

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.323

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ ПРОЦЕССА
ОТВОРАЧИВАНИЯ ДНК ОТ ГИСТОНОВОГО ЯДРА НУКЛЕОСОМЫ
МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

А.К. Грибкова, Г.А. Армеев*, 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: armeev@molsim.org*

Работа посвящена изучению компактизации ДНК на нуклеосомном уровне. Взаимодействие ДНК с гистонами влияет на протекание ключевых процессов репликации и транскрипции. Такое взаимодействие в общем случае может быть охарактеризовано величиной свободной энергии связывания. В данной работе рассчитывалось изменение свободной энергии связывания в процессе отворачивания ДНК от гистонного ядра нуклеосомы. Расчёты проводились методом ММ/PBSA. Рассчитанные профили хорошо согласуются с экспериментальными данными из литературных источников. Полученные результаты свидетельствуют о применимости методики для изучения влияния посттрансляционных модификаций гистонов и гистоновых вариантов на энергетику нуклеосом, что важно для понимания механизмов регуляции транскрипции в хроматине.

Ключевые слова: нуклеосома, хроматин, молекулярная динамика, ММ/PBSA, свободная энергия, ДНК, гистоны

В клетках эукариот геномная ДНК организована в хроматин. Элементарной повторяющейся единицей хроматина является нуклеосома, представляющая собой ~145–147 нуклеотидных пар (н.п.) ДНК, обвивающих гистонный октамер около 1,7 раз. Белковая часть нуклеосомы имеет вид цилиндра (радиус 65 Å, высота 60 Å) и состоит из четырёх димеров гистонов: H2A–H2B, H3–H4. Наматывание ДНК на нуклеосомы приводит к компактизации линейных размеров ДНК в 6–7 раз, что приводит к возникновению физических препятствий для взаимодействия ДНК с различными белковыми факторами. Регуляция плотности упаковки, а, следовательно, и доступности ДНК, может осуществляться при помощи гистоновых шаперонов и факторов ремоделирования хроматина путём введения посттрансляционных модификаций гистонов или изменения гистонного состава [1]. Несмотря на плотную упаковку, для нуклеосом характерны высокочастотные тепловые движения и крупномасштабные конформационные переходы; примером такой подвижности является частичное отделение концевых участков ДНК от нуклеосом – “дыхание”, что говорит о меньшей энергии связывания этих участков ДНК с гистонами. Таким образом, нуклеосома является стабильным, но в то же время динамичным комплексом, обеспечивающим помимо компактизации генетического материала ещё и регуляцию экспрессии генов.

Нуклеосомы соединены между собой участками линкерной ДНК длиной приблизительно 50 н.п. Формированию более плотной укладки ДНК (на-

пример, 30-нанометровой фибриллы) способствует гистон H1, взаимодействующий с ДНК в местах её входа и выхода из октамера гистонов.

Существует ряд экспериментальных методов для оценки энергии ДНК-гистоновых взаимодействий. Первые кристаллографические исследования рассматриваемых взаимодействий выявили следующее расположение наиболее сильных контактов: симметричные относительно диадной оси положения ± 5 н.п. и ± 36 – ± 46 н.п. [2]. Экспериментальные методы не позволяют оценить энергию взаимодействия нуклеосомной ДНК с октамером гистонов через измерение равновесных концентраций свободной ДНК и нуклеосом [3], однако существуют методы для прямого измерения профиля энергии взаимодействия отдельных участков ДНК с гистонами. Одними из наиболее интересных примеров являются эксперименты по силовому растягиванию одиночных нуклеосом при помощи оптического пинцета [4].

Экспериментально наблюдаемые ступенчатые удлинения нуклеиновой кислоты при растягивании описываются трёхстадийной моделью [2]. Согласно этой модели, в начале воздействия внешний виток ДНК может быть обратимо отделён, дальнейшее удлинение требует преодоления энергетического барьера и приводит к необратимому скручиванию внутреннего витка ДНК. На последней стадии октамер полностью отделяется от ДНК.

Несмотря на то, что октамер гистонов считается довольно стабильным, не до конца ясно, что происходит с ним в ходе силового разворачива-

ния. Началу отворачивания нуклеиновой кислоты мешает её взаимодействие с N-концом (H3) и C-концом (H2A), в то время как N-концы (H2A, H2B, H4) препятствуют процессу отворачивания на поздних стадиях. Так, в исследованиях методом молекулярной динамики (МД), контакты ДНК-гистоны (в случае нуклеосом с гистоновыми хвостами) оказались прочнее, чем межгистоновые [5]. Исследования, выполненные методом Фёрстеровского резонансного переноса энергии от одиночных молекул (spFRET), продемонстрировали мобильность гистонового кора, способного разбираться с потерей димера H2A-H2B и даже тетрамера (H3-H4)₂ [6]. Помимо прочего, в экспериментах, совмещающих в себе spFRET и оптический пинцет, было показано, что гибкость ДНК зависит от нуклеотидной последовательности [6].

Подвижность нуклеосомы и гистоновых хвостов, малые размеры объекта вносят затруднения при проведении экспериментальных исследований, которые отличаются высокой сложностью. В связи с этим методы компьютерного моделирования для оценки энергии взаимодействия ДНК с гистонами являются весьма перспективной альтернативой таким экспериментам.

В литературе описан ряд методов для теоретической оценки энергетики взаимодействия ДНК-гистоны. Однако они не лишены ряда приближений и допущений. В общем случае, прочность связывания комплекса лиганд-рецептор (ДНК-гистоны) определяется свободной энергией связывания, ΔG_{bind} . Эту энергию можно оценить, повторив эксперимент по растягиванию нуклеосом методом молекулярной динамики (МД) путём приложения внешних сил к концевым участкам ДНК [5]. В ранее проведенных экспериментах было выявлено пять стадий процесса отворачивания ДНК и два основных энергетических барьера в областях 70 и 45 н.п. от носительно диадной оси.

Проводить оценку энергии взаимодействий можно как с помощью метода термодинамического интегрирования на основе полноатомных силовых полей, так и с помощью эмпирических огрубленных моделей. Но для полноатомного моделирования требуется произвести очень большое число вычислений, а использование огрубленных моделей не дает желаемой точности.

В данной работе для расчета энергетики профиля отворачивания ДНК от гистонового ядра нами был использован метод MM/PBSA (Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area) [7]. Данный метод комбинирует полноатомные модели нуклеосомы с полевыми моделями растворителя, что позволяет проводить расчёты с адекватной точностью за разумное время. Рассчитанные профили согласуются с ранее полученными экспериментальными данными, что указывает на применимость подхода для решения следующего уровня биологических задач, например, оценки влияния пост-

трансляционных модификаций гистонов на энергетические профили процесса откручивания ДНК от нуклеосомы.

Материалы и методы

В методе MM/PBSA ΔG_{bind} имеет следующий вид:

$$\Delta G_{bind} = \langle G_{PL} \rangle - \langle G_P \rangle - \langle G_L \rangle.$$

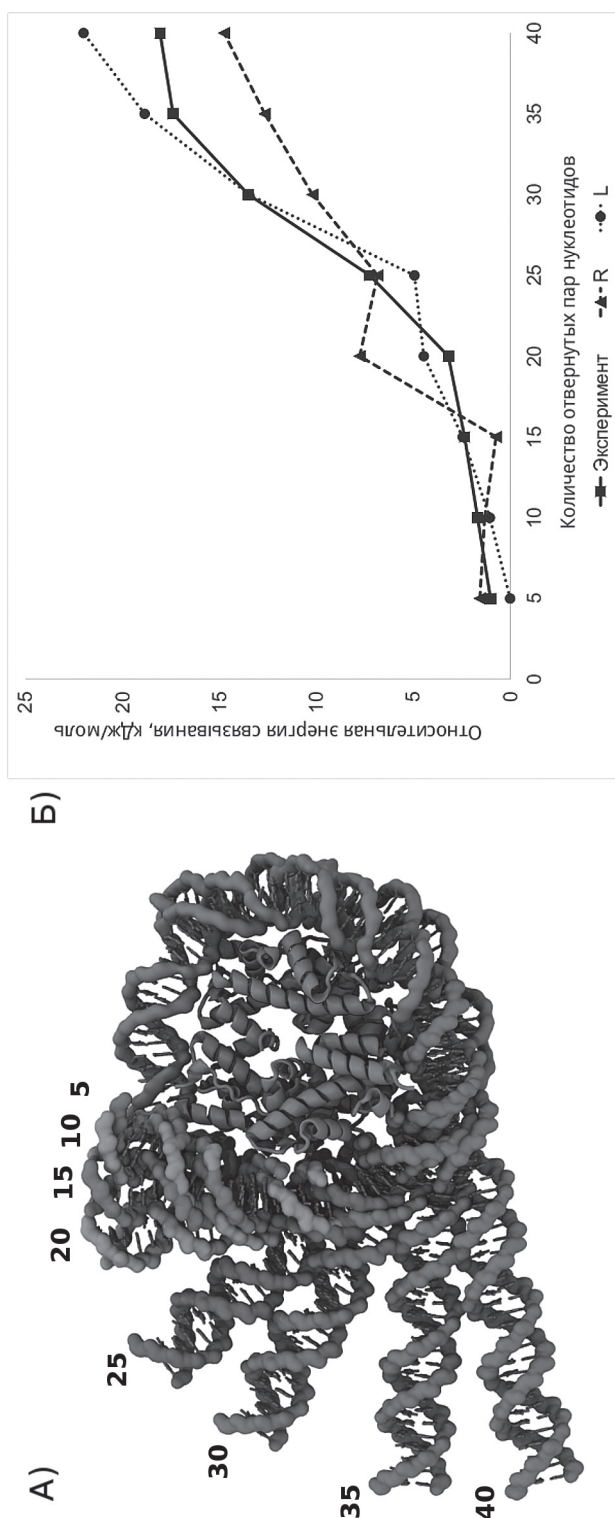
Свободная энергия систем (Р-гистоны, L-ДНК, или PL-нуклеосома) определена как:

$$G = E_{bnd} + E_{el} + E_{vdW} + G_{pol} + G_{np} - TS,$$

где E_{bnd} — энергия связей, валентных и двугранных углов, E_{el} — электростатических взаимодействий, E_{vdW} — Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий; G_{pol} и G_{np} — полярный и неполярный вклады в свободную энергию сольватации, TS — энтропийный компонент.

При использовании MM/PBSA нужно учитывать следующие особенности метода. Во-первых, расчёт электростатического потенциала по Пуассону-Больцману не позволяет учитывать ряд эффектов, в частности, адсорбцию ионов на ДНК. Во-вторых, в методе используются следующие термодинамические приближения: не учитывается конформационная энтропия комплекса (в связи с большой погрешностью вычисления энтропии методом нормальных мод этот вклад часто опускается), не учитываются эффекты, связанные с присутствием молекул воды на интерфейсе взаимодействия ДНК с гистонами.

Для проведения исследования на основе кристаллической структуры нуклеосомы из базы данных PDB с индексом 1kx5 [8] были созданы модельные системы в полноатомном приближении. У исходной структуры нуклеосомы были удалены подвижные гистоновые хвосты [9] и откручена ДНК (от 5 до 40 н.п. с шагом в 5 н.п.), как показано на рисунке, А. Далее для данных систем проводилось моделирование методом молекулярной динамики, что позволяло получить ансамбли различных конформаций исходных структур. Для этого системы помещались в прямоугольные расчётные ячейки, с учётом того, что наименьшее расстояние от нуклеосомы до одной из её граней должно быть не менее 1 нм. Свободное пространство ячейки заполнялось молекулами воды (модель TIP3P), ионами натрия и хлора в концентрации 150 мМ. Для предотвращения краевых эффектов были использованы периодические граничные условия. Чтобы привести системы к термодинамическому равновесию была проведена минимизация потенциальной энергии методом наискорейшего спуска. Дальнейшее уравновешивание системы производилось по описанной ранее методике [10]. Для термостатирования расчетной ячейки применялся модифицированный термостат Берендсена со стохастической прибавкой, причём вода и молекулы термостатировались



раздельно. В качестве баростата был использован изотропный баростат Паринелло-Рамана. Далее проводилось вычисление траекторий движения атомов длительностью от 1 до 5 нс. Стабильность систем оценивалась методом расчёта наименьшего среднеквадратичного отклонения структуры по траектории (RMSD).

Моделирование проводилось с использованием силового поля AMBER99SB-BSC0 [11], интегрирование проходило с помощью метода leap-frog с шагом 1 фс. Электростатические взаимодействия

Рисунок. А) Восемь совмещенных нуклеосом с отворнутыми от 5 до 40 н.п. ДНК (сторона отворота R). Б) Предсказанные и экспериментально измеренные профили энергии ДНК-гистоновых взаимодействий (R и L – отворачиваемые концы ДНК)

учитывались при помощи метода PME (шаг решётки 1 Å, радиус обрезания взаимодействий в прямом пространстве 1 нм, интерполяция кубическая). Для учёта Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий использовался радиус обрезания в 1 нм с плавным выравниванием потенциала на границе обрезания. Расчёты проводились в программе Gromacs [12]. Для визуализации моделей применялась программа VMD [13].

Результаты и обсуждение

В ходе работы были созданы и уравновешены модельные нуклеосомные системы в воде с отворнутыми нуклеотидными парами (от 5 до 40 с шагом 5 н.п.) с двух сторон (условно названные R и L) (рисунок, А). Методом молекулярной динамики были рассчитаны траектории движения атомов (длиной от 1 до 5 нс). При помощи метода MM/PBSA были построены энергетические профили процесса отделения ДНК (рисунок, Б), согласующиеся с экспериментальными данными, полученными на одиночных нуклеосомах [14].

Форма теоретических кривых хорошо совпала с экспериментальными данными (рисунок, Б). Разница в абсолютных значениях свободной энергии связывания объясняется особенностями расчёта электростатического вклада в методе MM/PBSA (который определён с точностью до константы). Данное замечание верно и для полученных вкладов различных энергетических компонент в энергию связывания. При расчёте энергии взаимодействия ДНК с гистонами по исходным неуравновешенным структурам был показан сильно завышенный вклад Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий, что связано со значительными стерическими перекрытиями в моделях и подтверждает необходимость использования траекторий молекулярной динамики. Однако с увеличением длины траектории (от 1 до 5 нс) точность метода с учётом погрешности измерений не увеличивалась на сопоставимо значимые значения. Таким образом, можно сделать вывод, что для соблюдения баланса между затрачиваемым на расчёты временем и точностью полученных результатов можно ограничиться траекторией длиной в 1 нс.

Помимо расчёта профиля свободной энергии для собранной нуклеосомы был также произведен аналогичный расчёт для гексасомы — нуклеосомы без димера гистонов H2A-H2B (отворачивание производили с противоположной удаленным гистонам стороны). Интересно, что кривая, полученная для этого расчёта, лучше соответствует экспериментальным значениям. Можно предположить, что в эксперименте участвовали не только нуклеосомы, но и гексасомы, ведь гистоны H2A-H2B способны к спонтанной обратимой диссоциации. Данное предположение верно лишь в том случае, если погрешность метода невелика. Действительно, дисперсия рассчитанных по траекториям величин свободной энергии мала относительно аб-

солютных величин, но она, по всей видимости, и не может быть напрямую использована для оценки погрешности метода. Эту оценку можно произвести иначе. Нуклеосома обладает псевдосимметричной структурой относительно диадной оси. В данной работе использовалась структура 1KX5 с палиндромной (относительно диадной оси) ДНК. Таким образом, профили свободной энергии при отворачивании ДНК с разных сторон должны совпадать, однако соответствующие вычисленные профили отличаются друг от друга (рисунок, Б). Разница между профилями может служить мерой погрешности метода. Различия в энергии для разных сторон ДНК можно объяснить тем, что расчёта коротких траекторий молекулярной динамики недостаточно для полного исследования конфигурационного пространства вблизи начальной структуры. Помимо этого, гистоновые хвосты были удалены не полностью (не до первых элементов вторичной структу-

ры), а согласно обычным позициям их удаления в экспериментах. Оставшиеся короткие участки гистоновых хвостов конформационно лабильны и приводят к “зашумлению” рассчитанного профиля свободной энергии при использовании расчётных траекторий небольшой длины.

Таким образом, мы показали, что разработанная методика позволяет исследовать профили энергии связывания ДНК с гистонами в различных нуклеосомных интермедиатах, образуемых при откручивании ДНК от гистонного ядра. Данная методика может быть использована для изучения влияния посттрансляционных модификаций гистонов и гистоновых вариантов на энергетику нуклеосом, что важно для понимания механизмов регуляции транскрипции в хроматине.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shaytan A.K., Landsman D., Panchenko A.R. Nucleosome adaptability conferred by sequence and structural variations in histone H2A–H2B dimers // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2015. Vol. 32. P. 48–57.
2. Brower-Toland B.D., Smith C.L., Yeh R.C., Lis J.T., Peterson C.L., Wang M.D. Mechanical disruption of individual nucleosomes reveals a reversible multistage release of DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002. Vol. 99. N 4. P. 1960–1965.
3. Thåström A., Gottesfeld J.M., Luger K., Widom J. Histone-DNA binding free energy cannot be measured in dilution-driven dissociation experiments // *Biochemistry.* 2004. Vol. 43. N 3. P. 736–741.
4. Mihaudja S., Spakowitz A.J., Zhang Y., Bustamante C. Effect of force on mononucleosomal dynamics // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006. Vol. 103. N 43. P. 15871–15876.
5. Ettig R., Kepper N., Stehr R., Wedemann G., Rippe K. Dissecting DNA-histone interactions in the nucleosome by molecular dynamics simulations of DNA unwrapping // *Biophys. J.* 2011. Vol. 101. N 8. P. 1999–2008.
6. Zhang B., Zheng W., Papoian G.A., Wolynes P.G. Exploring the free energy landscape of nucleosomes // *J. Am. Chem. Soc.* 2016. Vol. 138. N 26. P. 8126–8133.
7. Kollman P.A., Massova I., Reyes C. et al. Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models // *Acc. Chem. Res.* 2000. Vol. 33. N 12. P. 889–897.
8. 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.
9. 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.
10. Armeev G.A., Shaitan K.V., Shaytan A.K. Nucleosome structure relaxation during DNA unwrapping: Molecular dynamics simulation study // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol. 71. N 3. P. 141–144.
11. 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.
12. Pronk S., Páll 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.
13. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: visual molecular dynamics // *J. Mol. Graph.* 1996. Vol. 14. N 1. P. 33–38.
14. Forties R.A., North J.A., Javaid S., Tabbaa O.P., Fishel R., Poirier M.G., Bundschuh R. A quantitative model of nucleosome dynamics // *Nucleic Acids Res.* 2011. Vol. 39. N 19. P. 8306–8313.

Поступила в редакцию

17.05.2017

Принята в печать

15.06.2017

MOLECULAR BIOLOGY

INVESTIGATION OF HISTONE-DNA BINDING ENERGY AS A FUNCTION OF DNA UNWRAPPING FROM NUCLEOSOME USING MOLECULAR MODELING

A.K. Gribkova, G.A. Armeev*, A.K. Shaytan

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

*e-mail: armeev@molsim.org

The present study contributes to the understanding of DNA compaction in cell nucleus at the nucleosomal level. The interactions between DNA and histones can be described in terms of a free energy profile, DNA binding affects key processes of cell life including replication and

transcription. MM/PBSA method was used to calculate free energy profile during DNA unwrapping from histone octamer. Our results are in good agreement with experimental data published earlier. The developed approach can be applied to study the effects of post-translational modifications of histones and histone variants on nucleosome stability, which is important for understanding the mechanisms of transcriptional regulation in chromatin.

Keywords: *nucleosomes, chromatin, molecular dynamics, MM/PBSA, free energy calculations, DNA, histones*

Сведения об авторах

Грибкова Анна Кирилловна — студентка кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: anna_gribkova@list.ru

Армеев Григорий Алексеевич — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: armeev@molsim.org

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