

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.323

ИССЛЕДОВАНИЕ ИОННОГО ОКРУЖЕНИЯ И ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК НУКЛЕОСОМ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

Г.А. Армеев, К.В. Шайтан, А.К. Шайтан

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

Работа посвящена изучению принципов устройства и формирования нуклеосом с помощью молекулярного моделирования. Формирование белками, гистонами и участками молекулы ДНК компактных образований — нуклеосом способствует не только упаковке молекулы ДНК в ядре клетки, но и играет важную роль в регуляции процессов транскрипции и экспрессии генов. Сборка и работа нуклеосом сильно зависит от ионного окружения и электрических характеристик среды. В работе исследуются карты распределения одновалентных ионов в системе, выявляются места их предпочтительного нахождения. Предлагается метод, позволяющий вычислять распределения физических величин в объеме расчетной ячейки вокруг дрейфующей макромолекулы. Рассматривается распределение электростатического потенциала вокруг нуклеосомы.

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

В ядрах эукариотических организмов содержатся крупные макромолекулы — ДНК, каждая такая молекула хранит в себе значительное количество генетической информации, закодированной в последовательности нуклеотидов. Хранение и реализация генетической информации — непростая задача, с которой эукариотическая клетка успешно справляется, несмотря на малые размеры ядра. Компактизация ДНК начинается на уровне нуклеосом — октамеров белков, которые несут на себе 147 нуклеотидных пар двухцепочечной спирали ДНК. На данный момент получено более 80 различных кристаллических структур нуклеосом [1, 2]. Гистонный состав нуклеосом непостоянен, например, в активно транскрибируемых генах происходит непрерывный обмен димерами гистонов H2A-H2B [3, 4]. Для дальнейшей компактизации хроматина к нуклеосомам присоединяется гистон H1.

Нуклеосомы не способны к спонтанной сборке при физиологической ионной силе, отчасти это происходит из-за того, что при такой концентрации соли гистоны неспецифически взаимодействуют с ДНК. Тем не менее искусственная сборка нуклеосом возможна, существуют протоколы для сборки нуклеосом *in vitro* как при помощи вспомогательных шаперонов [5], так и путем диализа — медленного изменения ионной силы. Благодаря тому что при высоких концентрациях соли тетрамер гистонов H3-H4 способен связываться с ДНК, а димеры 2 М раствора NaCl против 0,25 М раствора соли.

Отдельные компоненты нуклеосом способны к существованию в растворах с ДНК, например, димер H2A-H2B стабилен в 200 мМ растворе KCl, обработка димера гуанидинхлоридом приводит к одностадийной денатурации до бесструктурных цепей, с энергией перехода 17 ккал/моль [6]. При

этом гистоны H3-H4 в 200 мМ KCl представлены смесью тетрамера, димеров и иных частично денатурированных комплексов. Увеличение ионной силы до 1,5 М KCl, как и обработка ТМАО (триметиламинооксидом), сдвигает равновесие в сторону тетрамерной формы.

Известно, что двухвалентные катионы способствуют компактизации хроматина. В кристаллической структуре были определены места связывания ионов марганца. Марганец, ассоциированный с гистонами, находится на поверхности между нуклеосомами, организуя их взаимодействия в кристалле, 13 остальных ионов марганца скоординированы в большей бороздке ДНК, преимущественно в районе GG и GC динуклеотидов [7], вероятно, экранируя заряды ДНК на соседних нуклеосомах, что позволяет повысить плотность упаковки кристалла. Таким образом, очевидно, что ионное окружение играет важную роль в сборке и функционировании нуклеосом.

Изучение распределения ионов и электростатического потенциала представляет немалый интерес в силу того, что нуклеосома содержит в себе большое количество заряженных группировок, большинство положительных зарядов находится на поверхности гистонов, в то время как отрицательные заряды преимущественно представлены фосфатными группировками сахарофосфатного остова ДНК. Зарядовые взаимодействия между аминокислотами, ДНК, растворителем и ионами играют важную роль в стабилизации структуры нуклеосомы. Однако изучение таких взаимодействий биохимическими методами сильно затруднено. Молекулярное моделирование позволяет рассматривать крупные макромолекулы на атомарном уровне, уточняя и расширяя информацию, полученную методами структурной биологии.

Материалы и методы

Для исследования нуклеосом использовался метод молекулярной динамики в силовом поле AMBER99SB-ILDN [8]. Модель была создана на основании кристаллической структуры, взятой из банка RCSB PDB с индексом 1KX5 [1]. От нуклеосом были удалены гистоновые хвосты, молекула была погружена в прямоугольную расчетную ячейку. Затем в ячейку были добавлены вода и ионы до концентрации 150 мМ. Для описания динамики молекулярной воды применялась модель TIP3P. Ионы Mn^{2+} , содержащиеся в кристаллической структуре, были заменены на ионы Mg^{2+} , ионы Cl^- были оставлены в наблюдаемом в кристалле положении. После добавления воды и ионов общее количество атомов в системе составило 210024. Были произведены минимизация энергии и последующее моделирование в каноническом и изотермо-изобарическом ансамблях. Расчет траектории молекулярной динамики системы продолжался в течение 500 нс. Вычисления производились в программе Gromacs 4.5.4 [9] на суперкомпьютере МГУ “Ломоносов” с использованием от 64 до 1024 процессоров. Обработка траекторий производилась при помощи встроенных в пакет Gromacs утилит. Для визуализации траекторий и моделей применялась программа VMD 1.9.1 [10].

Для расчета карт распределения электростатического потенциала использовался модуль PMEROT [11] программы VMD. Модуль PMEROT способен рассчитывать усредненную по траектории МД карту распределения электростатического потенциала, но наибольший интерес представляет собой не усредненное по времени распределение потенциала в ячейке, а распределение потенциала вокруг исследуемого биополимера, который может перемещаться по ячейке, что приведет к смазыванию карты потенциала. Чтобы получить такое распределение, был создан модуль на языке python для программы VMD. Модуль позволяет выравнивать карты электростатического потенциала на каждом этапе расчета, для того чтобы избежать размытия карты за счет дрейфа молекулы в расчетной ячейке. Для ускорения работы реализована возможность параллельного вычисления карт на многопроцессорных системах.

Результаты и обсуждение

Моделирование масштабных систем методом молекулярной динамики предъявляет очень высокие требования к вычислительным ресурсам. С ростом размера систем появляется необходимость в использовании высокопараллельных расчетов. Тем не менее с ростом числа используемых вычислительных узлов скорость расчета растет нелинейно, основной причиной этого являются ограничения

по времени отклика и пропускной способности интерфейсов передачи данных между узлами. Следует понимать, что с увеличением числа используемых узлов растет вероятность аппаратных отказов, такой сбой неизбежно приводит к потере части данных и остановке счета. Таким образом, расчет крупных биологических систем — крайне ресурсоемкая задача.

В результате анализа 500 нс траектории системы было показано, что ионы распределены по нуклеосоме неравномерно: для натрия характерно преимущественное расположение вокруг ДНК, небольшое число ионов натрия обнаружено на поверхности гистонов и в межгистонных контактах. Ионы хлора не проникают между гистонами, но чаще катионов натрия заходят в нуклеосомную пору. Высокая концентрация ионов хлора в нуклеосомной поре объясняется наличием на поверхности гистонов большого количества положительно заряженных аминокислот.

Катионы натрия обнаружены преимущественно в малой бороздке ДНК, что объясняется их взаимодействием с фосфатными группировками. Аналогичные результаты были показаны в работе [12], такой характер распределения связан с комбинацией различных видов взаимодействий, в частности малый размер иона позволяет ему глубже проникать в бороздку ДНК и взаимодействовать с фосфатными группировками.

Повышенная концентрация ионов обнаружена вблизи димера H2A-H2B, над участком, называемым “кислотный лоскут” (“acidic patch”). В литературе предполагается, что этот участок является сайтом связывания для хвостов гистона H4 соседней нуклеосомы при формировании супрануклеосомных структур.

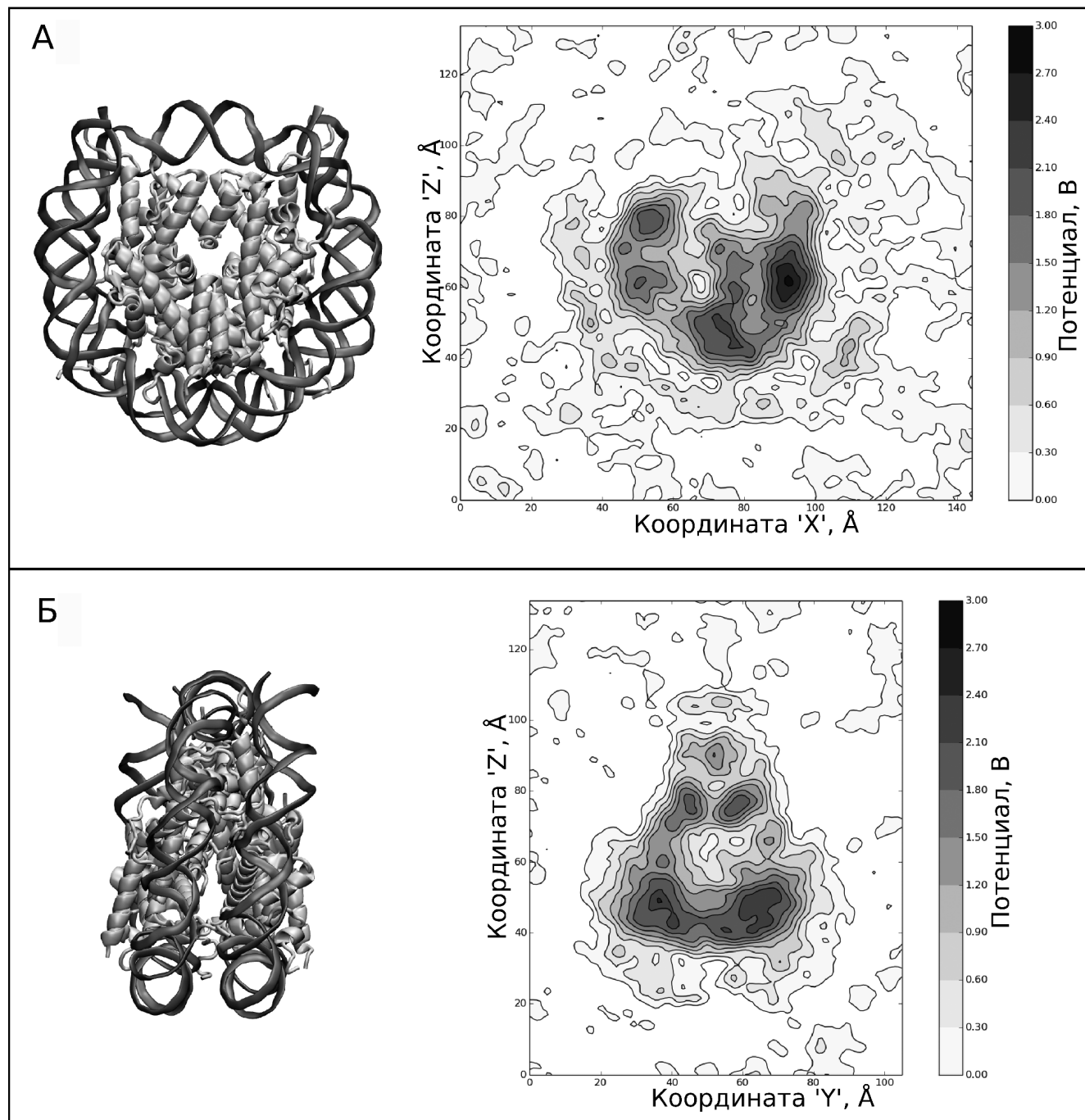
Расположение ионов натрия вблизи нуклеосомальной ДНК позволяет эффективно экранировать заряженные фосфатные группировки. В среднем вокруг ДНК находится 18–22 иона натрия на каждые 10 н.п. Такого рода экранирование позволяет снизить взаимодействия между соседними нуклеосомами, а также в местах примыкания соседних витков суперспирали ДНК. Уменьшение силы взаимодействий между витками ДНК может способствовать компактизации хроматина, так как нуклеосомы будут способны ближе подходить друг к другу.

Дополнение PMEROT [11] к программе VMD создано для того, чтобы рассчитывать карту распределения электростатического потенциала. Несмотря на то что алгоритм работы дополнения способен усреднять значения электростатического потенциала по времени, отсутствие возможности производить усреднение с выравниванием карты по изучаемой структуре приводит к значительному размытию карты и искажению теоретической кар-

ты распределения потенциала. Оригинальный метод, реализованный в данной работе, позволяет усреднять электростатический потенциал, используя при этом модуль РМЕРОТ. Полученные данным методом карты лишены артефактов, связанных со смазыванием значений потенциала из-за диффузии моделируемой молекулы в ячейке, и несут больше информации для исследователя.

В результате анализа показано, что электростатический потенциал вокруг нуклеосомы распределен относительно равномерно (на рисунке изображены сечения распределения потенциала)

и практически везде в растворителе равен нулю (несмотря на большое число отрицательных зарядов на ДНК), это свидетельствует о хорошей нейтрализации зарядов на нуклеосоме. Данное наблюдение согласуется с результатами работы [12], где отмечалось, что ДНК в нуклеосоме нейтрализована лучше, чем свободная. Нуклеосомная пора (на рисунке находится в геометрических центрах карт распределения потенциала) содержит в себе область со значениями потенциала, близкими к наружному. Потенциал снаружи от нуклеосомы наведен большим числом отрицательных зарядов на



Слева в виде элементов вторичной структуры показан внешний вид модели нуклеосомы, справа — соответствующее виду сечение карты распределения электростатического потенциала. А — вид спереди; Б — вид сбоку. Сечения построены по центру расчетной ячейки. Интенсивность окраски карты соответствует значению электростатического потенциала

ДНК, катионов и анионов, при этом между нуклеосомной порой и ДНК присутствуют лишь гистоны с относительно небольшим числом молекул воды и ионов. Значение потенциала в нуклеосомной поре указывает на то, что заряды на ДНК эффективно экранированы гистонами и ионами натрия на границе взаимодействия гистон–ДНК. Экранирование зарядов ДНК позволяет ее участкам, находящимся с противоположных сторон, не испытывать взаимодействий, которые будут стремиться раздвинуть петли ДНК, что может привести к разрушению нуклеосомы.

Для гистонов в целом показаны повышенные значения потенциала за исключением С-концевой α -спирали H2В и участка H2А, формирующих область контакта с хвостами гистонов соседних нуклеосом. Повышенные значения потенциала наблюдаются в областях контактов гистонов с ДНК, что объясняется высоким содержанием положительно заряженных аминокислотных остатков.

Электростатический потенциал между соседними участками ДНК, лежащими около входа в нуклеосому, сильно занижен, это свидетельствует о том, что заряды на ДНК не полностью экранированы ионами. Этот факт объясняет методику приготовления нуклеосом путем диализа из высокой ионной силы. Высокая концентрация соли позволяет экранировать цепи ДНК друг от друга большим числом ионов натрия, тем самым разрешая сборку нуклеосомы. Недостаточное экрани-

рование и отталкивание цепей ДНК друг от друга поясняет эксперименты по силовому растягиванию нуклеосом, где было показано, что для снятия первого витка ДНК нужна меньшая сила, чем для снятия последующих участков.

В заключение работы можно сделать следующие выводы: распределение электростатического потенциала в нуклеосоме имеет существенные положительные значения в области гистонового ядра, а в области расположения ДНК значения потенциала близки к значениям в области растворителя, что свидетельствует об эффективном экранировании зарядов фосфатного остова ДНК противоионами и водой. Величина электростатического потенциала в нуклеосомной поре соответствует величине потенциала в растворителе, окружающем нуклеосому. Данный факт свидетельствует о том, что несмотря на относительно малый размер нуклеосомной поры, центр нуклеосомы является областью с высокой диэлектрической проницаемостью и данный факт необходимо учитывать при построении огрубленных физических моделей организации хроматина.

Все вычисления произведены с использованием суперкомпьютерного комплекса МГУ имени М.В. Ломоносова [13].

* * *

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №14-24-00031).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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 angstrom resolution // *J. Mol. Biol.* 2002. Vol. 319. N 5. P. 1097–1113.
2. 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. N 1. P. 1–10.
3. Thiriet C., Hayes J.J. Replication-independent core histone dynamics at transcriptionally active loci in vivo // *Gene Dev.* 2005. Vol. 19. N 6. P. 677–682.
4. Studitsky V.M., Clark D.J., Felsenfeld G. Overcoming a nucleosomal barrier to transcription // *Cell.* 1995. Vol. 83. N 1. P. 19–27.
5. Andrews A.J., Luger K. A coupled equilibrium approach to study nucleosome thermodynamics // *Methods Enzymol.* 2011. Vol. 488. P. 265–85.
6. 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. 6827–39.
7. Davey C.A., Richmond T.J. DNA-dependent divalent cation binding in the nucleosome core particle // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. Vol. 99. N 17. P. 11169–11174.
8. 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.
9. 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.
10. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. Vmd: Visual molecular dynamics // *J. Mol. Graph. Model.* 1996. Vol. 14. N 1. P. 33–38.
11. Aksimentiev A., Schulten K. Imaging alpha-hemolysin with molecular dynamics: Ionic conductance, osmotic permeability, and the electrostatic potential map // *Biophys. J.* 2005. Vol. 88. N. 6. P. 3745–3761.
12. Savelyev A., Papoian G.A. Electrostatic, steric, and hydration interactions favor Na(+) condensation around DNA compared with K(+) // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. Vol. 128. N 45. P. 14506–14518.
13. 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.

Поступила в редакцию
16.04.15

DISTRIBUTION OF IONS AND ELECTROSTATIC POTENTIAL IN NUCLEOSOMES AS STUDIED WITH MOLECULAR DYNAMICS

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

The principles of nucleosome organization and formation were studied using molecular modeling approach. Nucleosomes are compact protein–DNA complexes that plays the key role in DNA compactization and regulation of gene transcription and expression. Nucleosome assembly and operation strongly depends on the ionic environment and electrical characteristics of the medium. The distribution of monovalent ions in the system was determined. The preferred locations of the ions were identified. The distribution of electrostatic potential around nucleosome was investigated using a new method for averaging the distribution around macromolecule drifting in the volume of the computational cell.

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

Сведения об авторах

Армеев Григорий Алексеевич — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-23-74; 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