) внесків: баланс між ними й визначає ступінь стабільності.

Описані в попередньому підрозділі значні деформації нуклеосомної ДНК потребують енергетичних витрат. Щоб приблизно оцінити найбільш вагомий дестабілізуючий внесок від вигину ДНК, можна скористатись добре відомим рівнянням для енергії вигину  $G_b$  еластичного стрижня:

$$G_b = kT \frac{as}{2R^2},$$

де  $kT$  – енергія теплових флуктуацій,  $a = 50$  нм – так звана персистентна довжина ДНК (міра гнучкості молекули),  $s$  – загальна контурна довжина фрагмента ДНК,  $R$  – радіус кривизни, що в даному випадку визначається радіусом та кроком нуклеосомної суперспіралі. За цим рівнянням вигин 133 пар основ із радіусом кривизни 4,23 нм (виходячи з параметрів суперспіралі, що визначають кривизну) потребує 62 одиниць  $kT$ . Крім деформацій ДНК, ще одним дестабілізуючим внеском у вільну енергію нуклеосоми є електростатичне розштовхування між сусідніми витками суперспіралі ДНК.

Стабілізують нуклеосому, компенсуючи несприятливі внески, кілька факторів. Першим є взаємодії – насамперед,

електростатичні – між ДНК та гістонами, які утримують деформовану подвійну спіраль на поверхні октамера гістонів. Але не менш важливими є гістон-гістонові взаємодії, що забезпечують цілісність самого октамера. При цьому останні, в першу чергу це стосується взаємодій між димерами H2A-H2B та тетрамером (H3-H4)<sub>2</sub>, залежать від електростатичних ДНК-гістонових взаємодій – міцний контакт між димером та тетрамером є можливим за умови нейтралізації позитивних зарядів гістонів фосфатами ДНК. Інакше кажучи, взаємодія гістонових комплексів з ДНК забезпечує можливість утворення октамера, і тоді вигнутий стан нуклеосомної ДНК підтримується одночасно її адсорбцією на поверхні комплексів та взаємодіями між самими комплексами. Відповідно, розгортання нуклеосомної ДНК є можливим у два способи: або внаслідок порушення електростатичних взаємодій з гістонами, або шляхом порушення гістон-гістонових взаємодій, наприклад, у присутності денатурантів, коли нуклеосома ДНК розгортається разом зі зв'язаними з нею гістонами. Додатковими факторами, що стабілізують структуру нуклеосоми, є асиметрична нейтралізація зарядів подвійної спіралі гістонами зі внутрішнього боку вигину (така нейтралізація завжди сприяє вигину ДНК) та присутність позитивно заряджених неупорядкованих хвостів, які знижують електростатичне розштовхування сусідніх витків нуклеосомної суперспіралі.

Серед зазначених внесків у вільну енергію нуклеосоми тільки один – енергія деформацій подвійної спіралі – залежить від послідовності пар основ, усі інші є неспецифічними. Відповідно, нуклеосоми прагнуть утворюватись на таких ділянках ДНК, які можна легше деформувати – саме такий механізм лежить в основі важливого феномена переважного позиціонування нуклеосом відносно послідовності, який розглядатиметься у розділі 4. Зараз слід тільки зауважити, що різниця вільних енергій між різними позиціями нуклеосом є досить невисокою – в принципі, якщо “немає вибору“, нуклеосома може сформуватись практично на будь-якій природній послідовності.



Усі неспецифічні внески у вільну енергію так чи інакше залежать від іонної сили. Відповідно, зміни концентрації соли допомагають змінити баланс вільної енергії у той чи інший бік і тим самим виявити ті чи інші взаємодії. Так, за дуже низької іонної сили (1–2 mM NaCl) у нуклеосомі спостерігається так званий низько-сольовий структурний перехід: розгортання кінцевих ділянок нуклеосомної ДНК при збереженні контактів з ними димерів H2A-H2B (електростатичні ДНК-гістонові контакти можуть лише підсилюватись при зниженні іонної сили). Рушійною силою низько-сольового переходу є зростання електростатичного розштовхування між сусідніми витками нуклеосомної суперспіралі, яка, подібно пружині, розгортається, руйнуючи контакти димера H2A-H2B із тетрамером (H3-H4)<sub>2</sub>. Ензиматичне видалення невпорядкованих гістонових хвостів (тобто зниження ступеня нейтралізації негативних зарядів, насамперед, на кінцевих ділянках нуклеосомної ДНК) полегшує цей структурний перехід, зсуваючи його до дещо вищих концентрацій соли.

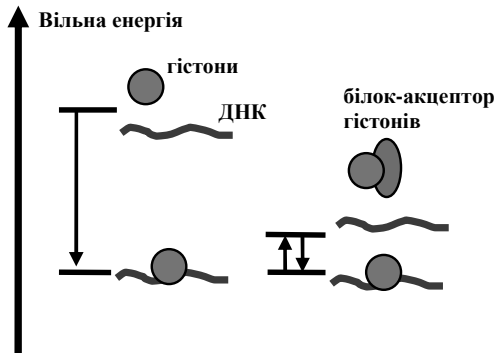
За фізіологічної іонної сили *in vitro* нуклеосома характеризується високою стабільністю. Електростатичні взаємодії є настільки міцними, що виключають не тільки тимчасову дисоціацію гістонових комплексів, а й навіть трансляційні переміщення нуклеосоми вздовж ДНК (слайдинг). У зв'язку з тим, що взаємне розташування ДНК і октамера гістонів є жорстко детермінованим (попередній підрозділ), переміщення нуклеосоми потребує появи високо-енергетичних інтермедіатів (часткове розгортання нуклеосомної ДНК або її прокручування по поверхні октамера). За фізіологічних умов ці інтермедіати не є вірогідними. Відповідно, зміна позицій нуклеосом в клітині потребує наявності спеціальних АТР-залежних молекулярних машин – комплексів ремоделювання хроматину (розділ 5), що полегшують утворення таких інтермедіатних станів.

В діапазоні 0,3-0,6 M NaCl спостерігається дисоціація від ДНК невпорядкованих гістонових хвостів, а також ефективний слайдинг нуклеосом: у вказаних умовах вільна енергія інтермедіатних станів стає порівняною з енергією теплових

флуктуацій, що робить можливими зміни позицій нуклеосом вздовж ДНК. Відповідно, зростання температури також підвищує ефективність слайдингу. Подальше зростання концентрації солі індукує двоступеневу дисоціацію нуклеосоми: в діапазоні 0,7–1,2 М NaCl дисоціюють димери H2A-H2B, у 1,2–2,0 М NaCl – тетрамер (H3-H4)<sub>2</sub>, який взагалі є одним з найбільш міцно зв'язаних з ДНК білків.

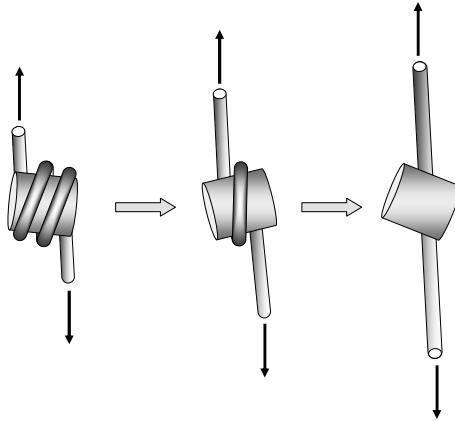
Оскільки електростатичні взаємодії між ДНК та гістонами за фізіологічних умов дуже міцні, зв'язування гістонів з ДНК є практично необоротним – дуже висока константа зв'язування (див. нижче) робить неможливою рівновагу між зв'язаними та дисоційованими гістонами. Відповідно, хоча структура нуклеосоми відповідає мінімуму вільної енергії, цього мінімуму неможливо досягти за розумний проміжок часу: при змішуванні гістони швидко та безладно зв'язуються з ДНК без подальшої дисоціації. Реконструкція нуклеосоми *in vitro* можлива шляхом поступового зниження концентрації солі в суміші ДНК та гістонів від 2 М до фізіологічних або більш низьких значень за допомогою ступеневого діалізу. В таких умовах за проміжних концентрацій солі, коли електростатичні взаємодії ще не є надто ефективними, відбувається рівноважне зв'язування та формування нуклеосомної структури. Подальше зниження іонної сили “заморожує” цю структуру.

Для реалізації рівноважних умов ДНК-гістонової взаємодії *in vivo* у хроматині існують проміжні акцептори гістонів – хроматинові шаперони, що виконують роль факторів збірки/руйнування нуклеосом, які згадувались у розділі 2. Ці акцептори мають спорідненість до гістонів трошки меншу, ніж спорідненість гістонів до ДНК (рис. 3.5), що й забезпечує можливість рівноважного обміну гістонами між ДНК та проміжними акцепторами зі зсувом цієї рівноваги у бік ДНК-гістонових комплексів. Наявність проміжних акцепторів гістонів призводить до можливості обміну димерами H2A-H2B між різними нуклеосомами: тимчасове видалення димерів є важливим шляхом структурної динаміки хроматину в клітині.



**Рис. 3.5.** Роль проміжних акцепторів гістонів у збірці нуклеосоми: дисоціація гістонів є практично забороненою за фізіологічної іонної сили; у присутності акцептора взаємодія гістонів з ДНК стає рівноважною.

Стабільність нуклеосоми може бути випробувана за допомогою механічних маніпуляцій з індивідуальними молекулами. Одна з таких технік використовує так звану оптичну пастку. Оптична пастка створюється лазерним променем, сфокусованим в певній точці, де утримується невеличка полістиренова кулька, пришта до кінця молекули ДНК. Інший кінець пришивають, наприклад, до кінчика мікропіпетки, що може рухатись, завдяки чому створюється розтягувальна сила різної величини. У роботі Mihardja *et al.* (2006) за допомогою техніки оптичної пастки досліджувалось розтягування зовнішньою силою молекули ДНК, на якій знаходилась одна нуклеосома. Внаслідок закручування ДНК у нуклеосомі, загальна довжина такої конструкції у розтягнутому стані є меншою за сумарну контурну довжину ДНК, і нуклеосома чинить спротив остаточному розтягуванню до цієї контурної довжини. Остаточне розтягування реалізується при збільшенні розтягувальної сили і відбувається в два етапи. Перший етап відповідає розгортанню кінцевих ділянок (в нуклеосомі залишається ~1 виток суперспіралі), другий – розгортанню центрального витка нуклеосомної ДНК (рис. 3.6).

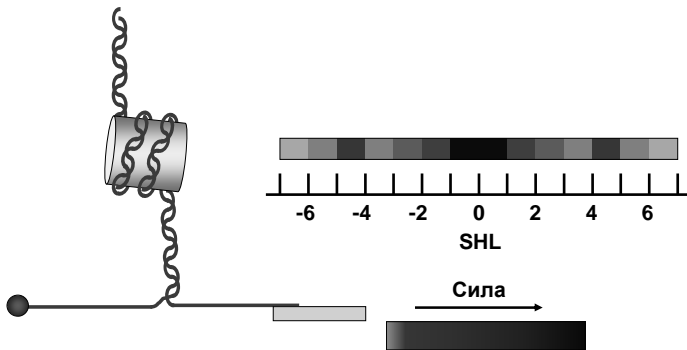


**Рис. 3.6.** Двоступеневе розкручування нуклеосомної суперспіралі під дією зовнішньої сили (адаптовано з роботи Mihardja *et al.*, 2006).

Другий перехід складно аналізувати кількісно, тому що він характеризується гістерезисом – повернення до вихідного стану при зменшенні розтягувальної сили відбувається із запізненням, при меншому значенні сили, ніж та, за якої перехід починався. Але перший перехід описується стандартною моделлю двох станів: за проміжного постійного значення сили довжина молекули осцилює між двома значеннями, що відповідають двом станам. Аналіз отриманих залежностей дозволяє оцінити константи швидкості прямого та зворотного переходу, а отже і константу рівноваги, у відсутності розтягувальної сили. Оцінки вказують, що спонтанне розгортання кінцевих ділянок (довжиною по  $\sim 30$  пар основ) нуклеосомної ДНК є рідкою подією: у розгорнутому стані нуклеосома проводить  $\sim 17$  мс проти  $\sim 44$  хв у компактному стані. Різниця вільних енергій між двома станами становить  $\sim 12$  одиниць  $kT$ . Екстраполяція цієї величини до всієї нуклеосоми дає грубу оцінку вільної енергії утворення нуклеосоми  $\sim -30 kT$ , що відповідає екстраординарно високій константі рівноваги  $\sim 10^{13} M^{-1}$ . Якщо врахувати оцінений вище найбільш вагомий дестабілізуючий внесок від вигину

ДНК, стабілізуючі внески у вільну енергію нуклеосоми мають становити  $\sim -90 \text{ kT}$ .

При цьому ефективність взаємодій ДНК з поверхнею октамера гістонів не є однорідною по довжині. Про це свідчить хоча б дуже різна концентрація солі, що є необхідною для дисоціації димерів H2A-H2B та тетрамера (H3-H4)<sub>2</sub> (див. вище). На відносну слабкість взаємодій на кінцях нуклеосомної ДНК вказує також різна термостабільність нуклеосомної ДНК: взагалі гістони відіграють роль “скріпки” (підвищують температуру плавлення подвійної спіралі у порівнянні з вільною ДНК), але при цьому центральні ділянки нуклеосомної плавляться за більш високих температур, ніж кінцеві. Пряму оцінку відносної сили ДНК-гістонових взаємодій по довжині нуклеосомної ДНК було здійснено за допомогою ще однієї з сучасних технік маніпуляцій з індивідуальними молекулами – розстібання подвійної спіралі (unzipping). Схему експерименту наведено на рис. 3.7: на дволанцюговій молекулі ДНК знаходиться нуклеосома, кінець одного ланцюга зафіксований в оптичній пастці, кінець іншого пришито до поверхні скельця, що рухається.



**Рис. 3.7.** Схема експерименту з розстібання подвійної спіралі ДНК (пояснення в тексті) та карта відносної сили ДНК-гістонових взаємодій вздовж нуклеосомної ДНК (адаптовано з роботи Hall *et al.*, 2009).

Під дією зовнішньої сили подвійна спіраль розкручується, а взаємодії ДНК з гістонами змушують скелце загальмуватись на певний час – розкручуванню передує відрив подвійної спіралі від поверхні октамера гістонів. Час гальмування відображає силу ДНК-гістонових взаємодій, а відстань між двома одноланцюговими кінцями ДНК, на якій це гальмування трапляється, – точку вздовж нуклеосомної ДНК, де реалізуються ці взаємодії. Результати вказують, що гальмування відбувається з періодичністю в  $\sim 5$  нуклеотидів, відображаючи взаємодії гістонів з двома ланцюгами ДНК. Найслабкіші ДНК-гістонові контакти мають місце в  $SHL \pm 6,5$  (див. рис. 3.1); відносно слабкі контакти – в  $SHL \pm 5,5$ , а також  $\pm 3,5$  та  $\pm 2,5$ ; зона більш сильних контактів знаходиться в оточенні  $SHL \pm 4,5$ ; найміцніші контакти реалізуються на ділянці між  $SHL -1,5$  та  $+1,5$ .

Наведені дані щодо структурних перетворень нуклеосоми стосуються досить екстремальних, цілком нефізіологічних впливів. Проте вони вказують на деякі “слабкі місця” у структурі, в яких можна очікувати перебудов нуклеосоми у фізіологічних умовах. Таких місць можна назвати принаймні два: кінцеві сегменти нуклеосомної ДНК, які найменш міцно стабілізовані у нуклеосомі, та контакти між димерами H2A-H2B та тетрамером (H3-H4)<sub>2</sub>.

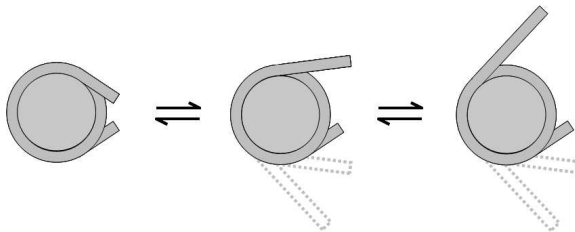
### 3.3. Конформаційна рухливість нуклеосоми

**3.3.1. Тимчасове розгортання кінцевих ділянок нуклеосомної ДНК** є одним з основних шляхів конформаційних перебудов за фізіологічних умов. З одного боку, висока щільність негативного заряду (контакт між сусідніми витками нуклеосомної суперспіралі) дестабілізує нуклеосомну ДНК на виході з нуклеосоми, з іншого – ДНК-гістонові взаємодії на кінцевих ділянках є більш слабкими, ніж у центральній частині нуклеосомної ДНК.

Наведені в попередньому підпідрозділі приблизні оцінки дають  $-30$  кТ як вільну енергію утворення нуклеосоми за фізіологічних умов. Але розгортання нуклеосомної ДНК має

здійснюватись не за принципом “все або нічого“, а поступово, починаючи з кінця ДНК – ДНК-гістонові контакти будуть тоді руйнуватись один за одним (рис. 3.1, 3.8). Порушення двох контактів – по одному на обох кінцях в  $SHL \pm 6/5$  – залишає  $\sim 1,4$  витки суперспіралі (1,67 витка відповідають 133 парам основ, 1 виток – 80 парам). Якщо по два контакти зруйновані на кінцях, суперспіраль, що залишилась, містить  $\sim 1,2$  витки.

Виходячи з наведеної сумарної оцінки вільної енергії, руйнування одного контакту – розгортання ділянки довжиною один виток подвійної спіралі – коштує в середньому  $\sim 2 kT$  (на кінцях трохи менше, всередині нуклеосомної ДНК – більше). Ця енергія, наближена до енергії теплових флуктуацій, вказує на можливість спонтанного тимчасового розгортання коротких кінцевих ділянок нуклеосомної ДНК за фізіологічних умов. Виходячи з наведеної оцінки вільної енергії розгортання, константа рівноваги  $K$  між розгорнутим та компактним станами одного кінцевого витка дуплекса ( $K = \exp(-G)$ , де  $G$  – вільна енергія в одиницях  $kT$ ) має дорівнювати приблизно 0,1, для розгортання двох витків, коли після кінцевого руйнується другий контакт (рис. 3.8), константа конформаційного перетворення  $\sim 0,01$  (приблизно протягом 1% часу ділянка є розгорнутою). Спонтанне розгортання половини нуклеосомної ДНК (руйнування 6–7 контактів) має тоді відбуватись з низькою константою конформаційної рівноваги  $\sim 10^{-6} - 10^{-7}$ .



**Рис. 3.8.** Схема спонтанного розгортання нуклеосомної ДНК, починаючи з її кінців. На кожній стадії руйнується один контакт малого жолобка ДНК з поверхнею октамера гістонів.

Під час такого спонтанного розгортання специфічні сайти всередині нуклеосомної ДНК стають тимчасово доступними для взаємодії з відповідними білками. Тобто, така конформаційна динаміка нуклеосоми відкриває можливість для “проникнення” регуляторних білків до їхніх мішеней. Оскільки специфічні білки характеризуються високою спорідненістю до відповідних регуляторних елементів послідовності, взаємодія з білком може зафіксувати частково розгорнутий інтермедіатний високо-енергетичний стан нуклеосоми: таким чином може полегшуватись доступ до інших сайтів шляхом подальшого розгортання. Крім того, властивість нуклеосомної ДНК спонтанно розгортатись на кінцях може використовуватись комплексами ремоделювання хроматину, які власне й фіксують високо-енергетичні проміжні стани нуклеосоми, а також РНК-полімеразою для проникнення всередину нуклеосомної ДНК під час елонгації транскрипції (розділ 5).

Часткове розгортання нуклеосомної ДНК за фізіологічних умов було продемонстровано експериментально. У лабораторії Відома (Jonathan Widom) було показано, що нуклеосомна ДНК є тимчасово доступною до рестрикційних ендонуклеаз. Ця доступність є найбільшою на кінцях нуклеосомної ДНК і не пов’язана з трансляційним переміщенням нуклеосом: експонування рестриктних сайтів усередині нуклеосоми відбувається за рахунок тимчасового визволення ДНК від поверхні октамера гістонів, яке прогресує, починаючись із кінця нуклеосомної ДНК. Оцінки констант рівноваги для розгортання кінцевих ділянок різної довжини (різної відстані розташування певного рестриктного сайту від кінця) узгоджуються з наведеними вище. Тимчасове розгортання кінцевих ділянок нуклеосомної ДНК було показано також методом реєстрації резонансного переносу енергії між двома флуоресцентними мітками – на кінці нуклеосомної ДНК та на гістонах поблизу від центру нуклеосомної ДНК. За фізіологічних значень іонної сили константа розгортання одного витка дуплекса оцінюється в 0,02–0,1.



**3.3.2. Конформаційна рухливість нуклеосоми в циркулярних ДНК.** Оскільки *in vivo* нуклеосоми знаходяться в складі петельних доменів хроматину, вплив топологічних обмежень, які існують у таких доменах, на структурну динаміку нуклеосом є важливим фізіологічним фактором.

Кожна петля з зафіксованими кінцями топологічно еквівалентна до циркулярної ДНК. Центральним поняттям топології циркулярної ДНК є так зване число зачеплень  $Lk$  (linking number) двох полінуклеотидних ланцюгів – двох кілець, закручених одне навкруг одного у подвійну спіраль. Число зачеплень визначається як число перетинів одним циркулярним контуром поверхні, що натягнута на другий контур: відповідно,  $Lk$  може бути тільки цілим числом. Будь-які деформації кілець (за умови збереження цілісності кожного кільця) не змінюють цієї величини: кільця не можна ні розвести, ні збільшити ступінь зачеплень. Отже, і це друга важлива властивість числа зачеплень,  $Lk$  системи двох кілець є постійною величиною – топологічним інваріантом, – поки обидва кільця є інтактними (не містять розривів). Ці дві властивості числа зачеплень і накладають топологічні обмеження на молекулу циркулярної ДНК. Однакові циркулярні молекули, що розрізняються за числом зачеплень, називають *топоізомерами*.

У загальному випадку число зачеплень будь-якої циркулярної ДНК (або ДНК із зафіксованими кінцями) підпорядковане відомому рівнянню Калугареану-Вайта-Фуллера (Gheorghe Călugăreanu, James White, F. Brock Fuller):

$$Lk = Tw + Wr,$$

де  $Tw$  (twist) – твіст – кількість витків подвійної спіралі (дорівнює сумі кутів твісту для усіх пар основ, поділених на  $360^\circ$ , із позначкою “+” для правої спіралі та “-” для лівої),  $Wr$  (writhing) – райзинг – параметр, який є мірою відхилення осі подвійної спіралі від планарної конфігурації (для планарного кільця  $Wr = 0$ ). Розподіл величини  $Lk$  по двом складовим залежить від механічних властивостей молекули ДНК.

Найбільш вигідний твіст ДНК  $T_{w_0}$  (для якого частіше використовують еквівалентне позначення  $Lk_0$ ) визначається зовнішніми умовами та послідовністю пар основ (типове середнє значення за фізіологічних умов відповідає приблизно 10,5 парам основ на виток подвійної спіралі). Якщо, як це часто буває,  $Lk \neq T_{w_0}$ , в ДНК присутня деформація (відхилення конформації від найбільш вигідної), і ця деформація мінімізується, розподіляючись певним чином між зміною твіста  $\Delta Tw = Tw - T_{w_0}$  та ненульовим райзингом внаслідок зростання вигину молекули. Отже, загальною мірою деформації є величина

$$\Delta Lk = Lk - Lk_0 = \Delta Tw + Wr. \quad (3.2)$$

Оскільки зростання райзинга (при зростанні загальні деформації) пов'язане зі спіралізацією осі подвійної спіралі – *надспіралізацією* (supercoiling), величина  $\Delta Lk$  використовується як міра надспіралізації у циркулярній ДНК. Таким чином, надспіралізація є тим більшою, чим більше  $Lk$  відрізняється від  $Lk_0$ , і чим більша напруга, пов'язана з деформацією, накопичується в ДНК.

Одним з основних джерел виникнення надспіралізації у живих системах є різноманітні функціональні процеси, що здійснюються на ДНК, – в першу чергу, транскрипція і реплікація. Проходження такого процесу пов'язане з пересуванням (транслокацією) уздовж ДНК того чи іншого ферменту (*транслокази*), який локально руйнує подвійну спіраль. Транслоказами є, зокрема, РНК- і ДНК-полімерази, а також інші ферменти. Оскільки молекула ДНК – спіраль, пересування транслокази має супроводжуватись або її обертанням навкруг осі подвійної спіралі (на кшталт обертання гайки навкруг гвинта), або прокручуванням самої подвійної спіралі (обертанням гвинта у гайці). Саме друга можливість і реалізується, оскільки транслоказа працює зазвичай у складі величезного мультибілкового комплексу – “гайка“ є надто масивною. Крім того, обертання транслокази додатково гальмується взаємодіями з ДНК, що реалізуються не тільки в

області активного центру транслокази. Іноді транслоказа взагалі не здатна обертатись, оскільки сама зафіксована на елементах ядерного матриксу. Якщо кінці ДНК жорстко зафіксовані і не можуть обертатись, транслокація буде створювати топологічні проблеми (рис. 3.9).

У процесі пересування вздовж ДНК транслоказа руйнує подвійну спіраль попереду від себе й відновлює її позаду. Локальне розкручування подвійної спіралі попереду транслокази має бути компенсованим позитивною надспіралізацією, відновлення спіралі (закручування) – надспіралізацією негативною. В результаті попереду й позаду від транслокази виникають дві “хвилі” надспіралізації протилежного знаку.



**Рис. 3.9.** Дві хвилі надспіралізації в процесі роботи транслокази у петельному домені.

Дві хвилі надспіралізації, що виникають в процесі роботи РНК-полімерази, були продемонстровані експериментально, при чому як *in vitro*, так і *in vivo*. В першому випадку експеримент полягав у здійсненні транскрипції *in vitro* на циркулярній плазміді у присутності ферменту, що здатен знімати тільки негативну надспіралізацію: анігіляції двох хвиль не відбувалося, і після зупинки реакції матриця являла собою суміш позитивних топоізомерів. Експерименти *in vivo* здійснюються, наприклад, шляхом вирізання та замикання в кільце певного фрагмента ДНК в клітині специфічним ферментом. Кільце виділяється та використовується як “свідок” – воно містить надспіралізацію,

що була присутньою в певній геномній зоні. Коли такий фрагмент знаходиться в промоторі (позаду від полімерази), інтенсифікація транскрипції призводить до накопичення негативної надспіралізації.

Зрозуміло, що накопичення надспіралізації (еластичної напруги) не може продовжуватись нескінченно: в решті решт напруга буде блокувати процес транслокації. Відповідно, має бути спосіб вирішувати цю проблему – знімати надспіралізацію, релаксуючи ДНК. Інструментом, який для цього використовується клітиною, є спеціальні ферменти – *ДНК-топоізомерази*, що здатні здійснювати релаксацію ДНК (знімати надспіралізацію), індукуючи тимчасовий розрив полінуклеотидного ланцюга. Після зашивання розриву утворюється топоізомер,  $Lk$  якого є максимально близьким до  $Lk_0$ . Проте, топоізомерази не можуть реагувати на виникнення надспіралізації раптово – їм потрібен певний час на зв'язування з ДНК та здійснення релаксації. Виявляється, що частину еластичної напруги можуть знімати нуклеосоми за рахунок своєї конформаційної рухливості.

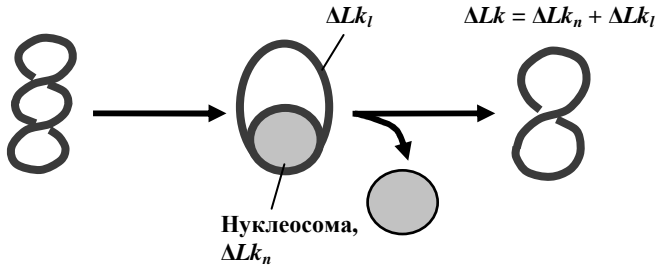
Із нуклеосомами в складі циркулярних молекул ДНК пов'язана давня проблема так званого *парадокса надспіральності*. Внаслідок формування лівої суперспіралі (негативне значення райзинга), нуклеосома вносить у циркулярну ДНК позитивну надспіралізацію – або, що те ж саме, фіксує на собі частину негативної надспіралізації, якщо вона була присутня в циркулярній ДНК. Якщо здійснити реконструкцію нуклеосом на циркулярній плазміді у присутності еукаріотичної топоізомерази I (яка знімає напругу в лінкерних ділянках), то в отриманій таким чином циркулярній мініхромосомі мінімізовані еластичні напруження. Кількість нуклеосом у мініхромосомі підраховується під електронним мікроскопом. Далі нуклеосоми видаляються – вільна циркулярна ДНК містить негативні надспіральні витки (еластичні напруження), які вивільнилися внаслідок видалення нуклеосом (були зафіксовані нуклеосомами). Кількість цих надспіральних витків (ступінь надспіралізації) можна оцінити за допомогою електрофорезу – більш надспіралізована ДНК має

підвищену електрофоретичну рухливість внаслідок зростання ступеня компактності. У таких експериментах було встановлено, що зниження числа зачеплень у мініхромосомі відносно вільної циркулярної ДНК, релаксованої в таких самих умовах, практично дорівнює кількості нуклеосом. Тобто, число надспіральных витків, зафіксоване однією нуклеосоною,  $\Delta Lk_n = -1$ .

У топологічному сенсі нуклеосомна суперспіраль має два витки – якщо лінкерна ДНК продовжує по прямій траєкторію, задану нуклеосоною суперспіраллю, відбувається два негативних перехрещення осі подвійної спіралі ДНК – усередині нуклеосомі та на вході/виході. Більш точний розрахунок оцінює райзинг нуклеосомної ДНК як  $Wr_n \approx -1,7$ . Розбіжність між  $Wr_n$  та  $\Delta Lk_n$  і виглядає парадоксальною. Одним із рішень парадокса надспіральності може бути позитивний внесок від зміни твіста нуклеосомної ДНК  $\Delta Tw_n$  у загальну зміну числа зачеплень (за рівн. 3.2). Це рішення, запропоноване в свій час Кріком та Клугом (Francis Crick, Aaron Klug), відіграло важливу роль у розвитку молекулярної біології, але воно не дозволяє повною мірою вирішити парадокс надспіральності. Дійсно, хоча  $\Delta Tw_n$  має позитивне значення (відбувається додаткове закручення подвійної спіралі в нуклеосомі, підпідрозд. 3.1.2), зміна твіста не є достатньо високою, щоб повністю компенсувати  $Wr_n$  до  $\Delta Lk_n = -1$ . Середня спіральна періодичність нуклеосомної ДНК дорівнює 10,2–10,3 п.о./виток, тобто, якщо середня періодичність вільної ДНК становить  $\sim 10,5$  п.о./виток, то для 147 пар основ  $\Delta Tw_n \sim +0,3 \div +0,4$ , і  $\Delta Lk_n$  залишається достатньо далеким від експериментально отриманої величини.

Відповідь дає конформаційна динаміка нуклеосомі, яку вдається зафіксувати на простій системі – моонуклеосомі, що реконструйована на циркулярній ДНК малого розміру (мініциклі). Принципову схему експериментального підходу зображено на рис. 3.10: нуклеосома реконструюється на мініциклі розміром 350–360 пар основ, після чого мініцикл обробляється топоізомеразою I (за фізіологічних значень іонної сили та температури) для максимально можливої релаксації. З

цього релаксованого матеріалу видаляються гістони, і рівень надспіралізації аналізується за допомогою електрофорезу.



**Рис. 3.10.** Схема експерименту з нуклеосомами, реконструйованими на мініциклах ДНК (пояснення в тексті).

Внаслідок маленького розміру і, відповідно, високої жорсткості, вільні мініцикли дають зазвичай лише один топоізомер після релаксації ( $Lk$  якого є найближчим до значення  $Lk_0$ ). Але за наявності нуклеосоми в релаксованій суміші присутні принаймні два топоізмери. Це відразу вказує на зростання загальної пластичності мініцикла – висновок неочікуваний та дещо контрінтуїтивний, зважаючи на те, що розмір вільної петлі в складі реконструйованої частинки є значно меншим загальної контурної довжини мініцикла.

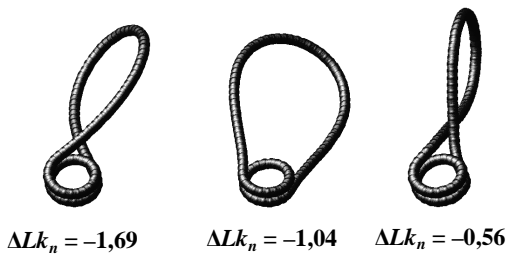
Циркулярна ДНК, що містить нуклеосому і піддається релаксації за допомогою топоізомерази, може бути розділеною на два топологічні домени: ДНК у складі нуклеосоми, структура якої визначена взаємодіями всередині частинки, та вільна петля, структура якої обмежена тільки на її кінцях. Сумарне значення  $\Delta Lk$  мініцикла складається з частини надспіралізації  $\Delta Lk_n$ , знятої нуклеосомою, та надспіралізації  $\Delta Lk_l$ , що залишилася в петлі (рис. 3.10):

$$\Delta Lk = \Delta Lk_n + \Delta Lk_l.$$

Тобто,  $\Delta Lk$  топоізомера дорівнює  $\Delta Lk_n$ , якщо петля повністю релаксована і  $\Delta Lk_l = 0$ . Зрозуміло, що в умовах релаксації переважним буде той топоізомер, для якого  $\Delta Lk_l$  наближається до нуля – тобто  $\Delta Lk$  якого є найближчим до  $\Delta Lk_n$ .

Аналіз результатів таких експериментів, проведених на мініциклах, які походять з фрагменту плазмід рBR322, приводить до висновку, що нуклеосома існує у вигляді трьох структурних форм із різними значеннями  $\Delta Lk_n$  (рис. 3.11): закрыта негативна ("канонічна" форма – 1,7 витків суперспіралі, негативне перехрещення лінкерів на виході з нуклеосоми); відкрита (1,4 витки суперспіралі, відсутність перехрещення); закрыта позитивна (знову 1,7 витків, але позитивне перехрещення на виході). Реалізація останнього стану потребує певних перебудов структури нуклеосоми, які наближують одна до одної лінкерні ділянки, чим сприяють їх позитивному перехрещенню.

Таким чином, парадокс надспіральності вирішується просто: отримане на мініхромосомах значення  $\Delta Lk_n = -1$  є усередненим для кількох структурних станів нуклеосоми, кожному з яких притаманне своє  $\Delta Lk_n$ . Кожне таке значення  $\Delta Lk_n$  відображає певний райзинг і, як правило, позитивну зміну твіста нуклеосомної ДНК.



**Рис. 3.11.** Конфігурації мініциклів з нуклеосомами у трьох структурних формах (зліва направо: закрыта негативна, відкрита, закрыта позитивна) та відповідні значення  $\Delta Lk_n$ .

Адаптовано з роботи Sivolob *et al.* (2003).

Отримані значення  $\Delta Lk_n$  практично співпадають з оцінками райзинга для вказаних структурних форм: для мініциклів, що походять від плазмиди рBR322, твіст ДНК у нуклеосомі дорівнює такому в розчині (останній в умовах експерименту відповідає 10,49 п.о./виток). Ця ситуація не є загальним правилом: на мініциклах іншого походження (тобто на ДНК інших послідовностей) зареєстровані інші, менші за абсолютною величиною, значення  $\Delta Lk_n$ , які вказують на додаткове закручування нуклеосомної ДНК. На мініциклах, що походять від фрагменту  $\alpha$ -сателітної ДНК людини (як і ДНК, що використана в кристалографічних дослідженнях нуклеосоми, описаних у підрозділі 3.1) спіральна періодичність всередині нуклеосоми оцінюється у 10,3 п.о./виток (проти 10,49 п.о./виток у розчині), а значення  $\Delta Lk_n$  для трьох станів становлять  $-1,55$ ,  $-0,79$  та  $-0,47$ . На ДНК з гена рибосомної РНК 5S морського їжака *Lytechinus variegatus* відповідні  $\Delta Lk_n$  дорівнюють  $-1,40$ ,  $-0,72$  та  $-0,41$ , а спіральна періодичність у нуклеосомі 10,3 п.о./виток проти 10,54 п.о./виток у розчині.

Крім залежного від послідовності пар основ поліморфізму нуклеосом щодо спіральної періодичності, нуклеосоми на мініциклах різного походження характеризуються різною конформаційною динамікою. Переважним, що можна було очікувати, є закритий негативний стан, який відповідає канонічній структурі нуклеосоми, – його вільна енергія  $\Delta G_n$  (відносно відкритого стану, для якого прийнято  $\Delta G_n = 0$ ) варіює від  $-0,8$  до  $-1,7$  одиниць  $kT$ . Закритий позитивний стан є найменш вигідним енергетично, і для деяких послідовностей він є взагалі практично недоступним.

Таким чином, невелика порівняно з енергією теплових флуктуацій різниця вільних енергій між структурними станами, власне, і забезпечує можливість конформаційної рівноваги. Ця рівновага зсувається в той чи інший бік залежно від рівня надспіралізації, а також модулюється послідовністю ДНК у складі нуклеосоми. Інакше кажучи, нуклеосомні структурні стани відіграють роль буфера, який знімає частину



надспіралізації того чи іншого знаку, і ці буферні властивості залежать від послідовності пар основ нуклеосомної ДНК.

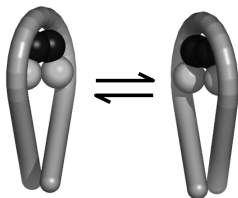
Крім того, конформаційна рівновага залежить від типу гістонів, що входять до складу нуклеосоми. Так, присутність у нуклеосомі CENP-A замість звичайного гістона H3 (див. підрозд. 2.1.3) сприяє розгортанню нуклеосомної ДНК – найбільш імовірною стає відкрита форма нуклеосоми. Це пояснюється заміною в складі CENP-A залишків Arg в  $\alpha$ N-спіралях – послаблюється контакт між ДНК та гістонами на виході з нуклеосоми, в  $SHL \pm 6,5$ .

Гіперацетилювання гістонів також робить відкриту форму переважною: зниження позитивного заряду гістонових хвостів призводить до зростання розштовхування між сусідніми витками нуклеосомної суперспіралі на кінцях. Оскільки ацетилювання гістонів завжди позитивно корелює з транскрипційною активністю, значення відкритої форми нуклеосоми є очевидним: по-перше, розгортання нуклеосомної ДНК на кінцях підвищує її доступність до регуляторних білків; по-друге, таке розгортання дестабілізує димери H2A-H2B в нуклеосомі – їх перенесення на проміжні гістонові акцептори, яке досить активно відбувається під час транскрипції, полегшується.

Тимчасове видалення димерів залишає на ДНК тетрасому (рис. 12, кольор. вст.), яка також характеризується неабиякою конформаційною рухливістю: під дією надспіралізації того чи іншого знаку тетрасомна суперспіраль змінює свою хіральність: більш енергетично вигідна лівоспіральна тетрасома (яка відповідає структурі в складі нуклеосоми) перетворюється на правоспіральну в складі позитивно надспіралізованих топоізомерів (рис. 3.12).

Правоспіральна тетрасома може легко поглинати частину позитивної надспіралізації, яка виникає попереду РНК-полімерази під час транскрипції: для неї також проявляються зазначені вище буферні властивості, які також залежать від послідовності ДНК в складі тетрасоми (різниця вільних енергій між двома станами трохи варіює для різних послідовностей) і

від гістонових хвостів, видалення або гіперацетилювання яких значно полегшує перехід у правоспіральну конформацію.



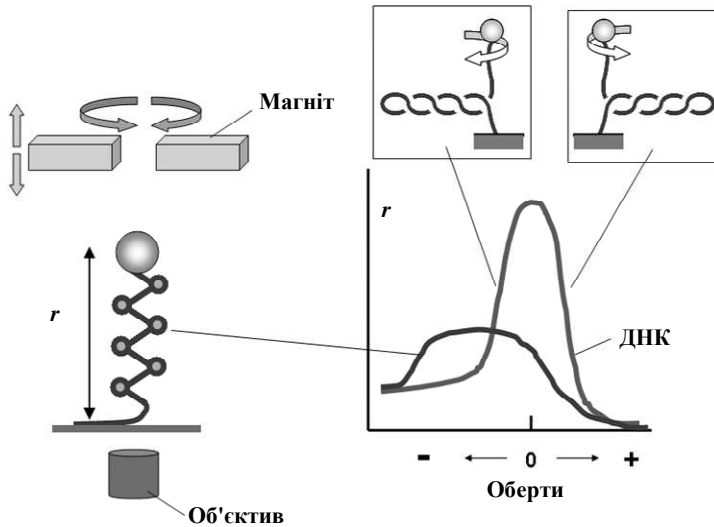
**Рис. 3.12.** Схема перетворення лівоспіральної тетрасоми (ліворуч) на правоспіральну (праворуч). Гістони зображено у вигляді кульок.

Взагалі, конформаційна динаміка тетрасоми та нуклеосоми зумовлює неочікувану властивість ДНК-гістонових комплексів: їхня присутність на ДНК робить молекулу ДНК значно більш пластичною – здатною легше накопичувати надспіралізацію (торсійну напругу) того чи іншого знаку. Головним чинником підвищення пластичності є конформаційна рухливість ДНК-гістонових комплексів, яка дозволяє їм адаптуватись до того чи іншого топологічного стану циркулярної ДНК (петельного домену).

**3.3.3. Зміна хіральності нуклеосоми: реверсома.** Висока пластичність ДНК, що формує нуклеосоми, проявляється також в експериментах із магнітним пінцетом. Схему експерименту зображено на рис. 3.13.

Молекулу ДНК (зазвичай довжиною від ~5 до ~50 тис. п.о.) пришивають за один кінець до поверхні скла у невеличкій камері – у камеру подається розчин бажаного складу, під камерою знаходиться об'єктив оптичного мікроскопа. До іншого кінця приєднано кульку діаметром 2–3 мкм (яка добре видима в оптичний мікроскоп), що є парамагнетиком і знаходиться під дією постійного магнітного поля, створеного електромагнітом. Магніт може переміщуватись та обертатись, як показано на рисунку. Переміщення створює розтягувальну силу, що прикладається до кінця ДНК, – величина сили залежить від

висоти положення магніту над камерою. Кількість обертів магніту задає певний обертальний момент, прикладений до кінця молекули, – здійснюється кручення одного кінця відносно іншого в тому чи іншому напрямі.



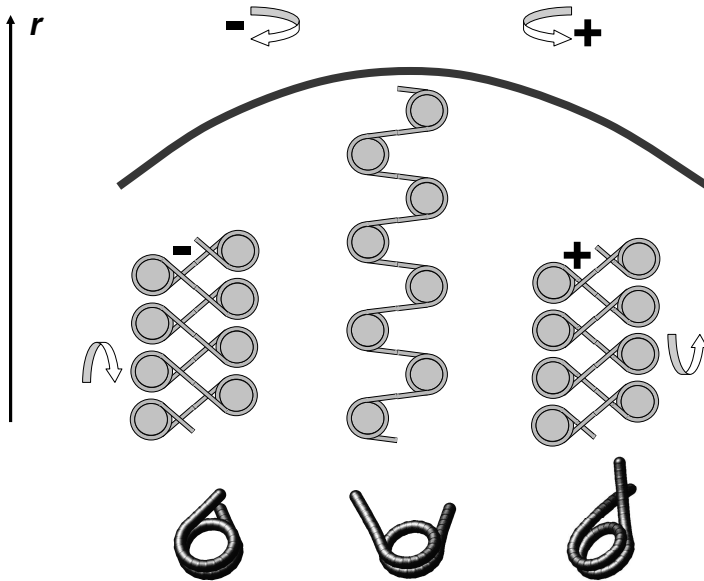
**Рис. 3.13.** Схема експерименту з магнітним пінцетом та типові залежності відстані  $r$  від кульки до підложки від кількості обертів. На вставках: утворення плектономи при закручуванні як причина скорочення відстані  $r$ . Інші пояснення в тексті.

Один оберт магніту, в залежності від напрямку обертання, закручує або розкручує подвійну спіраль на один виток, відповідно збільшуючи або зменшуючи твіст: виникає торсійна напруга, яка характеризується ненульовим значенням  $\Delta Tw = Tw - Tw_0$  (позитивним при додатковому закручуванні та негативним – при розкручуванні правої подвійної спіралі). Досить швидко відносне скорочення відстані  $r$  (визначається за допомогою мікроскопа по зміні інтерференційної картини навкруг кульки) при зростанні кількості обертів у той чи інший бік пояснюється тим, що оберти магніту дійсно індукують торсійну деформацію тільки до певної межі – подвійна спіраль

здатна накопичити торсійну напругу лише певної величини. Після досягнення критичної точки (певної питомої кількості обертів на одиницю довжини) енергія торсійних деформацій стає надто високою, і відбувається втрата стійкості: ДНК закручується у надспіральні *плектонемічні витки* (рис. 3.13). В тому, що торсійне закручування має в певний момент перетворитися на плектонемічні витки, можна легко переконатись, закручуючи гумову трубку або звичайну мотузку.

Для полінуклеосомної фібрили, так само, як для голої ДНК, відстань від парамагнітної кульки до підложки при обертанні магнітного пінцета скорочується внаслідок формування плектонами (але вже полінуклеосомним ланцюгом). Зрозуміло, що в порівнянні з відповідною вільною ДНК, фібрила є коротшою в точці максимуму, і сам цей максимум є зсунутим у негативному напрямку обертання магніту (рис. 3.13) – нуклеосомні скорочують фібрилу та фіксують на собі негативні надспіральні витки (обидва ефекти є пропорційними до кількості нуклеосом). Проте, є ще одна важлива відмінність: у порівнянні з голою ДНК, перед тим, як починається формування плектонами, полінуклеосомний ланцюг здатен накопичувати значно більшу торсійну напругу (питому кількість обертів) за рахунок конформаційної рухливості нуклеосом (рис. 3.14).

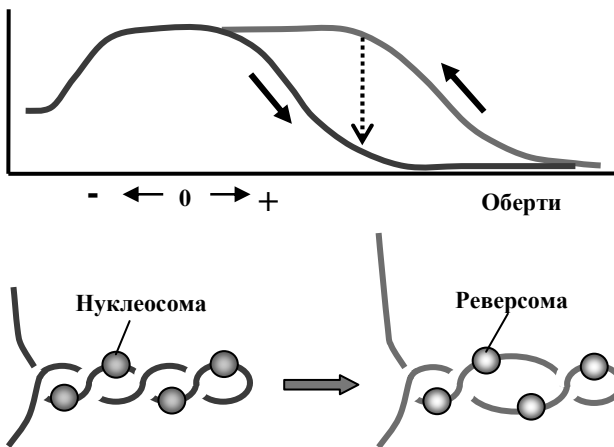
Найбільше подовження полінуклеосомного ланцюга відповідає відкритій формі нуклеосом в його складі – в умовах експерименту (низька йонна сила) ця форма є переважною внаслідок великого електростатичного розштовхування між витками нуклеосомної суперспіралі. Утворення плектоном гальмується обертанням нуклеосом навкруг своїх осей симетрії та переходом у закриті структурні форми – негативну чи позитивну в залежності від напрямку обертання магнітного пінцета. Тільки після закінчення структурних переходів починається утворення плектоном.



**Рис. 3.14.** Відповідь полінуклеосомного ланцюга на торсійну деформацію: крива схематично відображає зміну довжини ланцюга  $r$  (відстані від парамагнітної кульки до підложки) як функції кількості обертів в оточенні максимуму (подальше накопичення торсійних витків обох знаків призводить до більш різкого скорочення за рахунок утворення плектоном). Три структурні форми нуклеосоми (внизу) сприяють накопиченню напруги за рахунок обертання нуклеосом навкруг своїх осей симетрії в тому чи іншому напрямі. Адаптовано з роботи Bancaud *et al.* (2006).

Але найцікавіша структурна перебудова трапляється в нуклеосомах при накопиченні високого рівня позитивної торсійної напруги – після утворення плектонами. Результати вказують на зміну хіральності нуклеосомної суперспіралі – перетворення її на *праву* в складі частинки, що отримала назву *реверсоми* (reversome – reverse nucleosome).

Якщо кількість обертів пінцета в позитивному напрямі (в бік закручення подвійної спіралі) є не надто великою, зворотне обертання призводить до подовження фібрили по тій самій траєкторії – пряма та зворотна криві залежності довжини від кількості обертів співпадають. Але за певною граничною кількістю позитивних обертів (приблизно 20 обертів після того, як довжина знизилась до нуля внаслідок утворення плектонемі), зворотний рух характеризується гістерезисом: скидання плектонемічних витків (подовження фібрили) починається при більших значеннях кількості обертів – при однаковій їх кількості відносно нульової точки фібрила має довжину більшу, ніж ця довжина була при прямому русі (рис. 3.15).

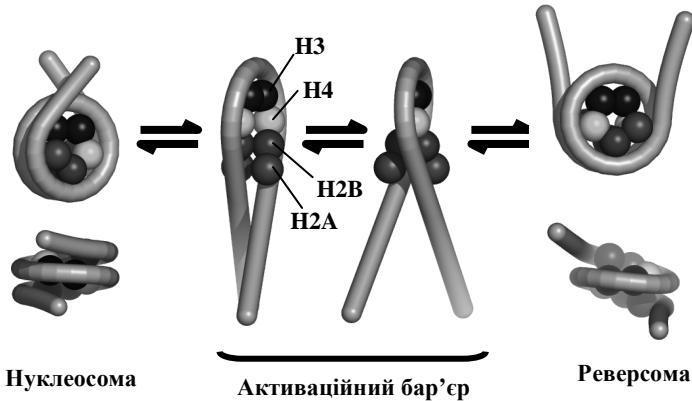


**Рис. 3.15.** Схема гістерезису при накопиченні та зворотному скиданні позитивної торсійної напруги в полінуклеосомній фібрилі. Стрілки вказують напрям обертання, пунктирна стрілка – напрям скорочення фібрили, якщо зворотне обертання зупиняється в певній точці. Внизу: внаслідок структурної перебудови реверсома поглинає частину позитивної надспіралізації. Адаптовано з роботи Vansaude *et al.* (2007).

Така поведінка дозволяє зробити два висновки. По-перше, за високого рівня позитивної торсійної напруги в нуклеосомі відбувається структурне перетворення, внаслідок якого нова частинка – реверсома – фіксує на собі певну частину позитивної надспіралізації. Амплітуда гістерезису (величина відносного зсуву двох кривих на рис. 3.15) є прямо пропорційною до кількості нуклеосом у складі фібрили, із нахилу цієї залежності отримано оцінку  $\Delta Lk_n = +0,9$  для реверсоми. Очевидно, що ДНК в складі частинки утворює *праву* суперспіраль, яка, ймовірно, є дзеркальним відображенням лівоспіральної відкритої форми нуклеосоми. По-друге, наявність гістерезису вказує на те, що дві структури розділені високим активаційним бар'єром – при зворотному обертанні реверсома не встигає перебудуватись у більш енергетично вигідну нуклеосому. Якщо зворотне обертання зупинити за деякої кількості обертів, спостерігається довге (за десятки хвилин) скорочення фібрили (пунктирна стрілка на рис. 3.15) – здійснюється перехід реверсоми в нуклеосому. Аналіз кінетики переходу дозволяє оцінити висоту активаційного бар'єра та різницю вільних енергій між нуклеосою та реверсою: вільна енергія реверсоми відносно нуклеосоми дорівнює  $\sim 10$  kT, енергія активації  $\sim 30$  kT. Остання величина приблизно співпадає з вільною енергією взаємодії двох димерів H2A-H2B з тетрамером (H3-H4)<sub>2</sub> у 2 М NaCl. Це вказує, що наявність активаційного бар'єра пов'язана з необхідністю зруйнувати енергетично вигідні контакти між димерами та тетрамером на шляху структурної перебудови.

Дійсно, перетворити ліву нуклеосомну суперспіраль на праву можна тільки в один спосіб: порушивши взаємодію димерів з тетрамером, розгорнувши нуклеосомну ДНК разом зі зв'язаними димерами, потім змінивши хіральність тетрасоми та встановивши нові контакти між димерами та тетрамером (рис. 3.16). Відповідно, видалення димерів з полінуклеосомної фібрили призводить до зникнення гістерезису: тетрасома, що залишається, легко змінює свою хіральність без будь-яких активаційних бар'єрів. Гістон-гістонові контакти в реверсомі відрізняються від таких у нуклеосомі (димери зв'язуються з іншого боку від тетрамера, рис. 3.16), що, напевно, і дає

основний внесок у різницю вільних енергій між двома структурами.



**Рис. 3.16.** Схема структурної перебудови в нуклеосомі зі зміною хіральності суперспіралі. Гістони зображено у вигляді кульок.

Для відповіді на питання про можливу фізіологічну роль реверсоми знову треба повернутись до хвилі позитивної надспіралізації, яка виникає попереду РНК-полімерази під час транскрипції: полімераза індукує обертальний момент анітрохи не менший, ніж під час експерименту з магнітним пінцетом. Тобто, реверсома є цілком можливою як тимчасова структура під час транскрипції. Значення її може бути подвійним. По-перше, реверсома ефективно поглинає позитивну надспіралізацію, забезпечуючи можливість продовження процесу транскрипції, поки не спрацюють ДНК-топоізомерази. По-друге, реверсома може розглядатись як високо-енергетична “активована” форма нуклеосоми – дестабілізовані в такій структурі димери H2A-H2B легше мають зніматись проміжними акцепторами.

Справа в тому, що в кодуючих ділянках генів нуклеосоми зберігаються під час транскрипції, але в експериментах *in vitro* на лінійних молекулах ДНК нуклеосома створює майже абсолютний бар'єр на шляху РНК-полімерази II. *In vivo* гістони



комплекси тимчасово знімаються з ДНК проміжними акцепторами попереду від полімерази та відразу повертаються після її проходження (розділ 5). Димер H2A-H2B є першим блокатором руху полімерази – в транскрипційно активних ділянках реєструється швидкий обмін димерів. Таким чином, дві хвили надспіралізації, що створюються самою РНК-полімеразою, допомагають здійснити обидві операції, необхідні для ефективної елонгації транскрипції при збереженні нуклеосомної упаковки: попереду полегшується видалення димерів, позаду негативна надспіралізація сприяє відновленню лівоспіральної нуклеосомної структури.

### 3.4. Варіабельність нуклеосомних частинок у хроматині

Термін "нуклеосома" можна інтерпретувати і як позначення для структури, що містить октамер гістонів та близько 145 пар основ ДНК, і в більш широкому сенсі – як елементарну нуклеопротейнову частинку, що повторюється вздовж хроматинової фібрили. Тоді нуклеосома у вузькому сенсі терміна може бути позначена як *октасома* – зрозуміло, що це основний, базовий стан нуклеосоми. Але, як кілька разів згадувалось у цьому розділі, октасоми у хроматині характеризуються структурним поліморфізмом. Цей поліморфізм проявляється у вигляді:

- варіацій конформаційних параметрів нуклеосомної ДНК – твіста подвійної спіралі та інших параметрів динуклеотидних кроків;
- варіації в певних вузьких межах загальної форми нуклеосоми – кроку та радіусу нуклеосомної суперспіралі;
- варіації ступеня закручення нуклеосомної суперспіралі – кількості надспіральных витків, тобто довжини нуклеосомної ДНК – від ~120 (або навіть 100) до 160-170 пар основ.

Всі ці варіації визначаються нуклеотидною послідовністю нуклеосомної ДНК та наявністю у складі нуклеосоми гістонових варіантів та посттрансляційних модифікацій. Наприклад, деякі гістонові варіанти сприяють зниженню ступеня закручення нуклеосомної ДНК. Цей ступінь може залежати також від

щільності нуклеосом у хроматині – у деяких дріжджів довжина нуклеосомного повтора дорівнює 156 парам основ, і нуклеосомна ДНК частково розгортається внаслідок стеричних обмежень. Всі ці варіації можуть бути статичними – коли та чи інша переважна форма нуклеосоми існує довгий час, а також динамічними – відображати зсув у той чи інший бік рівноваги між різними конформаційними формами нуклеосоми. Найбільш радикально зміненою структурною формою октасоми є право-спіральною *реверсома*.

Унаслідок динамічних процесів, що відбуваються в хроматині під час функціонування геному, димери гістонів H2A-H2B тимчасово видаляються з нуклеосоми. Тоді в хроматині залишаються дві інші частинки: *гексасома*, що містить гексамер  $(H3-H4)_2-H2A-H2B$ , та *тетрасома*, яка виникає після видалення другого димера H2A-H2B і яка може існувати в двох формах – ліво- та право-спіральній.

Крім того, обговорюється можливість існування в хроматині двох гіпотетичних частинок. Перша з них – так звана *гемісома*, частинка, що містить гетеротетрамер H3-H4-H2A-H2B. Вона не є цілком гіпотетичною, оскільки існують докази існування такої частинки (що містить SepH3 замість H3) в центромерах. Друга частинка є варіацією першої – "розколота" нуклеосома або *лексосома*: два гетеротетрамери H3-H4-H2A-H2B з порушеними взаємодіями між гістонами H3. Можливість існування гемісоми та лексосоми базується на тому, що в транскрипційно активних ділянках хроматину іноді спостерігається зростання доступності двох залишків Cys110 у гістоні H3 – ці консервативні залишки розташовані в зоні інтерфейсу між двома гістонами H3 та в звичайних нуклеосомах є недоступними для розчинника. Такі частинки з підвищеною доступністю Cys110 вдається виділити з активного хроматину, проте, не знайдені умови *in vitro*, в яких гемісома та лексосома могли б бути стабільними.

## Рекомендована література

### *Загальна*

*Kornberg, R.D., Lorch, Y.* Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome // *Cell*. – 1999. – Vol. 98. – P. 285-294.

*Lavelle, C., Prunell, A.* Chromatin polymorphism and the nucleosome superfamily // *Cell Cycle*. – 2007. – Vol. 6. – P. 2113-2119.

*Zlatanova, J., Bishop, T.C., Victor, J.M., Jackson, V., van Holde, K.* The nucleosome family: dynamic and growing // *Structure*. – 2009. – Vol. 17. – P. 160-171.

### ***Структура нуклеосом***

*Davey, C.A., Sargent, D.F., Luger, K., Mäder, 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.

*Hall, M.A., Shundrovsky, A., Bai, L., Fulbright, R.M., Lis, J.T., Wang, M.D.* High-resolution dynamic mapping of histone-DNA interactions in a nucleosome // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2009. – Vol. 16. – P. 124-129.

*Luger, K.* Structure and dynamic behavior of nucleosomes // *Curr. Op. Gen. Dev.* – 2003. – Vol. 13. – P. 127-135.

*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. – P. 251-260.

*Muthurajan, U.M., Bao, Y., Forsberg, L.J., Edayathumangalam, R.S., Dyer, P.N., White, C.L., Luger, K.* Crystal structures of histone Sin mutant nucleosomes reveal altered protein–DNA interactions // *EMBO J.* – 2004. – Vol. 23. – P. 260-271.

*Ong, M.S., Richmond, T.J., Davey, C.A.* DNA stretching and extreme kinking in the nucleosome core // *J. Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 368. – P. 1067-1074.

*Richmond, T.J., Davey, C.A.* The structure of DNA in the nucleosome core // *Nature*. – 2003. – Vol. 423. – P. 145-150.

*Tolstorukov, M.Y., Colasanti, A.V., McCandlish, D.M., Olson, W.K., Zhurkin, V.B.* A novel roll-and-slide mechanism of DNA

folding in chromatin: Implications for nucleosome positioning // *J. Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 371. – P. 725-738.

*Vasudevan, D., Chua, E.Y.D., Davey, C.A.* Crystal structures of nucleosome core particles containing the '601' strong positioning sequence // *J. Mol. Biol.* – 2010. – Vol. 403. – P. 1-10.

*Zheng, C., Hayes, J.J.* Structures and interactions of the core histone tail domains // *Biopolymers.* 2003. – Vol. 68. – P. 539–546.

### ***Структурна динаміка нуклеосоми***

*Anderson, J.D., Thastrom, A., Widom, J.* Spontaneous access of proteins to buried nucleosomal DNA target sites occurs via a mechanism that is distinct from nucleosome translocation // *Mol. Cell. Biol.* – 2002. – Vol. 22. – P. 7147-7157.

*Bancaud, A., Conde E Silva, N., Barbi, M., Wagner, G., Allemand, J.F., Mozziconacci, J., Lavelle, C., Croquette, V., Victor, J.-M., Prunell, A., Viovy, J.-L.* Structural plasticity of single chromatin fibers revealed by torsional manipulation // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2006. – Vol. 13. – P. 444-450.

*Bancaud, A., Wagner, G., Conde e Silva, N., Lavelle, C., Wong, H., Mozziconacci, J., Barbi, M., Sivolob, A., Le Cam, E., Mouawad, L., Viovy, J.-L., Victor, J.-M., Prunell, A.* Nucleosome chiral transition under positive torsional stress in single chromatin fibers // *Mol. Cell.* – 2007. – Vol. 27. – P. 135-147.

*Hodges, C., Bintu, L., Lubkowska, L., Kashlev, M., Bustamante, C.* Nucleosomal fluctuations govern the transcription dynamics of RNA polymerase II // *Science.* – 2009. – Vol. 325. – P. 626-628.

*Kelbauskas, L., Chan, N., Bash, R., Debartolo, P., Sun, J., Woodbury, N., Lohr, D.* Sequence-dependent variations associated with H2A/H2B depletion of nucleosomes // *Biophys. J.* – 2008. – Vol. 94. – P. 147-158.

*Li, G., Widom, J.* Nucleosomes facilitate their own invasion // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2004. – Vol. 11. – P. 763-769.

*Mihardja, S., Spakowitz, A.J., Zhang, Y., Bustamante, C.* Effect of force on mononucleosomal dynamics // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – Vol. 103. – P. 15871-15876.

*Muthurajan, U.M., Park, Y.-J., Edayathumangalam, R.S., Suto, R.K., Chakravarthy, S., Dyer, P.N., Luger, K.* Structure and dynamics of nucleosomal DNA // *Biopolymers*. – 2003. – Vol. 68. – P. 547-556.

*Polach, K.J., Widom, J.* Mechanism of protein access to specific DNA sequences in chromatin: a dynamic equilibrium model for gene regulation // *J. Mol. Biol.* – 1995. – Vol. 254. – P. 130-149.

*Sivolob, A., De Lucia, F., Alilat, M., Prunell, A.* Nucleosome dynamics VI. Histone tail regulation of tetrasome chiral transition. A relaxation study of tetrasomes on DNA minicircles // *J. Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 295. – P. 55-70.

*Sivolob, A., Lavelle, C., Prunell, A.* Sequence-dependent nucleosome structural and dynamic polymorphism. Potential involvement of histone H2B N-terminal tail proximal domain // *J. Mol. Biol.* – 2003. – Vol. 326. – P. 49-63.

*Sivolob, A., Lavelle, C., Prunell, A.* Flexibility of nucleosomes on topologically constrained DNA // *IMA Volumes in Mathematics and its Applications*, Vol. 150 (Eds. C.J.Benham, S.Harvey, W.Olson, D.W.Sumners, D.Swigon). – New York: Springer-Verlag, 2009. – P. 251-291.

*Sivolob, A., Prunell, A.* Nucleosome conformational flexibility and implications for chromatin dynamics // *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. A.* – 2004. – Vol. 362. – P. 1519-1547.

*Tomschik, M., Zheng, H., van Holde, K., Zlatanova, J., Leuba, S.H.* Fast, long-range, reversible conformational fluctuations in nucleosomes revealed by single-pair fluorescence resonance energy transfer // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – Vol. 102. – P. 3278-3283.

## 4. Наднуклеосомна організація інтерфазного хроматину

У цьому розділі розглядається організація хроматину на наднуклеосомному рівні у трьох головних аспектах: характер розташування нуклеосом у різних геномних зонах та механізми залежності цього розташування (позиціювання нуклеосом) відносно нуклеотидної послідовності ДНК; структурна організація та механізми стабілізації та дестабілізації компактної хроматинової фібрили 30 нм; розміщення хроматинової фібрили – інтерфазної хромосоми – у клітинному ядрі.

### 4.1. Позиціювання нуклеосом

Феномен позиціювання нуклеосом відносно послідовності пар основ проявляється в тому, що деякі ділянки послідовності є дещо кращими за інші для утворення там нуклеосом. Кращими – в енергетичному сенсі: експерименти, в яких порівнювалась відносна ефективність реконструкції нуклеосом на різних послідовностях ДНК, свідчать, що послідовності можуть розрізнятися між собою за вільною енергією утворення нуклеосом на величину до  $\sim 6-7 kT$ . Проте, це скоріше граничні випадки: зазвичай різниця енергій між різними послідовностями становить  $\sim 2 kT$ .

Щоб з'ясувати, що такі значення вільної енергії можуть означати в термінах імовірності заповнення тих чи інших позицій, розглянемо простий гіпотетичний випадок. Нехай на деякому фрагменті ДНК довжиною  $N = 204$  пари основ (максимально  $N - 144 = 60$  позицій для нуклеосоми, що містить 145 пар основ) є тільки одна позиція, розташування нуклеосоми в якій супроводжується відносним зниженням вільної енергії на  $\Delta\Delta G = -2 kT$  – вільні енергії для всіх інших позицій приймемо за нуль. Тоді ймовірність знаходження нуклеосоми на переважній позиції за принципом Больцмана пропорційна до  $\exp(-\Delta\Delta G) = 7,39$ , на всіх інших позиціях – до 1. Нормування по всіх

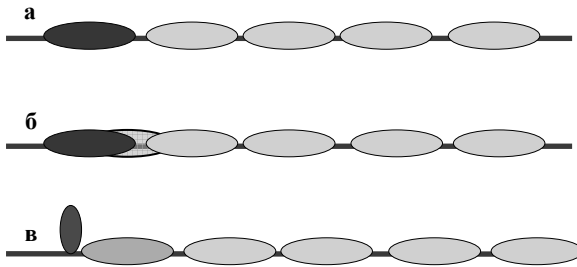
позиціях дає імовірність знайти нуклеосому в переважній позиції

$$p = \frac{\exp(-\Delta\Delta G)}{N - 145 + \exp(-\Delta\Delta G)} = 0,11$$

проти ймовірності для кожної з інших позицій 0,01. Зниження відносної вільної енергії переважної позиції до  $-6 k_B T$  призводить до підвищення першої імовірності до 0,87 та зниження другої до 0,002. Таким чином, позиціонування нуклеосом не є жорстко детермінованим – мова завжди йде про більшу чи меншу ймовірність присутності нуклеосом в даному сайті.

Вільна енергія утворення нуклеосом визначає “силу” даної позиції, а конкретний енергетичний профіль вздовж ДНК – складну картину переважного позиціонування. Наприклад, зазвичай на фрагментах довжиною 200–250 пар основ реєструються 2–3 альтернативні переважні позиції. Крім того, для появи регулярної картини позиціонування нуклеосом може бути достатнім існування на певній ділянці тільки однієї “сильно” позиційованої нуклеосом, яка задає рамку розташування для інших нуклеосом (рис. 4.1, *a*). Тобто, нуклеосом, розташовані за сильно позиційованою, займають не переважні, а просто доступні позиції, що не перекриваються. У результаті на ділянці певної довжини нуклеосом виявляються *фазованими* – спостерігається їх впорядковане розташування, коли на багатьох фрагментах ДНК, що аналізуються, в тій самій області з високою імовірністю знаходиться нуклеосома – так зване статистичне позиціонування. На віддаленні від позиційованої нуклеосомі накопичуються випадкові зсуви нуклеосом в той чи інший бік, і регулярність їхнього розташування порушується – на багатьох фрагментах ДНК нуклеосом хаотично займають місця, що перекриваються. Якщо дві альтернативні сильні позиції перекриваються, обирається та з них, що є більш переважною (рис. 4.1, *б*) – вона й задає рамку фазованих нуклеосом. Але в межах цієї позиції

може бути розташований специфічний регуляторний сайт – зв'язування з ним транскрипційного фактора призведе до реалізації іншої переважної позиції та іншої рамки розташування нуклеосом (рис. 4.1, *в*). Зрозуміло, що специфічно зв'язаний білок сам по собі здатен визначати рамку фазування. І навпаки: розподіл нуклеосом визначає доступність елементів послідовності ДНК для різноманітних ДНК-зв'язувальних білків.



**Рис. 4.1.** Приклади варіантів розташування нуклеосом у геномних ділянках: (*а*) нуклеосома в сильній позиції (темний овал) задає рамку розташування інших нуклеосом (світлі овали); (*б*) з двох альтернативних сильних позицій, що перекриваються, обирається сильніша; (*в*) транскрипційний фактор заважає утворенню нуклеосоми на сильнішій позиції у випадку (*б*) – обирається наступна за силою позиція та утворюється нова рамка нуклеосом.

Доступність регуляторного елемента нуклеотидної послідовності не обов'язково пов'язана з його розташуванням у лінкері – досить короткі сайти зв'язування можуть знаходитись всередині нуклеосомної ДНК, і тоді їхня доступність залежить від того, на якому боці дуплекса – оберненого назовні чи до поверхні октамера гістонів – вони знаходяться. Оскільки для здійснення контактів між ДНК та гістонами маленький жолобок має стати точно проти сайту зв'язування на октамері, трансляційний зсув нуклеосоми призводить до одночасного



прокручування дуплекса – змінюється так звана ротаційна позиція. При зсуві на піввитка подвійної спіралі експонований сайт стає недоступним і навпаки (рис. 17, кольор. вст.).

Відповідь на питання, яке походження має енергетичний профіль вздовж послідовності ДНК, що він визначає позиціонування нуклеосом, вже дана в підрозділі 3.2: тільки один внесок у вільну енергію утворення нуклеосоми – енергія деформацій подвійної спіралі – суттєво залежить від послідовності пар основ. Різниця між енергіями деформації різних ділянок (на рівні  $\sim 2 kT$  або іноді більше) і є головним механізмом переважного позиціонування нуклеосом відносно послідовності.

Залежність конформації ДНК та потенціалу щодо її змін від послідовності ілюструє таблиця 4.1, де представлено конформаційні параметри динуклеотидних кроків різного типу в складі білково-нуклеїнових комплексів. Ці значення є середніми для певного типу контакту між парами основ у 92 кристалічних структурах, де не спостерігається значних деформацій ДНК (нуклеосома не залучена до цього масиву даних). Тобто, хоча вплив білків на конформацію ДНК у цих комплексах безумовно має місце, ці данні є непоганим наближенням до структурних параметрів вільної ДНК у розчині за фізіологічних умов.

Як видно з таблиці, конформаційні параметри – особливо це стосується твіста, ролла та слайда – досить суттєво залежать від типу контакту між парами основ. У табл. 4.1 представлено також стандартні відхилення конформаційних параметрів, які показують, наскільки легко значення параметра може відхилитися від переважного середнього значення. Тобто, стандартні відхилення є мірою *конформаційної рухливості* контакту даного типу. Серед шести конформаційних параметрів два – твіст і ролл – найбільшою мірою (тобто з найменшими енергетичними витратами) здатні відхилитися від своїх рівноважних значень. Таке відхилення відповідає двом головним типам деформації подвійної спіралі – торсійне закручування/розкручування (зміна твіста) та вигин (зміна ролла). При цьому подвійна спіраль характеризується *анізотропією щодо вигину* – переважний внесок саме ролла, а не

тилта, у вигин ДНК призводить до того, що подвійна спіраль значно легше вигинається у бік жолобків, ніж у бік цукрофосфатного остова (що є цілком зрозумілим інтуїтивно і що повністю підтверджується аналізом структури ДНК у нуклеосомі, підпідрозд. 3.1.2).

**Таблиця 4.1. Параметри динуклеотидних кроків у кристалах білково-нуклеїнових комплексів**

	Shift (Å)	Slide (Å)	Rise (Å)	Tilt (°)	Roll (°)	Twist (°)
AA/TT	-0,03 (0,57)	-0,08 (0,45)	3,27 (0,22)	-1,4 (3,3)	0,7 (5,4)	35,1 (3,9)
AT	0,00 (0,57)	-0,59 (0,31)	3,31 (0,21)	0,0 (2,5)	1,1 (4,9)	29,3 (4,5)
TA	0,00 (0,52)	0,05 (0,71)	3,42 (0,24)	0,0 (2,7)	3,3 (6,6)	37,8 (5,5)
GG/CC	0,05 (0,76)	-0,22 (0,64)	3,42 (0,24)	-0,1 (3,7)	3,6 (4,5)	32,9 (5,2)
GC	0,00 (0,61)	-0,38 (0,56)	3,40 (0,24)	0,0 (3,9)	0,3 (4,6)	33,6 (4,7)
CG	0,00 (0,87)	0,41 (0,56)	3,39 (0,27)	0,0 (4,2)	5,4 (5,2)	36,1 (5,5)
AG/CT	0,09 (0,69)	-0,25 (0,41)	3,34 (0,23)	-1,7 (3,3)	4,5 (3,4)	31,9 (4,5)
GA/TC	-0,28 (0,46)	0,09 (0,70)	3,37 (0,26)	-1,5 (3,8)	1,9 (5,3)	36,3 (4,4)
AC/GT	0,13 (0,59)	-0,58 (0,41)	3,36 (0,23)	-0,1 (3,1)	0,7 (3,9)	31,5 (4,2)
CA/TG	0,09 (0,55)	0,53 (0,89)	3,33 (0,26)	0,5 (3,7)	4,7 (5,1)	37,3 (6,5)
Середнє*	0,00 (0,64)	-0,09 (0,69)	3,36 (0,25)	0,00 (3,6)	2,7 (5,2)	34,2 (5,5)

Для кожного параметра представлено середні значення та стандартні відхилення (в дужках) за даними Olson *et al.* (1998).

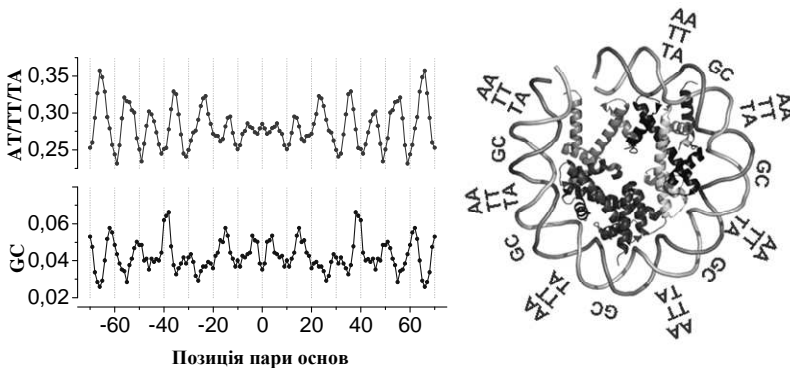
\*Середні значення є зваженими на загальну кількість контактів кожного типу в базі даних.

Загалом здатність динуклеотидного контакту до конформаційних змін залежить від ефективності стекінг-

взаємодій між даними парами основ, кількості водневих зв'язків у парах та типу екзоциклічних груп у жолобках. Все це визначає доступний конформаційний простір та енергію, яку необхідно витратити на деформацію. В цілому спостерігається наступна тенденція: піримідин-пуринові (YR) динуклеотидні кроки є найбільш конформаційно рухливими, пурин-піримідинові (RY) – найменш, кроки RR/YY займають проміжне положення. Серед кроків одного класу більш рухливими є кроки, збагачені на АТ-пари: наприклад, для YR-контактів рухливість щодо твіста і ролла знижується в ряду  $TA > CA/TG > CG$ . Таким чином, найбільш конформаційно рухливим серед усіх контактів є контакт TA: згадана в підрозділі 3.1.2 "сильно" позиційована нуклеосома-601 містить контакт TA у п'яти позиціях, де маленький жолобок обернений до поверхні октамера гістонів, ще в чотирьох таких позиціях розташовані інші піримідин-пуринові контакти – саме це, головним чином, і мінімізує енергію вигину і, відповідно, зумовлює високу схильність послідовності 601 до утворення нуклеосоми. Слід зауважити, що характер залежності конформації ДНК від послідовності є насправді більш складним: конформаційні особливості визначаються не тільки найближчими сусідами – типом контакту між парами основ, але певною мірою і контекстом послідовності, де даний контакт знаходиться.

Оскільки різні елементи послідовності (мінімальні – динуклеотидні кроки) розрізняються між собою за потенціалом щодо певних деформацій, найважливішими з яких для нуклеосоми є зміни ролла, твіста та слайда (підпідрозд. 3.1.2), в нуклеосомних ДНК проявляються певні закономірності частоти зустрічності різних динуклеотидів у різних позиціях. Наприклад, аналіз послідовностей ДНК, виділених з тотального препарату нуклеосом дріжджів вказує на те, що АТ-збагачені кроки частіше зустрічаються там, де маленький жолобок контактує з поверхнею октамера гістонів, а GC-збагачені частіше розташовані у протилежній фазі (рис. 4.2). Аналогічні статистичні закономірності виконуються і для інших еукаріотичних геномів, а також для нуклеосом

реконструйованих *in vitro* на геномних ДНК. Остання обставина вказує на те, що саме послідовність ДНК, а не інші фактори (конкуренція інших білків, специфічні механізми репозиціонування при ремоделюванні хроматину (див. наступний розділ), наднуклеосомна структура хроматину тощо) є головним чинником позиціонування.



**Рис. 4.2.** Частота зустрічності динуклеотидних кроків AA/TT/TA та GC вздовж нуклеосомних ДНК в геномі дріжджів (0 – центральна точка нуклеосомної ДНК). Праворуч: переважні позиції відповідних динуклеотидних кроків. За даними Segal *et al.* (2006).

Встановлені статистичні закономірності можна використати для передбачення позицій нуклеосом, шукаючи ділянки з найбільш сприятливим для утворення нуклеосом розподілом динуклеотидів. Передбачувальна сила таких алгоритмів сягає 50% – але не більше. Напевно, від статистичних підходів і не слід очікувати кращого. Статистичні закономірності виникають в результаті усереднення по багатьом послідовностям, в результаті чого суттєво зменшується “шум”: кожна *індивідуальна* нуклеосомна ДНК характеризується розподілом динуклеотидів, який лише трохи відрізняється від випадкового.

Більш перспективними є підходи, що базуються на прямій оцінці вільної енергії деформації ДНК певної послідовності. Проте, вони поки що не здатні привести до кращих результатів.

Найбільш повним на сьогодні джерелом інформації щодо залежних від послідовності еластичних властивостей ДНК є дані, отримані з кристалів білково-нуклеїнових комплексів (табл. 4.1). Але, по-перше, масив цих даних є не достатньо великим для надійної оцінки стандартних відхилень всіх конформаційних параметрів для всіх динуклеотидних кроків. По-друге, еластичні особливості залежать від типу динуклеотидів лише в першому наближенні – має значення також контекст послідовності. По-третє, кристалографічні дані завжди залишають питання про ступінь впливу сил упаковки кристалів на досліджувані параметри. По-четверте, в білково-нуклеїнових комплексах ДНК вже є більш-менш деформованою (хоча найбільш деформовані комплекси виключаються з аналізу щодо оцінки конформаційних параметрів), а розраховувати енергію деформації в нуклеосомі слід відносно вільної ДНК у розчині. Нарешті, сама нуклеосомна ДНК відрізняється структурним поліморфізмом, і адекватною оцінкою енергії її деформації є різниця між станами вільної ДНК, і такої нуклеосомної, яка мінімізує деформацію при забезпеченні міцних контактів з гістонами. Подальший розвиток зазначених підходів на основі накопичення знань щодо фізичних властивостей ДНК має відкрити нові можливості аналізу геномних послідовностей.

Розвиток сучасних геномних технологій зробив можливим тотальне експериментальне картування позицій нуклеосом у масштабі цілого геному з високим розділенням. Процедура такого картування, як правило, включає наступні етапи (з деякими можливими варіаціями). Живі клітини обробляють формальдегідом, пришиваючи всі хроматинові білки (в першу чергу – гістони) до ДНК, виділяють хроматин та обробляють його *мікрококковою нуклеазою*. Мікрококкова нуклеаза – неспецифічна ендонуклеаза, що здійснює дволанцюговий розріз. Оскільки обидва ланцюги є доступними лише в лінкерах (у нуклеосомі один з ланцюгів завжди зв'язаний з октамером гістонів), тільки лінкерні ділянки піддаються деградації. У свій час результати обробки хроматину мікрококковою нуклеазою стали одним із перших доказів нуклеосомної організації

хроматину: м'яка обробка нуклеазою продукує набір фрагментів ДНК із довжиною, кратною нуклеосомному повтору, – на електрофореграмі препарат ДНК має характерний вигляд "драбини" фрагментів, довжина яких відповідає моно-, ди-, три- і т.д. – олігонуклеосомам. Обробка нуклеазою протягом більшого часу продукує окремі мононуклеосоми – так звані нуклеосомні кор-частинки, що містять ДНК довжиною ~145 пар основ.

На наступному етапі отриманий матеріал – нуклеосомні кор-частинки – осаджують антитілами до гістонів (канонічних гістонів, певних гістонових варіантів або гістонів, що містять певні посттрансляційні модифікації) – описані етапи відповідають стандартній процедурі імунопреципітації хроматину (ChIP – Chromatin ImmunoPrecipitation). Далі після руйнування зшивки отримують набір фрагментів ДНК, що входили до складу нуклеосом. На завершальному етапі за допомогою одного з автоматичних експрес-методів секвенування встановлюють нуклеотидні послідовності нуклеосомних ДНК – усі фрагменти або секвенують повністю (методом піросеквенування), або встановлюють лише невеликі ділянки на 5'-кінцях (визначають границі нуклеосомних ДНК – використовуючи технології Illumina-Solexa або Applied Biosystems SOLiD). Після цього залишається знайти місця отриманих послідовностей у відомій повній послідовності геному – встановити позиції нуклеосом.

Останнім часом накопичено дані щодо такого картування в геномах дріжджів, нематоди, дрозофіли та людини. Певна річ, кожна ділянка геному має свої тонкі особливості щодо позиціонування нуклеосом. Зокрема, ділянки, де проявляється чіткий патерн позиціонування (рамка фазованих нуклеосом), змінюються ділянками, де цей патерн є розмитим (позиції нуклеосом перекриваються). Позиційовані нуклеосоми в досліджених у цьому відношенні геномах мають тенденцію бути розташованими на більш-менш фіксованих відстанях одна від одної: в геномі дріжджів *S. cerevisiae* сусідні нуклеосоми найчастіше розташовані на відстані ~165 п.о. (лінкер довжиною ~20 п.о.), у дрозофіли *D. melanogaster* та нематоди

*Caenorhabditis elegans* – ~175 п.о. (лінкер ~30 п.о.), геномі людини – ~185 п.о. (лінкер ~40 п.о.).

Найбільш вражаючі загальні закономірності проявляються щодо розташування нуклеосом відносно стартових точок транскрипції (рис. 4.3). У негативному напрямі (протилежному по відношенню до напрямку транскрипції) на відстані ~ –220 пар основ від стартової точки часто розташована позиційована нуклеосома (позначена як –1 на рис. 4.3, позиція нуклеосоми визначається як позиція центральної точки нуклеосомної ДНК). Відразу за нею у позитивному напрямі часто розташована зона, вільна від нуклеосом (NFR – Nucleosome-Free Region), довжиною ~150 пар основ – прогалина, де могла бути розміщена одна нуклеосома (слід зауважити, що для геному людини саме цю – часто відсутню – нуклеосому зазвичай позначають як –1, з метою уніфікації ми не будемо використовувати це позначення). За цією зоною, яка позначається як 5'-NFR, після стартової точки, розміщена сильно позиційована нуклеосома +1. В геномі дріжджів границя цієї нуклеосоми практично співпадає зі стартовою парою основ, у багатоклітинних еукаріотів границя нуклеосоми +1 розташована через ~10 пар основ у позитивному напрямі від стартової точки в неактивних промоторах, але через ~40 пар – в активних. Нуклеосоми +1 взагалі відносяться до найбільш сильно позиційованих в геномі. Таким чином, дві сусідні ділянки – з дуже низьким та дуже високим потенціалами щодо утворення нуклеосом – маркують старт транскрипції. Нуклеосома +1 задає рамку фазованих нуклеосом у кодуючій частині гена, яка згодом “затухає” і усереднений розподіл стає хаотичним. В області термінації транскрипції є інша характерна зона, вільна від нуклеосом, – 3'-NFR (рис. 4.3). В досить “компактному” геномі дріжджів 3'-NFR часто виступає і як 5'-NFR для сусіднього гена.

Зрозуміло, що 5'-NFR є зоною збірки преініціаторного комплексу РНК-полімерази, а 3'-NFR – збірки мультибілкового комплексу, від якого залежить термінація транскрипції (розділ 5). В принципі можна припустити, що існування обох цих зон є просто наслідком транскрипції – видалення нуклеосом з промоторів та термінаторів активних генів. Але збіднені

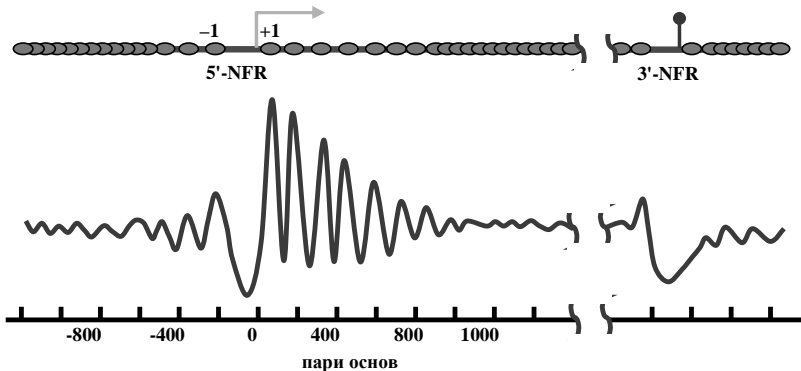
на нуклеосоми, реєструються також і в неактивних генах.

Крім того, загальна картина позиціювання нуклеосом є дуже подібною в живих клітинах дріжджів і в хроматині, реконструйованому на дріжджовій ДНК *in vitro*, – тобто тоді, коли залишається тільки послідовність пар основ у якості єдиного фактора позиціювання. Між розподілами нуклеосом *in vitro* та *in vivo* є певні відмінності (поява або зникнення деяких нуклеосом, зміна трансляційних позицій), але вони виглядають як модуляції позиціювання за рахунок специфічних чинників. Отже, головним фактором, що визначає позиції нуклеосом, є послідовність пар основ, у тому числі це стосується особливостей розподілу нуклеосом в зоні стартових точок транскрипції. Зокрема, у складі 5'-NFR дріжджів часто зустрічаються треки poly(dA)-poly(dT) – такі ділянки характеризуються підвищеною жорсткістю щодо вигину, що сприяє формуванню вільної від нуклеосом прогаліни.

Цілком можливо, що саме особливості розташування нуклеосом і визначають еукаріотичний промотор. В зоні старту транскрипції (так званому базальному промоторі) часто зустрічаються стандартні елементи послідовності (зокрема, ТАТА-бокс). Але велика частка еукаріотичних промоторів не містить таких елементів – як в таких випадках система транскрипції визначає промотор, залишалася не зовсім зрозумілим. Наявність 5'-NFR, фланкованих позиційованими нуклеосомами, дає вірогідне рішення цієї проблеми. Базальні фактори транскрипції мають у своєму складі структурні елементи, здатні взаємодіяти з певним чином модифікованими гістоновими хвостами (наприклад, бромодомени в складі TFIIID). При цьому нуклеосоми –1 та +1 збагачені на ацетиловані форми гістонів, гістоновий варіант H2A.Z та метильований H3Lys4 – все це сприяє впізнанню цих нуклеосом факторами транскрипції. Отже, сильно позиційована нуклеосома +1 та вільна від нуклеосом ділянка ДНК поряд із нею формують зручний сайт для початкових етапів збірки преініціаторного комплексу. Цілком можливо, що стандартні елементи базального промотору виникли в процесі еволюції



пізніше – як адаптація, що підсилює спорідненість до компонентів преініціаторного комплексу.



**Рис. 4.3.** Приблизний усереднений по всім стартовим точкам транскрипції розподіл нуклеосом відносно старту (нульова точка). Крива відображає частоту (у логарифмічній шкалі) зустрічності даної пари основ у складі нуклеосом. На верхній панелі нуклеосоми зображено як овали; зелена стрілка – старт транскрипції; червоне коло – сайт термінації транскрипції; NFR – зони, вільні від нуклеосом;  $-1$  та  $+1$  – дві нуклеосомы, що фланкують старт транскрипції.

Нааявність позиційованих нуклеосом по обидва боки від 5'-NFR має також інший наслідок: початкова збірка преініціаторного комплексу є недостатньою для ініціації транскрипції. Підсилення збірки залежить від доступності специфічних елементів промотору для факторів транскрипції, розташованих зазвичай у негативному напрямі від стартової точки. Це може потребувати зміни позицій чи видалення нуклеосом, зокрема нуклеосомы  $-1$ . Аналогічно, остаточне розташування РНК-полімерази на стартовій точці та ініціація її руху потребують дестабілізації та тимчасового видалення нуклеосомы  $+1$ , яка являє собою суттєвий бар'єр. Вказані вище модифікації, присутні в позиційованих нуклеосомы, як і

присутність H2A.Z, сприяють видаленню/репозиціюванню цих нуклеосом при ремоделюванні активних промоторів, від якого залежить ефективна ініціація транскрипції (розділ 5). Взагалі, слід пам'ятати, що представлений на рис. 4.3 розподіл нуклеосом є *усередненим* по багатьом промоторам – всі ці промотори можна розподілити на певні групи, що мають свої особливості, які часто залежать від стану даного гена щодо його транскрипційної активності – це питання також обговорюватиметься у розділі 5.

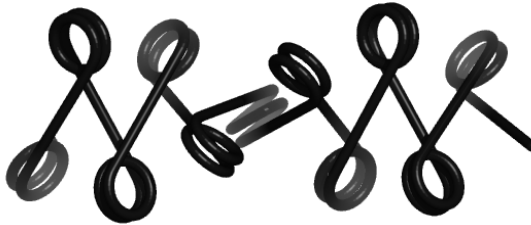
#### **4.2. Структура та динаміка хроматинової фібрили**

У транскрипційно активних ділянках хроматин може бути збідненим на гістон H1 і знаходитись у деконденсованому стані полінуклеосомного ланцюга. Проте, більша частина хроматину являє собою компакту фібрилу товщиною 30 нм, до стабілізації якої задіяний гістон H1.

Перш ніж перейти до ролі гістона H1, варто розглянути, що власне являє собою полінуклеосомний ланцюг за своєю просторовою структурою. У хроматині нуклеосоми з'єднані лінкерами довжиною ~20–50 пар основ. Якщо лінкер, на який не накладено жодних структурних обмежень, просто продовжує хід нуклеосомної ДНК по прямій, нуклеосоми у складі полінуклеосомного ланцюга мають бути розташовані приблизно так, як показано на рис. 4.4 – конкретна геометрія буде варіювати в залежності від довжини та твіста лінкера. Проекція такої конфігурації на площину дає зигзаг – саме такий вигляд має декомпактизована (у відсутності H1 та за низької іонної сили) полінуклеосомна фібрила під мікроскопом (електронним чи атомно-силовим). Товщина такого тривимірного зигзага як раз і дорівнює приблизно 30 нм.

Аксіальна конденсація полінуклеосомного зигзага відбувається за фізіологічних значень іонної сили (100–150 мМ NaCl, присутність двовалентних катіонів підсилює здатність до компактизації). Неорганічні катіони (необхідна, але не достатня умова конденсації) забезпечують певний рівень нейтралізації фосфатів і, відповідно, зниження електростатичного

розштовхування між наближеними одна до одної лінкерними ділянками та нуклеосомами в складі конденсованої фібрили. Головною рушійною силою конденсації є невпорядковані хвости корових гістонів: лабільні позитивно заряджені хвости ефективно “зшивають” фібрилу, взаємодіючи з лінкерами та ДНК сусідніх нуклеосом. При ензиматичному видаленні хвостів компактизація фібрили є неможливою навіть у присутності H1, і навпаки – без H1 компактизація відбувається тільки за рахунок хвостів корових гістонів. Відповідно, ацетилювання хвостів сприяє деконденсації хроматину в активних та потенційно активних ділянках. Найбільш важливу роль у сприянні конденсації відіграють N-кінцеві хвости гістонів H3 та H4.



**Рис. 4.4.** Зигзагоподібна конфігурація полінуклеосомного ланцюга.

Гістонові хвости можуть взаємодіяти не тільки з ДНК. Зокрема, N-кінцевий хвіст H4 здійснює контакти з негативно зарядженим сайтом на поверхні димера H2A-H2B іншої нуклеосоми. Крім того, у кристалічній структурі тетрануклеосом (фрагмента полінуклеосомної фібрили, “замороженого” у компактному стані, рис. 18, кольор. вст.), – спостерігається “стекинг” нуклеосомних дисків – взаємодії між глобулярними частинами димерів H2A-H2B різних нуклеосом.

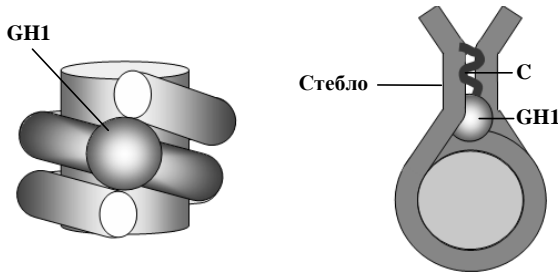
Таким чином, наявність лабільних позитивно заряджених хвостів корових гістонів призводить до появи своєрідних сил притягання між нуклеосомами. Проте, ці сили є досить слабкими: хвости швидко осцилюють, зв'язуючись з ділянками ДНК на короткий час. За низької іонної сили електростатичне

розштовхування призводить до декомпактизації фібрили, а за фізіологічних умов сили розштовхування приблизно компенсуються силами притягання – сумарна вільна енергія взаємодії між нуклеосомами в компактному стані фібрили відносно деконденсованого приблизно дорівнює нулю. Тобто, і це підтверджується багатьма експериментами, полінуклеосомна фібрила є динамічним утворенням – ділянки фібрили осцилюють між приблизно рівноймовірними компактизованим та декондесованим станами.

Натомість, у присутності лінкерного гістона H1 за фізіологічної іонної сили компактна фібрила стає значно більш стабільною: за результатами розтягування такої фібрили оптичним пінцетом (Cui, Bustamante, 2000), сумарна вільна енергія стабілізації компактного стану дорівнює  $\sim -3,4$  *kT* на одну нуклеосому. Таке значення вказує, що компактна фібрила, сформована за участі H1, все рівно залишається досить динамічною –  $\sim 4$  % часу будь-які дві сусідні нуклеосоми втрачають контакт та переходять у деконденсований стан. Молекулярне моделювання з використанням даних по розтягуванню свідчить про організацію фібрили, сформованої за участі H1, як нерегулярного флуктуюючого зигзага. Тобто, гістон H1 не створює нової структури, а просто використовує внутрішні властивості фібрили для додаткової стабілізації її компактного стану.

З однією нуклеосомою в хроматині взаємодіє (якщо взаємодіє, див. нижче) одна молекула H1. Глобулярний домен H1 (приблизно 80 амінокислот) належить до родини “спіральної із крильцем” ДНК-зв’язувальних білків (рис. 7, кольор. вст.). По поверхні домена розподілені позитивно-заряджені залишки, що зумовлює можливість його взаємодії із наближеними у просторі ділянками ДНК. Відповідно, глобулярний домен, найімовірніше, зв’язується з двома ділянками ДНК на початку лінкерів (довжиною по  $\sim 10$  пар основ), що виходять з нуклеосоми, а також взаємодіє з центральною ділянкою нуклеосомної ДНК довжиною 10 пар основ, симетрично розташованою відносно центральної пари основ (рис. 4.5). Напевно, “первинним” сайтом зв’язування є маленький жолобок подвійної спіралі,

експонований назвнї у позиції SHL0. Наслїдком взаємодїї GH1 із зазначеними дїлянками є додаткова стабілізація нуклеосомної суперспїралї у складї хроматосоми.

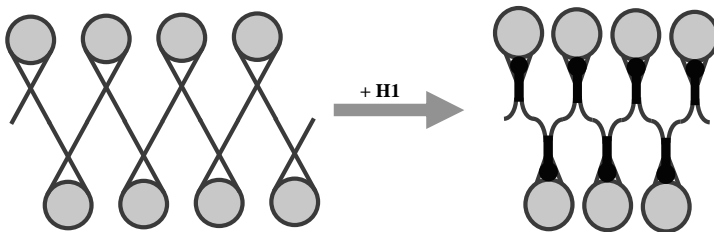


**Рис. 4.5.** Схема взаємодїї глобулярного домена GH1 та С-кінцевого хвоста (С) гістона Н1 з нуклеосою.

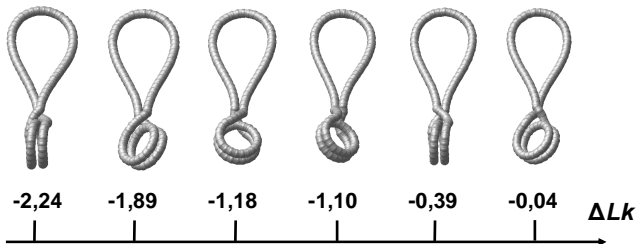
С-кінцевий хвіст Н1 взаємодїє з обома лїнкерами (довжиною по 10-30 пар основ), що виходять з нуклеосоми. Важливим результатом цієї взаємодїї є об'єднання двох лїнкерів на виходї з нуклеосоми у стеблоподїбну структуру (рис. 4.5). Цьому стеблу, а також додатковї суттєвїй нейтралїзацї негативно заряджених лїнкерів С-кінцевим хвостом Н1, належить ключова роль у стабілізацїї компактної хроматинової фїбрили: за рахунок стебла сусїднї нуклеосоми значно зближуються, що сприяє конденсацїї (рис. 4.6). Тобто, присутнїсть Н1 наближає нуклеосоми одна до одної у складї фїбрили, чим сприяє “зшиванню“ цих нуклеосом хвостами корових гістонів. І навпаки, компактизація фїбрили за участю хвостів корових гістонів сприяє зв'язуванню Н1 із наближеними у просторї дїлянками лїнкерів.

Стебло, сформоване на виходї з нуклеосоми за рахунок взаємодїї з гістоном Н1, характеризується важливими властивостями, якї виявляються в експериментах з хроматосомами, реконструйованими на мїніциклах. Аналіз результатів релаксацїї таких мїніциклів топоїзомеразою I вказує на те, що Н1-залежне стебло являє собою подвїйну суперспїраль з дуже великим кроком, яка складається з двох лїнкерів: лїнкери трохи закручуються один навкруг одного в той чи іншій бїк

(рис. 4.7). Найбільш характерною ознакою стебла при цьому є його висока торсійна еластичність: ступінь взаємного закручування лінкерів у тому чи іншому напрямі змінюється дуже легко, з маленькими енергетичними витратами. Таким чином, гістон H1 вносить ще більшу пластичність у хроматинову фібрилу (підрозділ 3.3). Можливість легкого обертання навкруг стебла має значення для адаптації нуклеосом до свого оточення у складі компактної фібрили – реалізації компактного стану незалежно від довжини лінкерів, яка може варіювати вздовж полінуклеосомного ланцюга.



**Рис. 4.6.** Роль H1-залежного стебла на виході з нуклеосоми у стабілізації компактного стану хроматинової фібрили.



**Рис. 4.7.** Набір конфігурацій мініциклів за різних значень  $\Delta Lk$  демонструє обертання нуклеосом навкруг стебла у відповідь на зміну надспіралізації. Адаптовано з роботи Sivolob, Prunell (2003).

Одна молекула гістона H1 не обов'язково взаємодіє з *кожною* нуклеосою – загальний вміст гістона H1 у хроматині залежить від типу клітин. Кількість молекул H1 на одну нуклеосому та середня величина нуклеосомного повтору в деяких з них наведені у табл. 4.2. Із представлених у таблиці даних є очевидними два висновки. По-перше, кількість H1 є обернено пропорційною до величини нуклеосомного повтору. Імовірно, зниження кількості H1 вмикає певні компенсаторні механізми, спрямовані на підвищення вмісту корових гістонів (і загальної кількості нуклеосом) з метою підтримати загальний баланс негативних та позитивних зарядів у хроматині. По-друге, кількість H1 у хроматині є обернено пропорційною до загального рівня транскрипційної активності: репресований хроматин (еритроцити) характеризується підвищеним вмістом лінкерних гістонів, активний (стовбурові клітини, нейрони, клітини дріжджів) – суттєво зниженим.

Слід при цьому мати на увазі, що, на відміну від корових гістонів, взаємодія H1 з нуклеосою є значно слабкішою (повна дисоціація H1 відбувається у 0,6 М NaCl) і надзвичайно динамічною: спостерігається швидкий обмін лінкерних гістонів між хроматином та їхнім пулом у ядрі; середній час присутності молекули H1 у зв'язаному стані оцінюється в живих клітинах в 1–2 хв. Можна сказати, що молекули гістона H1 є узагальненими всіма нуклеосомами, і підвищення рівня їхньої присутності в хроматині приводить до тотального зниження рівня транскрипційної активності шляхом стабілізації компактного стану хроматинової фібрили.

Тонкі особливості внутрішньої структурної організації хроматинової фібрили залишаються недостатньо з'ясованими. Існуючі моделі можна розділити на два основні типи (рис. 19, кольор. вст.). Модель соленоїда (історична перша запропонована модель) передбачає, що полінуклеосомна фібрила утворює спіраль, в складі якої нуклеосоми взаємодіють між собою площинами своїх дисків. При цьому стекінг здійснюється між сусідніми по ланцюгу нуклеосомами, які з'єднані вигнутими лінкерами. Моделі другого типу передбачають, що фібрила сформована зигзагом нуклеосом: або

закрученим у спіральну стрічку так, що лінкери орієнтовані під кутом від 0 до 50° до осі фібрили; або (модель схрещених лінкерів) компактизованим так, що лінкери приблизно перпендикулярні до осі. У моделях цього другого типу стекинг здійснюється між нуклеосомами, що розділені по ланцюгу – між  $i$ -тою та  $(i+2)$ -ю,  $(i+3)$ -ю або  $(i+5)$ -ю (рис. 19, кольор. вст., порівн. рис. 4.4, 18, кольор. вст.). Сучасні експериментальні дані (у тому числі, представлена на рис. 18, кольор. вст. структура кристалів тетрануклеосом) краще узгоджуються з моделями другого типу.

**Таблиця 4.2. Стехіометрія H1 та довжина нуклеосомного повтору в хроматині клітин різних типів**

Тип клітин	Відношення H1/нуклеосома	Нуклеосомний повтор (пари основ)
Тимус миші	0,83	196
Печінка миші	0,79	195
Ембріональні стовбурові клітини миші	0,5	189
Еритроцити курки*	1,3	212
Нейрони щура	0,45	162
Гліальні клітини щура	1,04	201
<i>S. cerevisiae</i> **	0,03–0,25	165

\* гістон H5

\*\* гістон H1

За даними, систематизованими Woodcock *et al.* (2006)

Розмаїття запропонованих у різний час моделей організації хроматинової фібрили відображає, найімовірніше, певний



структурний поліморфізм, який залежить, у першу чергу, від довжини лінкерів. Ця довжина у хроматині зазвичай "квантується" – є кратною  $\sim 10$  парам основ, тобто приблизно цілій кількості витків подвійної спіралі (лінкер довжиною 20, 30, 40 пар основ відповідає нуклеосомному повтору 167, 177, 187 пар основ). Така властивість лінкерів, імовірно, пов'язана з необхідністю оптимізації загального твіста між нуклеосомами для досягнення необхідного ступеня компактизації – додавання зайвої пари основ у лінкер призведе до обертання наступної нуклеосоми навкруг лінкера на  $\sim 34^\circ$  (що відповідає куту твіста за періодичності 10,5 п.о./виток). Обмеження, що накладаються загальним твістом ДНК на геометрію фібрили, вказують також, що рівномірний розподіл нуклеосом (уніфікована та при цьому оптимальна довжина лінкерів) мають сприяти компактизації полінуклеосомного ланцюга.

У регулярних фібрилах, реконструйованих з використанням ДНК, послідовність якої складається з тандемних повторів певної довжини (кожен повтор містить одну позиційовану нуклеосому), довжина лінкерів є уніфікованою вздовж фібрили. Електронно-мікроскопічне дослідження таких фібрил (Robinson *et al.*, 2006) вказує, що товщина фібрили залишається постійною ( $\sim 33$  нм) для нуклеосомного повтору від 177 до 207 пар основ, при цьому рівень компактизації становить  $\sim 11$  нуклеосом на 11 нм вздовж фібрили. Для нуклеосомних повторів від 217 до 237 пар основ відбувається різке підвищення товщини до  $\sim 45$  нм та рівня компактизації до  $\sim 15$  нуклеосом на 11 нм.

Результати молекулярного моделювання таких фібрил представлено на рис. 20, кольор. вст.. Коротка довжина лінкера (повтор 177 пар основ) практично не дозволяє сформувати повноцінне стебло на виході з нуклеосоми. У складі фібрили здійснюється стекінг між кожною  $i$ -тою та  $(i+5)$ -ю нуклеосомою, хоча сусідні по ланцюгу нуклеосоми є також сусідніми в складі суперспіралі, що утворюється полінуклеосомним ланцюгом. Ця структура дещо нагадує модель соленоїда, яка передбачала стекінг між сусідніми по ланцюгу нуклеосомами. Зростання довжини лінкера дозволяє формування стебла, при цьому лінкери перехрещуються всередині фібрили, а загальна

топологія розташування нуклеосом у фібрилі поступово змінюється (рис. 20, кольор. вст.). У всіх випадках гістон H1 опиняється всередині хроматинової фібрили, що відповідає факту, добре встановленому експериментально різноманітними методами.

Таким чином, імовірно, єдиної регулярної структури для хроматинової фібрили просто не існує: деталі просторової організації суттєво залежать від довжини лінкерів. Зрозуміло, що хроматинова фібрила, гетерогенна за довжиною лінкерів, є досить нерегулярною структурою. І навпаки: регулярне розташування нуклеосом (властиве, зокрема, гетерохроматиновим ділянкам) сприяє стабілізації хроматинової фібрили.

Нерегулярність фібрили виникає не тільки внаслідок варіації довжини лінкерів. По-перше, у репресованих ділянках (які становлять більшу частину хроматину в диференційованих клітинах еукаріотів) хроматинова фібрила може бути як додатково стабілізованою у компактному стані, так і піддаватися компактизації більш високого порядку за рахунок взаємодії з особливими негістоновими білками. Система утворення та підтримання гетерохроматинового статусу тісно пов'язана з гістоновим кодом і розглядатиметься у розділі 5, але деталі структури гетерохроматину залишаються нез'ясованими.

По-друге, нерегулярність структури хроматинової фібрили є наслідком її динаміки. Тимчасова дисоціація гістона H1, яка полегшується ацетилюванням корових гістонів, модифікаціями самого H1, а також конкурентними взаємодіями з ДНК інших білків (зокрема, HMGb), призводить до деконденсації фібрили – створює “вікно можливості” для доступу регуляторних білків до їх специфічних сайтів на ДНК.

### **4.3. Хроматинова фібрила у клітинному ядрі**

Експерименти, в яких вимірювалась дифузія інертного барвника у просторі ядра (Bancaud *et al.*, 2009), приводять до висновку, що хроматин у клітинному ядрі можна описати в термінах фрактальної геометрії (фрактал – складна геометрична

фігура, що складається з багатьох частин, де кожна частина подібна до всієї фігури в цілому). Простір ядра можна розділити на "компарменти" двох типів – більш та менш щільні, тобто, відповідно, гетеро- та еухроматинові. Дифузія флуоресцентного зонда є загальмованою (більшою мірою – в гетерохроматинових компарментах), але при цьому параметри дифузії не залежать від розміру зонда, і всі ділянки хроматину (навіть у гетерохроматинових компарментах) зберігають доступність для нього (рис. 21, кольор. вст.).

До аналогічних висновків приводять результати вивчення контактів між віддаленими по ланцюгу ділянками хроматину у клітинному ядрі (Lieberman-Aiden *et al.*, 2009). Застосована для цього техніка (так звана Hi-C) базується на масованому секвенуванні великої кількості пар коротких фрагментів ДНК, які вилучаються з ділянок хроматину, зшитих формальдегідом (варіація методики "фіксації конформації хромосом" – chromosome conformation capture (3C)). Результати такого картування контактів знову вказують на існування компарментів двох типів. В межах компармента одного типу взаємодії між віддаленими по ланцюгу ділянками однієї хромосоми, а також між ділянками різних хромосом, є більш імовірними, ніж взаємодії між ділянками, що належать різним компарментам. Компарменти двох типів розрізняються своєю щільністю та займають різні просторові зони ядра.

Отже, хроматинова фібрила утворює своєрідну глобулу великого розміру особливого типу – так звану *фрактальну глобулу*: полімер "зминається" у субглобули, які, у свою чергу, утворюють глобули більш високого рівня. У результаті полімер заповнює певну область простору, не утворюючи вузлів, а окремі ділянки ланцюга зберігають можливість оберненої де/ре-компактизації. Розділені по ланцюгу гетерохроматинові ділянки, взаємодіючи між собою, опиняються у більш компактних зонах фрактальної глобули, а менш компактні еухроматинові – "випетлюються" з неї.

Таке випетлювання є тільки одним із проявів загального феномену утворення петель або петлевих доменів хроматину, які мають різноманітне походження: будь-яка ситуація, коли

розділені по ланцюгу ділянки хроматинової фібрили взаємодіють між собою, приводить до утворення петлі. Петлі, які можна назвати динамічними, виникають на порівняно невеликий проміжок часу внаслідок білок-білкових взаємодій між віддаленими ділянками хроматину. Такі петлі формуються, наприклад, у відповідь на регуляторні сигнали між енхансерами та промоторами або при залученні різних промоторів до так званих транскрипційних фабрик – місць імобілізації кількох РНК-полімеразних комплексів (розділ 5). Аналогічно, віддалені ділянки фібрили можуть об'єднуватись між собою у репресорні комплекси, специфічні для клітин даного типу, – при цьому здійснюється інактивація генів, які потрапляють у приєднанні до такого комплексу петлеві домени. Відомим прикладом таких репресорних комплексів є так звані полікомб-тільця (polycomb bodies) – дискретні утворення, сформовані спеціальними білками полікомбу (PcG, Polycomb Group proteins).

Крім того, існують також "конститутивні" петлі хроматину, закріплені на скелетних структурах ядра. Головним результатом на користь існування таких петель є утворення так званих нуклеоїдів після видалення мембран та більшості білків клітинного ядра детергентами та високими концентраціями солі. Нуклеоїд виглядає як зона з високою концентрацією ДНК та остаточною білковим компонентом, що залишається після процедури лізису, навкруг якої формується гало, що складається з надспіралізованих петель ДНК розміром від 2 до 200 тис. пар основ. Зрозуміло, що тимчасові або специфічні лише для даного типу клітин петлі також можуть закріплюватись на скелетних структурах ядра.

Можна виділити принаймні три аспекти існування петельних доменів хроматину:

- об'єднання віддалених ділянок хроматину в основі петлі є важливим елементом регуляції генної активності, оскільки таке об'єднання може призводити до взаємного підсилення активації або репресії транскрипції на різних ділянках;
- зафіксована на білках певного типу основа петлі може слугувати своєрідним бар'єром, що просторово розмежовує різні у функціональному відношенні ділянки хроматину;

- оскільки основи петлі фіксуються, ДНК у складі петлі має топологічні обмеження, тобто є еквівалентною циркулярній.

Роль скелетної структури ядра, на якій закріплюються петлі хроматину, зазвичай відводиться *ядерному матриксу* – системі білкових філаментів у просторі ядра. Ділянки ДНК довжиною від 300 до 1 тис. пар основ, що взаємодіють з матриксом (основи петлевих доменів), позначають як MAR (Matrix Associated Regions).

Філаменти ядерного матриксу вдається візуалізувати під електронним мікроскопом тільки після спеціальної обробки та видалення з ядра ДНК та більшості білків – не виключено, що розгалужена сітка філаментів утворюється саме в результаті такої обробки, тобто є артефактом. Крім того, на сьогодні білки ядерного матриксу (майже єдиним виключенням є білок SATB1, який має підвищену спорідненість до АТ-збагачених ділянок ДНК і експресується тільки в тимоцитах ссавців) та характер їхньої взаємодії з ДНК настільки погано охарактеризовані, що це дає підстави для сумнівів в існуванні розгалуженого внутрішньоядерного матриксу. Іншим аргументом проти наявності розгалуженої сітки білкових філаментів всередині ядра є достатньо висока швидкість дифузії білків та мРНК у внутрішньоядерному просторі. Слід підкреслити, що дискусійним залишається питання про існування матриксу як мережі філаментів, що пронизує *увесь* об'єм ядра: елементи матриксу – порівняно короткі філаменти (що складаються, зокрема з актину, а також деяких інших білків), з якими може взаємодіяти хроматинова фібрила, безсумнівно існують всередині ядра.

На відміну від внутрішньоядерного матриксу, периферійна сітка білкових філаментів – ядерна ламіна, яка тісно зв'язана з внутрішньою ядерною мембраною і, таким чином, є складовою ядерного конверта (див. рис. 1.1), вивчена значно краще. Головними структурними компонентами ламіни є білки двох типів, що називаються ламінами. Ламіни типу А (присутні також і всередині ядра, де можуть утворювати білкові філаменти) є водорозчинними і вільно дифундують у просторі клітини після руйнування ядерного конверта при клітинному поділі. Ламіни

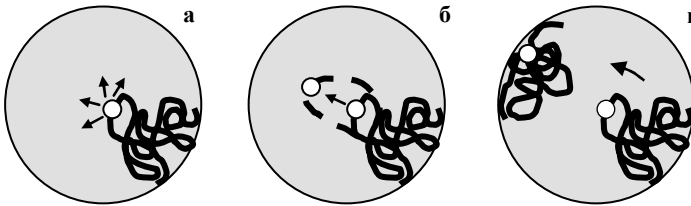
типу В – мембранні білки, тісно зв'язані з внутрішньою мембраною, які залишаються на фрагментах мембрани при її руйнуванні в ході мітозу. Ламіни мають три структурні домени: глобулярні N- та С-кінцевий, з'єднані довгою  $\alpha$ -спіраллю. Дві  $\alpha$ -спіралі забезпечують димеризацію субодиниць (утворюється двоспіральна структура – coiled coil), а глобулярні домени димерів взаємодіють між собою за принципом "голова до хвосту" з утворенням філаменту завтовшки  $\sim 10$  нм (відноситься до категорії проміжних філаментів (intermediate filaments) цитоскелету, які є більш тонкими у порівнянні з мікротрубочками, але більш товстими у порівнянні з актиновими фібрилами). Крім того, з ламіновими філаментами тісно асоційовані ще кілька білків. Зокрема: LBR – рецептор ламінів В – мембранний білок, що взаємодіє з ламінами В, а також з ДНК, гістонами та гетерохроматиновими білками; Lap2 $\beta$  – взаємодіє з ядерною мембраною та ламінами В, а також з деякими репресорами транскрипції; Emerin – мембранний білок, що взаємодіє з ламінами А, а також з актином та репресорами транскрипції.

Філаменти ламіни утворюють своєрідну "геодезичну" сітку, у вузлах якої знаходяться ядерні пори – філаменти протягнуті від однієї ядерної пори до іншої і позиціонують порові комплекси у площині ядерної оболонки. На ламіні та порових комплексах розпочинаються також білкові філаменти (актинові, такі, що складаються з ламінів А або інших білків), протягнуті всередину ядра на довжину в  $\sim 100\text{--}300$  нм. За рахунок спорідненості білків ламіни до гетерохроматинових білків (зокрема, HP1, який розглядатиметься у розділі 5), а також до гетерохроматинових хімічних маркерів гістонів, ламіна зв'язує гетерохроматинові зони – в першу чергу, це стосується центромерних та теломерних зон хромосом. Проте, на ділянках фібрили, зв'язаних з ламіною, є можливою також і транскрипція – в першу чергу це стосується ділянок хроматину, асоційованих з поровими комплексами. Цілком імовірно, що "конститутивні петлі", які утворюють гало нуклеоїдів, являють собою петлі ДНК, зв'язані саме з ламіною.

Таким чином, інтерфазна хромосома фіксується на ламіні своїми центромерою та теломерами, а еухроматинова частина

хромосоми опиняється глибше всередині ядра – частково закріплюючись там (або ні) на внутрішніх елементах ядерного матриксу. В межах *хромосомної території* – області простору, яку займає хромосома, – спостерігається "градієнт транскрипційної активності" – активність зростає від периферії ядра до його центру. В тому ж напрямку зростає загальна щільність генів, і, відповідно, знижується щільність некодуючих ділянок ДНК та відносний вміст АТ-пар у її складі.

Хроматинова фібрила, розташована в межах хромосомної території, здатна рухатись – як під дією теплових флуктуацій, так і внаслідок роботи молекулярних моторів. Основні типи такої рухливості зображено на рис. 4.8.



**Рис. 4.8.** Три типи рухливості інтерфазної хромосоми: (а) швидкі безладні рухи хромосомного локусу (світла кулька) на відстань менше 1 мкм за кілька секунд; (б) повільні (за кілька хвилин) АТР-залежні спрямовані рухи на кілька мікронів; (в) переміщення хромосоми на іншу територію після клітинного поділу, яке регулюється факторами диференціювання клітин.

Адаптовано з Soutoglou, Misteli (2007).

По-перше, окремі хромосомні локуси здійснюють безладний броунівський рух в секундному часовому інтервалі у невизначеному напрямі (рис. 4.8, а). Такий рух є обмеженим невеликою зоною простору (не більше ~0,5 мкм), при цьому більш загальмованими є рухи хроматинових ділянок, що розташовані ближче до периферії ядра. По-друге, в ядрі зафіксовані більш значні та спрямовані рухи окремих локусів, які залежать від присутності АТР, актину та міозину I, – тобто,

такі рухи, напевно, забезпечуються актоміозинними молекулярними моторами (рис. 4.8, б). Нарешті, в процесі індивідуального розвитку та диференціювання клітин для окремих локусів спостерігаються передислокації в іншу область ядра (зі зміною хромосомної території), при цьому активні локуси зазвичай переміщуються ближче до центру, репресовані – до периферії ядра (рис. 4.8, в). Напевно, такі рухи знаходяться під контролем загальної програми дозрівання клітин даного типу і здійснюються після чергового клітинного поділу.

Рухливість хроматинової фібрили в межах хромосомної території, а також часткове перекриття сусідніх хромосомних територій, створюють умови для міжхромосомних взаємодій. Отже, взаємне підсилення активації або репресії транскрипції на віддалених ділянках хроматину відбувається не тільки внаслідок утворення петлевих доменів у межах однієї хромосоми, а також у тих випадках, коли такі ділянки належать до різних хромосом.

## Рекомендована література

### *Загальна*

*Arya, G., Maitra, A., Grigoryev, S.A.* A structural perspective on the where, how, why, and what of nucleosome positioning // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2010. – Vol. 27. – P. 803-821.

*Horowitz-Scherer, R.A., Woodcock, C.L.* Organization of interphase chromatin // *Chromosoma.* – 2006. – Vol. 115. – P. 1-14.

*Rando, O.J., Chang, H.Y.* Genome-wide views of chromatin structure // *Annu. Rev. Biochem.* – 2009. – Vol. 78. – P. 245-271.

*Woodcock, C.L.* Chromatin architecture // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2006. Vol. 16. – P. 213-220.

*Woodcock, C.L., Ghosh, R.P.* Chromatin higher-order structure and dynamics // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2010. – Vol. 2. – a000596.

### *Механізми позиціонування нуклеосом*



*Balasubramanian, S., Xu, F., Olson, W.K.* DNA sequence-directed organization of chromatin: structure-based computational analysis of nucleosome-binding sequences // *Biophys. J.* – 2009. – Vol. 96. – P. 2245-2260.

*Drew, H.R., Travers, A.A.* DNA bending and its relation to nucleosome positioning // *J. Mol. Biol.* – 1985. – Vol. 186. – P. 773-790.

*Ioshikhes, I.P., Albert, I., Zanton, S.J., Pugh, B.F.* Nucleosome positions predicted through comparative genomics // *Nat. Genet.* – 2006. – Vol. 38. – P. 1210-1215.

*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. – P. 19-42.

*Morozov, A.V., Fortney, K., Gaykalova, D.A., Studitsky V.M., Widom J., Siggia E.D.* Using DNA mechanics to predict in vitro nucleosome positions and formation energies // *Nucl. Acids Res.* – 2009. – Vol. 37. – P. 4707-4722.

*Radman-Livaja, M., Rando, O.J.* Nucleosome positioning: how is it established, and why does it matter? // *Dev. Biol.* – 2010. – Vol. 339. – P. 258-266.

*Segal, E., Widom, J.* What controls nucleosome positions? // *Trends Genet.* – 2009. – Vol. 25. – P. 335-343.

*Tolstorukov, M.Y., Colasanti, A.V., McCandlish, D.M., Olson, W.K., Zhurkin, V.B.* A novel roll-and-slide mechanism of DNA folding in chromatin: Implications for nucleosome positioning // *J. Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 371. – P. 725-738.

*Widom, J.* Role of DNA sequence in nucleosome stability and dynamics // *Quart. Rev. Biophys.* – 2001. – Vol. 34. – P. 269-324.

*Wu, B., Mohideen, K., Vasudevan, D., Davey, C.A.* Structural insight into the sequence dependence of nucleosome positioning // *Structure.* – 2010. – Vol. 18. – P. 528-536.

*Xu, F., Olson, W.K.* DNA architecture, deformability, and nucleosome positioning // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2010. – Vol. 27. – P. 725-739.

### ***Позиціювання нуклеосом у геномах***

Boyle, A.P., Davis, S., Shulha, H.P., et al. High-resolution mapping and characterization of open chromatin across the genome // *Cell*. – 2008. – Vol. 132. – P. 311-322.

Jiang, C., Pugh, B.F. Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics // *Nat. Rev. Genet.* – 2009. – Vol. 10. – P. 161-172.

Kaplan, N., Moore, I.K., Fondufe-Mittendorf, et al. The DNA-encoded nucleosome organization of a eukaryotic genome // *Nature*. – 2009. – Vol. 458. – P. 362-366.

Lee, W., Tillo, D., Bray, N., et al. A high-resolution atlas of nucleosome occupancy in yeast // *Nat. Genet.* – 2007. – Vol. 39. – P. 1235-1244.

Mavrich, T.N., Jiang, C., Ioshikhes, et al. Nucleosome organization in the *Drosophila* genome // *Nature*. – 2008. – Vol. 453. – P. 358-362.

Segal, E., Fondufe-Mittendorf, Y., Chen, L., et al. A genomic code for nucleosome positioning // *Nature*. – 2006. – Vol. 442. – P. 772-778.

Schones, D.E., Cui, K., Cuddapah, S., et al. Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome // *Cell*. – 2008. – Vol. 132. – P. 887-898.

Segal, E., Widom, J. From DNA sequence to transcriptional behaviour: a quantitative approach // *Nat. Rev. Genet.* – 2009. – Vol. 10. – P. 443-456.

Shivaswamy, S., Bhinge, A., Zhao, Y., et al. Dynamic remodeling of individual nucleosomes across a eukaryotic genome in response to transcriptional perturbation // *PLoS Biol.* – 2008. – Vol. 6(3). – e65.

### ***Роль гістона H1 в структурній організації хроматину***

Hamiche, A., Schultz, P., Ramakrishnan, V., Oudet, P., Prunell, A. Linker histone dependent DNA structure in linear mononucleosomes // *J. Mol. Biol.* – 1996. – Vol. 257. – P. 30-42.

Happel, N., Doenecke, D. Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function // *Gene*. – 2009. – Vol. 431. – P. 1-12.

*Misteli, T., Gunjan, A., Hock, R., Bustin, M., Brown, D.T.*

Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells // *Nature*. – 2000. – Vol. 408. – P. 877-881.

*Ramakrishnan, V.* Histone H1 and chromatin higher-order structure // *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* – 1997. – Vol. 7. – P. 215-230.

*Sivolob, A., Prunell, A.* Linker histone-dependent organization and dynamics of nucleosome entry/exit DNAs // *J. Mol. Biol.* – 2003. – Vol. 331. – P. 1025-1040.

*Syed, S.H., Goutte-Gattat, D., Becker, N., Meyer, S., Shukla, M.S., Hayes, J.J., Everaers, R., Angelov, D., Bednar, J., Dimitrov, S.* Single-base resolution mapping of H1–nucleosome interactions and 3D organization of the nucleosome // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – Vol. 107. – P. 9620-9625.

*Woodcock, C.L., Skoultschi, A.I., Fan, Y.* Role of linker histone in chromatin structure and function: H1 stoichiometry and nucleosome repeat length // *Chromosome Res.* – 2006. – Vol. 14. – P. 17-25.

### ***Структура та динаміка хроматинової фібрили***

*Arya, G., Schlick, T.* Role of histone tails in chromatin folding revealed by a mesoscopic oligonucleosome model // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – Vol. 103. – P. 16236-16241.

*Bednar, J., Horowitz, R.A., Grigoryev, S.A., Carruthers, L.M., Hansen, J.C., Koster, A.J., Woodcock, C.L.* Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – Vol. 95. – P. 14173-14178.

*Carruthers, L.M., Hansen, J.C.* The core histone N termini function independently of linker histones during chromatin condensation // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275. – P. 37285-37290.

*Cui, Y., Bustamante, C.* Pulling a single chromatin fiber reveals the forces that maintain its higher order structure // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – Vol. 97. – P. 127-132.

*Dorigo, B., Schlach, T., Kulangara, A., Duda, S., Schroeder, R.R., Richmond, T.J.* Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber // *Science.* – 2004. – Vol. 306. – P. 1571-1573.

*Grigoryev, S.A., Arya, G., Correll, S., Woodcock, C.L., Schlick, T.* Evidence for heteromorphic chromatin fibers from analysis of nucleosome interactions // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2009. – Vol. 106. – P. 13317-13322.

*Horowitz, R.A., Agard, D.A., Sedat, J.W., Woodcock, C.L.* The three-dimensional architecture of chromatin *in situ*: electron tomography reveals fibers composed of a continuously variable zig-zag nucleosomal ribbon // J. Cell Biol. – 1994. – Vol. 125. – P. 1-10.

*Katritch, V., Bustamante, C., Olson, W.K.* Pulling chromatin fibers: computer simulations of direct physical micromanipulations // J. Mol. Biol. – 2000. – Vol. 295. – P. 29-40.

*Robinson, P.J., Fairall, L., Huynh, V.A., Rhodes, D.* EM measurements define the dimensions of the “30-nm” chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – Vol. 103. – P. 6506-6511.

*Schalch, T., Duda, S., Sargent, D.F., Richmond, T.J.* X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre // Nature. – 2005. – Vol. 436. – P. 138-141.

*Sun, J., Zhang, Q., Schlick, T.* Electrostatic mechanism of nucleosomal array folding revealed by computer simulation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005. – Vol. 102. – P. 8180-8185.

*Tremethick, D.J.* Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber // Cell. – 2007. – Vol. 128. – P. 651-654.

*Wong, H., Victor, J.-M., Mozziconacci, J.* An all-atom model of the chromatin fiber containing linker histones reveals a versatile structure tuned by the nucleosomal repeat length // PLoS ONE. – 2007. – Vol. 2(9). – e877.

*Woodcock, C.L., Grigoryev, S.A., Horowitz, R.A., Whitaker, N.* A chromatin folding model that incorporates linker variability generates fibers resembling the native structures // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1993. – Vol. 90. – P. 9021-9025.

*Wu, C., Bassett, A., Travers, A.* A variable topology for the 30-nm chromatin fibre // EMBO Rep. – 2007. – Vol. 8. – P. 1129-1134.

### ***Структура хроматину в інтерфазному ядрі***

*Bancaud, A., Huet, S., Daigle, N., et al.* Molecular crowding affects diffusion and binding of nuclear proteins in heterochromatin and reveals the fractal organization of chromatin // *EMBO J.* – 2009. – Vol. 28. – P. 3785-3798.

*Chen, M., Shen, X.* Nuclear actin and actin-related proteins in protein dynamics // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 19. – P. 326-330.

*Cook, P.R., Bazell, I.A.* Supercoils in human DNA // *J. Cell Sci.* – 1975. – Vol. 19. – P. 261-279.

*Cremer, T., Cremer, M.* Chromosome territories // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2010. – Vol. 2. – a003889.

*Göndör, A., Ohlsson, R.* Chromosome cross-talk in three dimensions // *Nature.* – 2009. – Vol. 461. – P. 199-205.

*Gruenbaum, Y., Margalit, A., Goldman, R.D. et al.* The nuclear lamina comes of age // *Nat. Rev.* – 2005. – Vol. 6. – P. 21–31.

*Hancock, R.* Internal organisation of the nucleus: assembly of compartments by macromolecular crowding and the nuclear matrix model // *Biol. Cell.* – 2004. – Vol. 96. – P. 595-601.

*Hetzer, M.W.* The nuclear envelope // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2010. – Vol. 2. – a000539.

*Hutchison, C.J.* Lamins: building blocks or regulators of gene expression? // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2002. – Vol. 3 – P. 848-858.

*Kumaran, R.I., Thakar, R., Spector, D.L.* Chromatin dynamics and gene positioning // *Cell.* – 2008. – Vol. 132. – P. 929-934.

*Lieberman-Aiden, E., van Berkum, N.L., Williams, L. et al.* Comprehensive mapping of long range interactions reveals folding principles of the human genome // *Science.* – 2009. – Vol. 326. – P. 289-293.

*Nickerson, J.A.* Experimental observations of a nuclear matrix // *J. Cell Sci.* – Vol. 114. – P. 463-474.

*Pederson, T.* Half a century of “the nuclear matrix.” // *Mol. Biol. Cell.* – 2000. – Vol. 11. – P. 799-805.

*Rajapakse, I., Groudine, M.* On emerging nuclear order // *J. Cell Biol.* – 2011. – Vol. 192. – P. 711-721.

*Soutoglou, E., Misteli, T.* Mobility and immobility of chromatin in transcription and genome stability // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2007. – Vol. 17. – P. 435-442.