

## МЕТОДЫ

УДК 577.323

РЕЛАКСАЦИЯ СТРУКТУРЫ НУКЛЕОСОМЫ ПРИ ОТВОРАЧИВАНИИ ДНК:  
ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

Г.А. Армеев, К.В. Шайтан, А.К. Шайтан\*

Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;  
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

\* e-mail: alex@molsim.org

В работе рассматриваются эффекты локальной релаксации структуры нуклеосомы при отворачивании концов ДНК от октамера гистонов. Исследуется влияние распределения зарядов в гистонах на кинетику реассоциации ДНК к нуклеосоме. Показано, что ионное окружение быстро стабилизируется во время моделирования релаксации системы методом молекулярной динамики. В случае короткой релаксации, происходит быстрое необратимое восстановление структуры, похожей на кристаллическую. В случае более длительной релаксации, восстановления не происходит, несмотря на отсутствие видимых различий в ионном окружении ДНК. Показано изменение квадратурного момента системы во время релаксации.

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

ДНК человека представляет собой набор длинных двухцепочечных молекул общей протяженностью порядка  $6 \cdot 10^9$  пар нуклеотидов. Упаковка хроматина в малые объемы клеточного ядра затруднительна в связи с относительно большой длиной персистентности ДНК (около 50 нм) и значительным отрицательным зарядом молекулы. Тем не менее, ядра клеток успешно вмещают в себя всю ДНК, сохраняя доступ к ней для ферментов транскрипции и репликации. Известно, что базовым повторяющимся фрагментом упаковки хроматина являются нуклеосомы, открытые Р. Корнбергом в 1974 г. [1]. Нуклеосома представляет собой комплекс ДНК с белками-гистонами и содержит 145–157 п.н. Нуклеосомная ДНК образует плоскую суперспираль, обвивая гистоновый октамер 1,7 раза. Нуклеосомы разделены друг от друга линкерной ДНК и встречаются приблизительно каждые 200 п.н. Нуклеосомы — стабильные комплексы, они довольно долго существуют в растворе *in vitro*, молекулярное моделирование показывает, что нуклеосомы мало меняют свою конфигурацию на протяжении 1 мкс [2].

Несмотря на то, что на данный момент методом рентгеноструктурного анализа расшифровано более 100 различных структур нуклеосом, вопросы их сборки и динамики остаются открытыми. Помимо зарядов на ДНК, гистоны содержат на поверхности множество положительно заряженных аминокислот, дополнительные заряженные группировки имеются в районе кислотного лоскута, с которым связываются моновалентные ионы. Сборка нуклеосом *in vitro* осуществляется в условиях высокой концентрации ионов в растворе, с последующим диализом. Сборка *in vivo* и позиционирование

нуклеосом обеспечивается множеством транскрипционных факторов, шаперонов и структурных ядерных белков. Радиус кривизны нуклеосомной ДНК составляет приблизительно 4 нм [3], что соответствует довольно напряженной конфигурации. Жесткость молекулы ДНК обусловлена не только ее двуспиральной природой, но и значительным отрицательным зарядом, так как деформация ДНК должна приводить к сближению отрицательно заряженных группировок сахарофосфатного остова. Однако, несмотря на множество наблюдаемых непосредственных взаимодействий наблюдаются лишь в 14 точках. Известно, что моновалентные катионы в значительной степени экранируют заряды на ДНК, образуя своеобразную “ионную шубу” на расстоянии до 1 нм от поверхности молекулы, что позволяет стабилизировать ДНК при помощи сравнительно небольшого числа контактов. Таким образом, одним из важнейших факторов, определяющих ход сборки нуклеосом, а также их стабильность, является степень нейтрализации зарядов на ДНК.

Вопрос организации зарядовых взаимодействий в нуклеосоме принципиально важен для понимания механизма сборки нуклеосом и структур более высокого уровня. Нуклеосомы представляют собой очень динамичные структуры, для которых характерно множество разнообразных внутренних движений, связанных с частичным отделением ДНК от гистонов. Степень отделения ДНК определяет ее доступность для различных белков — транскрипционных факторов, ферментов транскрипции и репарации. Детальное полноатомное моделирование сборки целой нуклеосомы на данный момент является трудновыполнимой задачей в силу боль-

шого размера нуклеомы и времени сборки, которое значительно превосходит доступные на данный момент времена моделирования. По этой причине в данной работе производится исследование конечных стадий сборки нуклеосомы, а именно реассоциации последних 20 п.н. ДНК к гистоновому октамеру методом молекулярной динамики. Показано, что скорость реассоциации определяется релаксацией распределения зарядов на поверхности гистонов и не зависит явно от распределения ионов вокруг ДНК.

### Материалы и методы

Для исследования нуклеосом использовался метод молекулярной динамики в силовом поле CHARMM36. Начальная модель была создана на основе кристаллической структуры, взятой из банка данных PDB с индексом 1KX5 [4]. В качестве начальной конформации была взята нуклеосома со спрямленным участком ДНК длиной 20 п.н. Отвернутая конфигурация ДНК была приготовлена при помощи пакета программ 3DNA [5]. От нуклеосом были удалены гистонные хвосты, молекула была погружена в прямоугольную расчетную ячейку с отступом до края ячейки 1 нм. Свободные от нуклеосомы участки ячейки были заполнены молекулами воды и ионами  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  до концентрации 150 мМ. Для моделирования молекул воды применялась модель TIP3P. Релаксация системы производилась в несколько этапов, на первом этапе фиксировали ДНК и белок, позволяя воде и ионам адаптироваться к содержимому ячейки, далее в течение нескольких наносекунд плавно снимали ограничения на движения ДНК и гистонов. Для того чтобы избежать диффузии нуклеосомы в расчетной ячейке, Са атомы гистона H3 фиксировали при помощи мягких гармонических потенциалов (константа жесткости потенциала 0,003 ккал/моль). Моделирование производилось методом динамики Ланжевена при постоянной температуре 26,85°C и давлении 101,3 кПа. Применялись периодические граничные условия, радиус обрезания дальних взаимодействий составлял 1 нм, электростатические взаимодействия учитывались при помощи метода PME.

Было приготовлено 2 системы, которые отличались временем релаксации, 1 нс и 10 нс для первой и второй модели соответственно. Расчет траектории молекулярной динамики системы производился в течение 50 нс. Вычисления производились в программе NAMD [6] на 32 процессорах и двух графических процессорах. Обработка траекторий производилась при помощи программы VMD 1.9.2. [7].

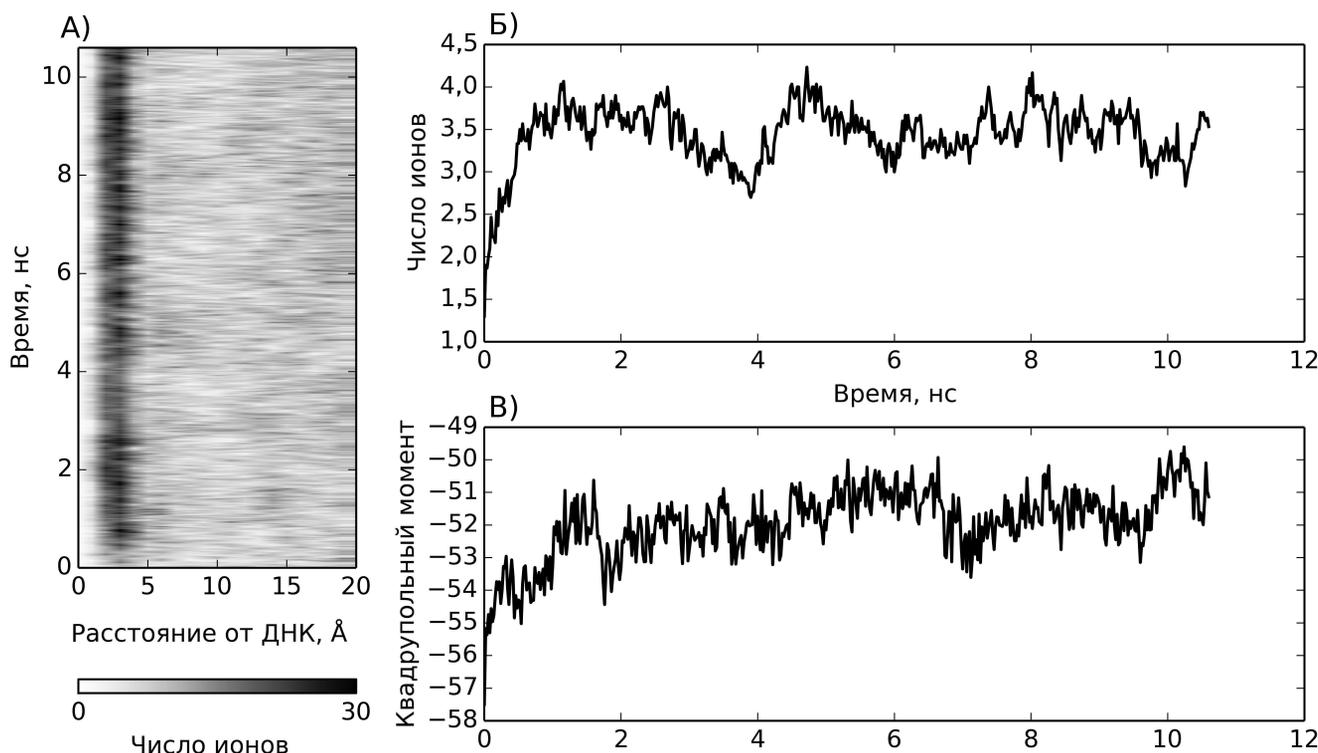
### Результаты и обсуждение

Небольшие участки ДНК отделяются от нуклеосомы спонтанно и относительно быстро (10–50 мс) возвращаются назад [8]. Однако в ходе моделирования было показано, что после короткой релаксации системы (1 нс), нуклеосома мгновенно возвраща-

лась в конфигурацию, близкую к кристаллической. Наиболее амплитудный этап возвращения ДНК занял менее 15 нс, после чего система была стабильна на протяжении всего времени моделирования. По литературным данным [8], подобного рода подвижность (“нуклеосомное дыхание”) в нуклеосоме происходит с характерным промежутком времени порядка 50–200 мс. Одной из возможных причин столь быстрого движения является недостаточная экранировка зарядов на ДНК от зарядов на поверхности гистонов, однако на рисунке (А и Б) видно, что концентрация ионов вокруг ДНК возрастает быстро и за 1 нс успевает достигнуть равновесного значения, которое сохраняется при увеличении времени моделирования.

Было показано, что после моделирования длительной релаксации системы, на протяжении 50 нс свободной динамики нуклеосома не возвращается в исходную конфигурацию, а отогнутая ДНК находится вдали от конформации, наблюдаемой в кристалле. Изначально идентичные системы ведут себя различно в зависимости от времени релаксации, несмотря на то, что характер распределения катионов вокруг ДНК схож в обоих случаях. Одной из возможных причин такого поведения является перераспределение зарядов на поверхности гистонов. Так как их движения в пространстве серьезно ограничены, следует ожидать меньшей скорости их адаптации к конфигурации со спрямленным участком ДНК. На рисунке (В) показано изменение квадрупольного момента, образуемого гистонными зарядами вдоль оси, перпендикулярной плоскости супервитка ДНК. Видно, что характер изменения квадрупольного момента отличается от характера изменения распределения катионов, он изменяется медленнее и за 1 нс не успевает достичь значений, которых он достигает за 10 нс. Таким образом, для сборки нуклеосомы требуется не только эффективное экранирование зарядов на поверхности ДНК, но и определенная конфигурация зарядов на поверхности гистонов.

Отворачивание ДНК от нуклеосомы, а также кинетика ее возврата влияет не только на пути сборки нуклеосом, но и на механизмы регуляции транскрипции. Частичное отделение ДНК от гистонов приводит к открытию мест посадки транскрипционных факторов [9], такие движения называют “нуклеосомным дыханием”. Спонтанное отворачивание происходит в результате температурной подвижности ДНК с определенной константой равновесия, которая зависит от энергии взаимодействия ДНК с гистонами. Таким образом, последовательность нуклеотидов в ДНК косвенно влияет на процесс транскрипции. Исследование зависимости энергии взаимодействия ДНК с октамером гистонов принципиально важно для определения мест посадки нуклеосом на ДНК, а также для построения кинетических моделей регуляции транскрипции на уровне нуклеосом [10].



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

На данный момент нет полного представления о механизмах обеспечения стабильности и сборки нуклеосомы. В ряде работ электростатические взаимодействия выделяют как основные силы, определяющие устройство нуклеосомы. В работе [11] было показано, что стационарные заряды гистонов эффективнее нейтрализуют ДНК, нежели свободные заряды, а главным фактором, вызывающим усиленную конденсацию противоионов является сближение спиралей ДНК. Низкая диэлектрическая проницаемость гистонов и высокая проницаемость гистонов для молекул воды и ионов являются дополнительным фактором, повышающим стабильность нуклеосомы. В работе [12] было также показано, что для изгиба ДНК в суперспираль, подобную нуклеосомной, достаточно дополнительно нейтрализовать лишь 6% зарядов на фосфатных группировках ДНК.

Однако существует ряд наблюдений, которые трудно объяснить одной лишь электростатикой. Стабильность и позиционирование нуклеосом зависит от последовательности ДНК [13]. Среди SIN-мутантов нуклеосом есть нуклеосомы с подвижной ДНК [14], которые не содержат мутаций, изменяющих заряд гистонов. Таким образом, необходимо разрабатывать комплексные теоретические модели энергетического баланса, определяющего структуру и функционирование нуклеосом. Такие модели должны учитывать не только электростатические взаимодействия внутри нуклеосомы, но и зависимость энергии деформации ДНК от последовательности нуклеотидов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 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. Shaytan A.K., Armeev G.A., Goncarencu A., Zhurkin V.B., Landsman D., Panchenko A.R. Coupling between histone conformations and DNA geometry in nucleosomes on a microsecond timescale: atomistic insights into nucleosome functions // *J. Mol. Biol.* 2015.
3. Richmond T.J., Davey C.A. The structure of DNA in the nucleosome core // *Nature*. 2003. Vol. 423. N 6936. P. 145–150.
4. 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.

5. Lu X.-J., Olson W.K. 3DNA: a versatile, integrated software system for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic-acid structures // *Nat. Protoc.* 2008. Vol. 3. N 7. P. 1213–1227.

6. Phillips J.C., Zheng G., Kumar S., Kale L.V. NAMD: Biomolecular simulation on thousands of processors // *Supercomputing, ACM/IEEE 2002 Conference*, 2002. P. 36–36.

7. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: visual molecular dynamics // *J. Mol. Graph.* 1996. Vol. 14. N 1. P. 33–38, 27–28.

8. *Li G., Levitus M., Bustamante C., Widom J.* Rapid spontaneous accessibility of nucleosomal DNA // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2005. Vol. 12. N 1. P. 46–53.
9. *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. N 2. P. 130–149.
10. *Mirny L.A.* Nucleosome-mediated cooperativity between transcription factors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. Vol. 107. N 52. P. 22534–22539.
11. *Materese C.K., Savelyev A., Papoian G.A.* Counterion atmosphere and hydration patterns near a nucleosome core particle // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. Vol. 131. N 41. P. 15005–15013.
12. *Manning G.S.* Is a small number of charge neutralizations sufficient to bend nucleosome core DNA onto its superhelical ramp? // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. Vol. 125. N 49. P. 15087–15092.
13. *Chua E.Y.D., Vasudevan D., Davey G.E., Wu B., Davey C.A.* The mechanics behind DNA sequence-dependent properties of the nucleosome // *Nucleic Acids Res.* 2012. Vol. 40. N 13. P. 6338–6352.
14. *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.

Поступила в редакцию 09.04.2016 г.  
Принята в печать 06.06.2016 г.

## METHODS

### NUCLEOSOME STRUCTURE RELAXATION DURING DNA UNWRAPPING: MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS STUDY

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

*Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,  
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;*

*\* e-mail: alex@molsim.org*

In this paper we consider the effects of relaxation of the nucleosome local structure after DNA unwrapping from the histone octamer. We study the role of the charge distribution in histones during DNA rewinding. We employ molecular dynamics simulations to show that ionic environment rapidly stabilizes during the relaxation of the system. In the case of simulations with preliminary relaxation of solvent and non-backbone atoms for a short period of time, a rapid irreversible restoration of the structure similar to crystal was observed. Rewinding of DNA did not occur in case when the solvent was allowed to relax for a longer time period, despite no apparent differences in the ionic environment of DNA. The change of the quadrupole moment during relaxation of the system was shown.

**Key words:** *nucleosome, chromatin, molecular dynamics, DNA, histones, epigenetics.*

#### Сведения об авторах:

*Армеев Григорий Алексеевич* — аспирант, мл. науч. сотр. 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