

## МЕТОДЫ

УДК 577.323

КОНФОРМАЦИОННАЯ ПОДВИЖНОСТЬ НУКЛЕОСОМЫ:  
ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

Г.А. Армеев, К.В. Шайтан, А.К. Шайтан

(кафедра биоинженерии; e-mail: alex@molsim.org)

Исследование принципов работы хроматина — одна из краеугольных задач молекулярной биологии, связанная с пониманием процессов эпигенетической регуляции экспрессии генов, репарации ДНК, механизмов наследственности. Элементарной единицей организации хроматина является нуклеосома — комплекс ДНК и белков гистонов. Структура нуклеосомы, полученная методами рентгеновской кристаллографии, некоторое время рассматривалась как конечное основное конформационное состояние нуклеосомы, однако все больше экспериментальных данных указывают на то, что конформационный полиморфизм и динамика нуклеосом непосредственно влияют на функционирование хроматина. Тем не менее отсутствует детальное понимание конформационной динамики нуклеосом на атомистическом уровне. В данной работе мы подошли к решению этой задачи путем моделирования нуклеосомы методом молекулярной динамики в явном растворителе. Исследовалась динамика нуклеосомы на временном промежутке 500 нс. Произведен ковариационный анализ траектории молекулярной динамики системы с последующим исследованием обнаруженных коллективных движений. Изучено распределение молекул воды в системе, предполагается роль внутринуклеосомальной воды.

**Ключевые слова:** нуклеосома, хроматин, молекулярная динамика, эпигенетика.

Генетическая информация, закодированная в виде последовательности нуклеотидов в линейной молекуле ДНК, суммарная длина которой в развернутом состоянии может достигать нескольких метров, размещается в эукариотических клетках в весьма ограниченной области пространства — ядре клетки, размеры которого не превышают 10 мкм. Компактизация молекул ДНК при одновременном обеспечении доступа белковых факторов к необходимым участкам генома и комплексная регуляция доступа — основные функции хроматина. На первом этапе компактизации ДНК наибольшее значение играет взаимодействие ДНК с белками-гистонами и формирование нуклеосом. Понимание структуры и организации взаимодействий в нуклеосомах является важным этапом на пути изучения структуры и динамики хроматина.

При описании структуры хроматина принято использовать следующие термины: ядро нуклеосомной частицы (nucleosome core particle) — комплекс из восьми гистонов и 145—147 п.н. Термин нуклеосома принято понимать как ядро нуклеосомной частицы вместе с соединяющими соседние нуклеосомы участками ДНК. Нуклеосому, содержащую гистон H1, называют хроматосомой. Далее по тексту термины нуклеосома и ядро нуклеосомной частицы следует считать синонимичными.

Структура нуклеосом долгое время после их открытия в 1974 г. Р. Корнбергом [1] оставалась неяс-

ной, было построено множество моделей, от близких к современным представлениям до довольно экстравагантных. Дебаты по поводу структуры продолжались вплоть до 1997 г., когда методами рентгеновской кристаллографии была определена первая структура нуклеосомы с почти атомарным разрешением [2]. Нуклеосома представляет собой октамер белков гистонов, который несет на себе 145—147 нуклеотидных пар. ДНК закручена вокруг октамера, образуя 1,65 витка левозакрученной суперспирали, т.е. ДНК отрицательно сверхспирализована. Белковое ядро нуклеосомы образует цилиндр диаметром 65 Å и высотой 60 Å. Для нуклеосомы характерна ось псевдосимметрии — диадная ось. В ядро нуклеосомы входит четыре семейства гистонов H3, H4, H2A и H2B, каждый из гистонов представлен дважды. Восемь гистонов нуклеосомы собраны в четыре гетеродимера: два H3-H4 и два H2A-H2B. Каждое семейство гистонов включает в себя множество гистоновых вариантов, несмотря на то что гистоны являются одними из самых консервативных белков наравне с рибосомальными белками. Например, в ядрах клеток *Arabidopsis arenosa* обнаружено 13 вариантов H2A, 11 — H2B, 9 — H3 и 1 — H4, зачастую одну форму гистона кодируют несколько генов [3], находящихся в так называемых гистоновых кластерах.

На 145—147 п.н., размещенных на гистонном октамере, приходится 14 сайтов связывания. Кон-

такты ДНК с гистонами обеспечиваются в основном за счет фосфодиэфирных группировок сахаро-фосфатного остова, таким образом, образование контактов прямо не зависит от последовательности. Сборка нуклеосом в живой клетке происходит при помощи сложной системы белков шаперонов [4], которые также могут быть специфичны для различных вариантов гистонов.

Нуклеосома — подвижная структура, которой свойственны как высокочастотные тепловые движения, так и крупномасштабные конформационные перестройки. Исходя из распределения В-факторов в кристаллических структурах, следует отметить, что подвижность ДНК значительно выше, нежели подвижность белковой составляющей нуклеосомы. В то же время находящиеся в малых бороздках ДНК аргинины препятствуют скольжению спирали ДНК на гистонах, ограничивая ее мобильность [5]. Масштабную подвижность нуклеосом принято разделять на “дыхание” (breathing), разматывание ДНК (unwinding) и раскрытие (gapping) [6]. Первые два типа конформационной подвижности описывают частичную диссоциацию ДНК от гистонов, под “дыханием” понимают симметричное разматывание ДНК. Такие движения потенциально облегчают вхождение полимераз в нуклеосому и показаны экспериментально [7]. Известно, что раскручивание и “дыхание” нуклеосомы в присутствии фактора перестройки хроматина FACT (FACilitates Chromatin Transcription) приводит к стабилизации “раскрытых” состояний, повышая доступность нуклеосом для полимераз [8]. Третье движение — раскрытие — было предсказано теоретически. Полагается, что такой тип движений может играть роль в определении плотности упаковки 30 нм фибриллы при коллективном движении всех нуклеосом [9].

Понимание принципов работы хроматина — следующая большая задача молекулярной биологии, сравнимая с задачей расшифровки генома. На уровне нуклеосом осуществляется большое количество различных механизмов регуляции экспрессии генов. Один из таких механизмов — так называемый нуклеосомальный барьер [10]. При приближении РНК-полимеразы нуклеосома должна претерпевать конформационные изменения, для того чтобы сделать ДНК доступной. В частности, известны мутации (SIN-мутанты), которые облегчают транскрипцию [11]. Различные последовательности имеют разное сродство к гистонам и модулируют вероятность прохождения полимеразы.

Изучение межмолекулярных взаимодействий на атомистическом уровне и понимание энергетики данных взаимодействий, их функциональной значимости является одной из основных задач молекулярной биологии. В последнее время в комплексе методов исследований наравне с традици-

онными экспериментальными методами (включая рентгеновскую кристаллографию, FRET, ChIP-Seq, различные методы анализа скорости транскрипции и др.) важную роль стали играть методы структурного и динамического компьютерного моделирования. В частности, метод молекулярной динамики рассматривается как своеобразный “вычислительный микроскоп” [12]. На основе “замороженных” структур биомакромолекул, получаемых методами рентгеновской кристаллографии, молекулярная динамика (МД) позволяет построить динамическую модель, исследовать ее движения и конформационные изменения. Методы кристаллографии не лишены неточностей, связанных с плотной упаковкой и отбором конформеров, совместимых с этой упаковкой. Также следует отметить, что МД позволяет решать такие задачи, как исследование распределения ионов и воды вокруг биомолекул, которые с трудом решаются методами кристаллографии.

В этой связи основной целью данной работы являлось исследование структурных и динамических характеристик нуклеосом методами компьютерного моделирования, а также оценка роли растворителя в формировании структуры нуклеосом.

### Материалы и методы

Для проведения исследований использовалось силовое поле AMBER99SB-BSC0 [13, 14]. Модель была создана на основании кристаллической структуры, взятой из банка PDB с индексом 1KX5 [15]. От нуклеосом удалялись подвижные гистоновые “хвосты” согласно позициям, взятым в работе [16], ионы марганца заменялись ионами магния. Использовались прямоугольные расчетные ячейки, размер которых подбирался так, чтобы наименьшее расстояние от нуклеосомы до одной из граней ячейки было не менее 1 нм. Все свободное пространство заполнялось молекулами воды, для моделирования которой применялась модель TIP3P. Использовались ионы натрия и хлора в концентрации 150 мМ, концентрация ионов рассчитывалась как количество ионов к объему растворителя, а не к объему расчетной ячейки. Такой способ применялся, так как в силу малых размеров моделируемой системы, сама молекула занимает значительный объем ячейки. Объем элементарной ячейки равен 2100 нм<sup>3</sup>.

Расчет траекторий динамики производился с шагом интегрирования 2 фс. Для того чтобы избежать чрезмерного перемещения нуклеосомы в пространстве, на C $\alpha$  атомы аминокислот гистона H3 накладывался дополнительный гармонический потенциал, возвращающий их начальное положение. Для того чтобы избежать краевых эффектов, использовались периодические граничные условия. Электростатические взаимодействия учитывались при помощи метода PME [17] с шагом

решетки 1 Å, радиусом обрезания взаимодействий в прямом пространстве 1 нм и кубической интерполяцией. Для учета ван-дер-ваальсовых взаимодействий использовался радиус обрезания в 1 нм с плавным выравниванием потенциала на границе обрезания. Для термостатирования расчетной ячейки применялся модифицированный термостат Берендсена со стохастической прибавкой [18], вода и макромолекула термостатировались отдельно. В качестве баростата применялся изотропный баростат Паринелло—Рамана [19]. Для исследования крупномасштабных скоррелированных движений нуклеосомы использовался метод ковариационного анализа, а также метод расчета наименьшего среднеквадратичного отклонения структуры по траектории (RMSD). Расчеты производились в программе Gromacs 4.5.4 [20] на суперкомпьютере МГУ “Ломоносов” [21] с использованием от 64 до 1024 процессоров. Обработка траекторий производилась при помощи встроенных в пакет Gromacs утилит и собственных исполняемых файлов, написанных на языках Python и TCL на вычислительных кластерах кафедры биоинженерии. Для визуализации траекторий и моделей применялась программа VMD 1.9.1. [22].

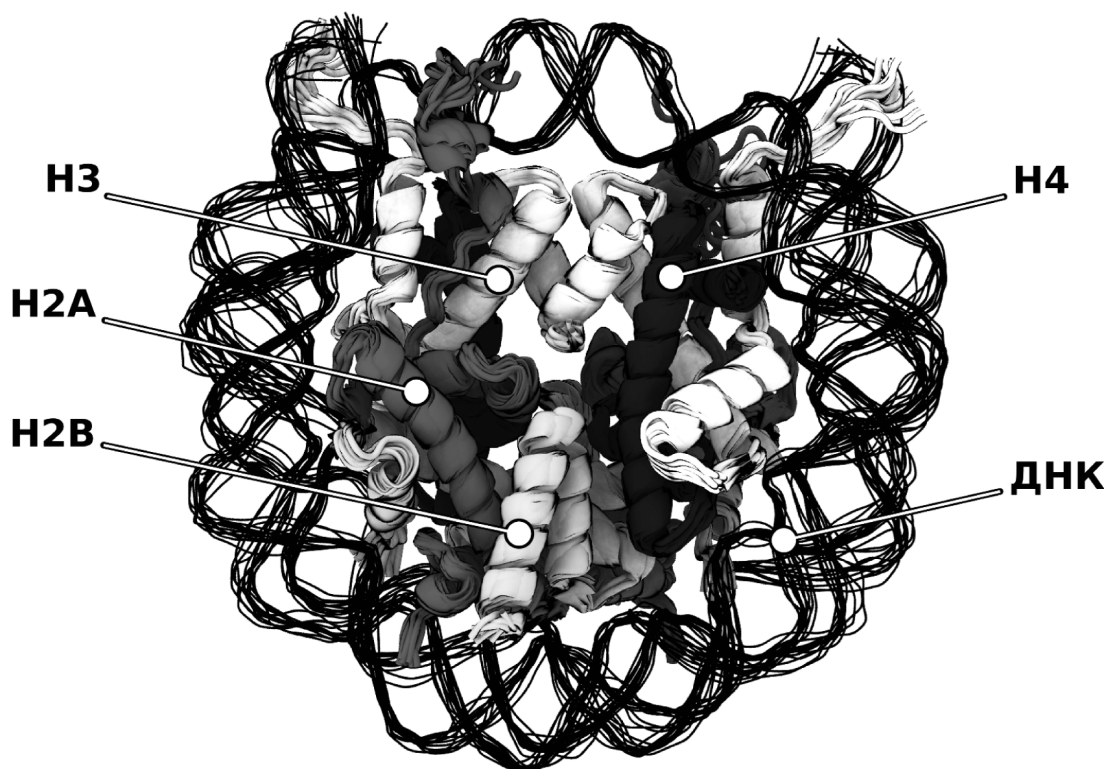
### Результаты и обсуждение

Моделирование на протяжении 500 нс показало, что система в целом мало изменяет свою форму, при этом подвижность ДНК значительно выше таковой у гистонов, что совпадает с эксперимен-

тальными данными. Набор конформаций, которые нуклеосома принимает в течении МД, показан на рисунке. Распределение рассчитанных В-факторов вдоль последовательности ДНК оказалось похоже на распределение в кристаллической структуре, но подвижность ДНК в расчетной системе значительно выше, так как моделирование происходит при температуре 300° К, а кристалл находится в криогенном диапазоне температур. Расчет В-факторов для атомов в системе производился по формуле  $B = 8\pi^2 \langle u^2 \rangle$ , где  $\langle u^2 \rangle$  — среднеквадратичное отклонение координат атома. Дополнительно показана неравномерность распределения В-факторов вдоль ДНК, что связано с большей мобильностью и расплетанием ДНК вблизи мест входа в нуклеосому.

Из-за высокой подвижности ДНК количество контактов, образуемых ДНК с гистонами, постоянно изменяется и в среднем отличается от числа контактов в кристаллической структуре. Наиболее заметные отличия наблюдаются в позиции +15—+35 от входа в нуклеосому, конформация ДНК в кристаллической структуре, по всей видимости, напряжена и в ходе динамики приходит в равновесное состояние.

Также стоит отметить, что в кристаллической структуре между контактами имеются участки ДНК, не связанные с гистонами. Количество таких участков в усредненной по траектории структуре меньше, и сами участки отличаются меньшей протяженностью. Таким образом, использование



Гистоны отображены в виде вторичной структуры, ДНК показана в виде линий



кристаллической структуры для построения модели связывания ДНК с гистонами не в полной мере воспроизводит вклад каждой пары нуклеотидов в формирование нуклеосомы.

Ковариационный анализ движений атомов в МД, проведенный по белковому остову гистонов и остову ДНК, выявил набор крупномасштабных движений в нуклеосоме. Наиболее амплитудный собственный вектор, полученный в результате ковариационного анализа, можно классифицировать как движение раскрытия нуклеосомы. В работе [9] состояние открытой нуклеосомы получили искусственно, путем фиксации контакта гистонов Н3-Н3 в качестве “петли” и введения дополнительного потенциала для раскрытия “петли”. Количество энергии, необходимой для того чтобы раскрыть нуклеосому (30 ккал/моль), слишком велико для спонтанного раскрытия нуклеосомы. Тем не менее считается, что такое движение возможно при условии коллективного перехода целой цепи нуклеосом [9]. Обнаружение данной моды движений в траектории свободной динамики свидетельствует о том, что движения, ведущие к раскрытию нуклеосомы, возможны, но, судя по их малой амплитуде, маловероятны без наличия внешних сил, способствующих конформационному переходу.

Возможное функциональное значение движения раскрытия нуклеосом неизвестно однозначно, предположительно, оно может играть роль в процессе компактизации 30-нанометровой фибриллы [9]. Весьма вероятной видится возможность открывания нуклеосом при взаимодействии РНК-полимеразы II со второй петлей ДНК. Энергия, которую необходимо затратить для того, чтобы раскрыть нуклеосому, состоит из энергии гидратации неполярных прилегающих участков гистонов Н2А-Н2В и энергии деформации суперспирали ДНК. Таким образом, нуклеосомы с гистонными вариантами, содержащими другие аминокислотные остатки в положении контактов, могут отличаться вероятностью открывания, что может привести к укорачиванию или удлинению паузы при прохождении РНК-полимеразы.

Выявленное движение происходит с довольно низкой для времен моделирования частотой, за 500 нс система претерпевает такие движения однократно, что свидетельствует о том, что расчет не достаточен для обнаружения всех мод движений. Значительного увеличения времени моделирования не получится добиться путем увеличения числа вычислительных узлов текущей архитектуры, так как рост производительности системы сильно ограничен шиной обмена данными между узлами. Для увеличения времени моделирования можно использовать вычислительные машины, созданные специально для решения задач молекулярной динамики, например компьютер “Anton” [23],

или прибегать к использованию огрубленных моделей растворителя или самих нуклеосом.

Несмотря на стабильность нуклеосом и плотную упаковку гистонов в димеры, октамер гистонов упакован неплотно и содержит в себе большое количество молекул воды, которые формируют своеобразные водяные “мостики” в нуклеосоме. Количество воды в составе нуклеосомы довольно значительно изменяется на протяжении времени моделирования и превосходит количество воды в кристаллической структуре. Наибольшие изменения количества характерны для находящейся в нуклеосомной поре воды, в то время как количество молекул, находящихся вблизи контактов димеров гистонов, сохраняется неизменным. Наименьшее количество молекул воды (в среднем 63 молекулы) характерно для контакта димеров гистонов Н3-Н4, формирующих тетрамер — нуклеосомное ядро, в то время как остальные контакты димеров содержат приблизительно одинаковое количество молекул воды (около 100 молекул). Большее число молекул воды на участке взаимодействия димеров гистонов свидетельствует о менее плотном контакте, что не противоречит экспериментальным данным, так как гистоны Н2А-Н2В удаляются из нуклеосомы легче всего.

Наличие в нуклеосоме большого числа молекул воды между гистонами делает ее проницаемой для одновалентных ионов, позволяя им эффективно экранировать заряженные группировки гистонов и ДНК. Наиболее вероятным назначением воды в нуклеосомной поре является снижение силы зарядовых взаимодействий между гистонами, несущими значительный положительный заряд за счет повышенной диэлектрической проницаемости. Помимо этого вода в нуклеосомной поре позволяет ионам свободно проникать сквозь нуклеосому и экранировать заряды на поверхности гистонов.

В заключение работы можно сделать следующие выводы: структура нуклеосомы в целом стабильна на временах порядка 500 нс, а среди крупномасштабных коллективных движений выделяется мода движений, при которой два супервитка ДНК (в месте пересечения с диадной осью нуклеосомы) и связанные с ними области гистонов приближаются и удаляются друг от друга. Данная мода движений потенциально связана с процессами прохождения транскрипции и плотной компактизации хроматина. Нуклеосома содержит в своей структуре большое количество молекул воды, в нуклеосомальной поре в среднем содержится 178 молекул воды, количество молекул воды в контактах димеров гистонов варьирует от 62 до 105. В образовании контакта между двумя димерами гистонов Н3-Н4 участвует меньшее количество молекул воды (62), чем при образовании аналогичного контакта между димерами Н3-Н4 и Н2А-Н2В (102—105).

Все вычисления произведены с использованием суперкомпьютерного комплекса МГУ имени М.В. Ломоносова [21].

\* \* \*

Данная работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (№ 14-24-00031).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kornberg R.D. Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA // *Science*. 1974. Vol. 184. N 4139. P. 868—871.
2. Luger K., Mader 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. N 6648. P. 251—260.
3. Talbert P.B., Ahmad K., Almouzni G. A unified phylogeny-based nomenclature for histone variants // *Epigenet. Chromatin*. 2012. Vol. 5. N 1. P. 7.
4. Burgess R.J., Zhang Z. Histone chaperones in nucleosome assembly and human disease // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013. Vol. 20. N 1. P. 14—22.
5. Biswas M., Langowski J., Bishop T.C. Atomistic simulations of nucleosomes // *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* 2013. Vol. 3. N 4. P. 378—392.
6. Zlatanova J., Bishop T.C., Victor J.M., Jackson V., van Holde K. The nucleosome family: Dynamic and growing // *Structure*. 2009. Vol. 17. N 2. P. 160—171.
7. Tomschik M., van Holde K., Zlatanova J. Nucleosome dynamics as studied by single-pair fluorescence resonance energy transfer: A reevaluation // *J. Fluoresc.* 2009. Vol. 19. N 1. P. 53—62.
8. Hondele M., Ladurner A.G. Catch me if you can how the histone chaperone FACT capitalizes on nucleosome breathing // *Nucleus-Austin*. 2013. Vol. 4. N 6. P. 443—449.
9. Mozziconacci J., Victor J.M. Nucleosome gaping supports a functional structure for the 30 nm chromatin fiber // *J. Struct. Biol.* 2003. Vol. 143. N 1. P. 72—76.
10. Studitsky V.M., Clark D.J., Felsenfeld G. Overcoming a nucleosomal barrier to transcription // *Cell*. 1995. Vol. 83. N 1. P. 19—27.
11. Flaus A., Rencurel C., Ferreira H., Wiechens N., Owen-Hughes T. Sin mutations alter inherent nucleosome mobility // *EMBO J.* 2004. Vol. 23. N 2. P. 343—353.
12. Dror R.O., Dirks R.M., Grossman J.P., Xu H.F., Shaw D.E. Biomolecular simulation: A computational microscope for molecular biology // *Annu. Rev. Biophys.* 2012. Vol. 41. P. 429—452.
13. Lindorff-Larsen K., Piana S., Palmo K., Maragakis P., Klepeis J.L., Dror R.O., Shaw D.E. Improved side-chain torsion potentials for the amber ff99sb protein force field // *Proteins*. 2010. Vol. 78. N 8. P. 1950—1958.
14. Guy A.T., Piggot T.J., Khalid S. Single-stranded DNA within nanopores: Conformational dynamics and implications for sequencing; a molecular dynamics simulation study // *Biophys. J.* 2012. Vol. 103. N 5. P. 1028—1036.
15. Davey C.A., Sargent D.F., Luger K., Maeder A.W., Richmond T.J. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution // *J. Mol. Biol.* 2002. Vol. 319. N 5. P. 1097—1113.
16. Banks D.D., Gloss L.M. Equilibrium folding of the core histones: The H3-H4 tetramer is less stable than the H2A-H2B dimer // *Biochemistry*. 2003. Vol. 42. N 22. P. 6827—6839.
17. Essmann U., Perera L., Berkowitz M.L., Darden T., Lee H., Pedersen L.G. A smooth particle mesh ewald method // *J. Chem. Phys.* 1995. Vol. 103. N 19. P. 8577—8593.
18. Bussi G., Donadio D., Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling // *J. Chem. Phys.* 2007. Vol. 126. N 1. P. 014101.
19. Nose S., Klein M.L. Constant pressure molecular-dynamics for molecular-systems // *Mol. Phys.* 1983. Vol. 50. N 5. P. 1055—1076.
20. Pronk S., Pall S., Schulz R., Larsson P., Bjelkmar P., Apostolov R., Shirts M.R., Smith J.C., Kasson P.M., van der Spoel D., Hess B., Lindahl E. Gromacs 4.5: A high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit // *Bioinformatics*. 2013. Vol. 29. N 7. P. 845—854.
21. Sadovnichy V., Tikhonravov A., Voevodin V., Opanasenko V. "Lomonosov": Supercomputing at Moscow State University // *Contemporary high performance computing: from petascale toward exascale* / Ed. by S.V. Jeffery. Boca Raton: CRC Press, 2013. P. 283—307.
22. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. Vmd: Visual molecular dynamics // *J. Mol. Graph. Model.* 1996. Vol. 14. N 1. P. 33—38.
23. Shaw D.E. Millisecond-long molecular dynamics simulations of proteins on a special-purpose machine // *Biophys. J.* 2013. Vol. 104. N 2. P. 45a.

Поступила в редакцию  
13.04.2015

## CONFORMATIONAL FLEXIBILITY OF NUCLEOSOMES: A MOLECULAR DYNAMICS STUDY

G.A. Armeev, K.V. Shaitan, A.K. Shaytan

One of the major problems of molecular biology is studying the underlying principles of chromatin work. This problem is associated with understanding the processes of epigenetic regulation of gene expression, DNA repair and heredity mechanisms. The basic unit of chromatin organization is nucleosome, which consists of DNA and histone proteins. For a long time nucleosome structure obtained by X-ray crystallography was considered as the ultimate and main conformational state of nucleosomes, but recent experimental data indicates that chromatin functions depends on conformation state of nucleosomes. Nevertheless, there is no detailed understanding of the conformational dynamics

of nucleosomes at the atomistic level. In this paper, we have addressed this problem using molecular dynamics simulations of nucleosome in explicit solvent. We have investigated the dynamics of nucleosome on the 500 ns time interval, produced covariance analysis of the trajectory and derived the collective motions, studied the distribution of water molecules in the system and assumed the role of internal water.

**Key words:** *nucleosomes, chromatin, molecular dynamics, epigenetics.*

#### **Сведения об авторах**

*Аarmeeв Григорий Алексеевич* — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-906-759-56-35; e-mail: armeev@molsim.org

*Шайтан Константин Вольдемарович* — докт. физ-мат. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-23-74; e-mail: shaytan49@yandex.ru

*Шайтан Алексей Константинович* — канд. физ-мат. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: alex@molsim.org