

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.213.39

Исследование влияния однонитевого разрыва на механические параметры ДНК методом молекулярной динамики**О.И. Волох, Г.А. Армеев, Е.С. Трифонова, О.С. Соколова****Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12***e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru*

Раннее обнаружение и восстановление поврежденной ДНК имеет важное значение для функционирования и выживания клеток. Недавно предложенный механизм формирования внутринуклеосомных петель предполагает релаксацию сверхспирализации ДНК, накопленной при транскрипции через поврежденный хроматин. На степень спирализации ДНК влияют механические свойства и структура двойной спирали. В данной работе мы исследовали влияние введения однонитевого разрыва на механические свойства фрагмента ДНК методом молекулярной динамики. Был сделан вывод о том, что введение однонитевого разрыва приводит к снижению жесткости и повышению эластичности поврежденной, по сравнению с интактной, молекулы ДНК, что может привести к ослаблению сверхспирализации дефектной ДНК и к остановке фермента РНК-полимеразы.

Ключевые слова: ДНК, молекулярная динамика, модуль Юнга, однонитевой разрыв, жесткость, упругость

Генетический материал клетки находится под постоянным воздействием факторов внешней и внутренней среды, приводящим к возникновению повреждений в структуре ДНК. Для устранения образующихся нарушений в клетке существуют процессы репарации ДНК, однако в случае их некорректной работы может происходить накопление нарушений, ведущее к развитию различных патологий – тяжелых нарушений метаболизма, онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний [1, 2]. Чаще всего при повреждении молекулы ДНК наблюдается образование однонитевых разрывов. Они могут возникать ежедневно в огромных количествах в результате спонтанного гидролиза ковалентных связей либо вследствие воздействия активных форм кислорода [3].

Раннее обнаружение и восстановление поврежденной ДНК имеет важное значение для функционирования и выживания клеток. Согласно проводимым в последнее время исследованиям, организация ядерной ДНК в хроматин [4, 5] может изменять процесс поиска повреждений ферментами системы репарации. Новые данные свидетельствуют о существовании хроматин-специфического механизма, позволяющего обнаруживать одиночные разрывы нематричной цепи ДНК при транскрипции ферментом РНК-полимеразой (РНКП). Было показано [6, 7], что одиночные разрывы нематричной цепи ДНК способны приводить к нуклеосом-специфичной остановке РНКП *Escherichia coli* после преодоления ферментом участка разрыва, на расстоянии

порядка 7–12 п.н. от него. В одной из работ [6] была определена периодичность остановок РНКП в положениях: (+24), (+34) и (+44) нуклеосомной ДНК. Была выдвинута гипотеза о том, что причиной подобной остановки является формирование внутринуклеосомных петель [7]. Этот механизм предполагает релаксацию сверхспирализации ДНК, накопленной при транскрипции через поврежденный хроматин. На эффективность релаксации сверхспирализации ДНК влияют механические свойства и структура двойной спирали. Однако для лучшего понимания процессов репарации и транскрипции необходимы структурные данные, в отсутствие которых хорошо зарекомендовало себя моделирование системы *in silico*. В данной работе методом молекулярной динамики (МД) исследовалось влияние введения однонитевого разрыва на механические свойства фрагмента ДНК.

Материалы и методы

Все МД-расчеты для выполнения задачи по оценке влияния введения однонитевого разрыва на механические свойства ДНК проводились с использованием программного пакета Gromacs 4.6.5 [8] и силового поля Amber99sb-ildn [9].

Расчет траекторий проводился в NPT-ансамбле при температуре 300°K (термостат Берендсена) и изотропном давлении 1 бар (баростат Берендсена); использованная модель воды – SPC-E [10]. Для потенциалов Леннарда-Джонса [11], для расчета электростатических взаимодей-

ствий использовался метод PME (particle mesh Ewald) [12]. В обоих случаях радиус отсечки составил 1,8 нм. Шаг интегрирования – 1 фс.

Создание моделей исследуемых структур фрагмента ДНК без однонитевого разрыва и с однонитевым разрывом. Для исследования влияния введения однонитевого разрыва на механические свойства ДНК была использована та же модельная (20 п.н.) последовательность ДНК из 603 нуклеосом-позиционирующей последовательности (НПП), что и в соответствующей работе [6]. Однонитевой разрыв был введен в (+12)-положение цитозина (С) нематричной цепи ДНК [6]:

Последовательность матричной цепи:
3'-GGGCCACAGAGGCGGGCGGA-5'.

Последовательность нематричной цепи:
5'-CCCGGTGTCTCCGCCCGCCT-3'.

Структура для проведения вычислительных экспериментов была построена в программе UCSF Chimera [13]. Введение однонитевого разрыва производилось нарушением ковалентной связи сахарофосфатного остова между кислородом дезоксирибозы гуанина и фосфором фосфатной группы цитозина нематричной цепи. Введение однонитевого разрыва никазами *in vivo* сопровождается гидролизом, в результате чего образуются –ОН-группа на дезоксирибозе гуанина и ОН-группа на фосфатной группе цитозина. Аналогичная модификация остатков была произведена для исследуемой *in silico* структуры с однонитевым разрывом.

Оценка влияния введения однонитевого разрыва на жесткость ДНК. Для подготовки структур к проведению управляемой МД системы релаксировались: были проведены расчеты равновесной молекулярной динамики исследуемых структур ДНК в водном растворе с физиологической концентрацией ионов Na^+ и Cl^- в течение 500 пс без баростата, и в течение 3 нс с баростатом. Роль двухвалентных ионов не исследовалась. Параметры расчетной ячейки: размер – $6,0 \times 15,0 \times 6,0$ нм; количество атомов – 53049 для интактной ДНК и 53057 для ДНК с однонитевым разрывом в положении +12 НПП; количество противоионов Na/Cl в системах – 87/49 и 86/49 соответственно.

Расчет модулей Юнга растяжения сравниваемых последовательностей ДНК производился с применением управляемой МД. Длины траектории составили 2 нс.

В ходе вычислительного эксперимента фиксировалась верхняя пара азотистых оснований DG5 и DC3, фиксация осуществлялась по трем координатам (x, y, z). Противоположному концу фрагмента нуклеиновой кислоты (атомы фосфора цепи P19 и P21) сообщалось ускорение, равное 6, 8, 10 нм/пс² по координате y, соответствующие приложенные силы равнялись 9, 12, 15 ккал/моль Å.

Расчет модуля растяжения производился по формуле:

$$E = \frac{F}{A_0} \cdot \frac{L_0}{\Delta L}, \quad (1)$$

где F – сила, приложенная к концу цепи (в Ньютонах), A_0 – поверхность приложения силы (ангстрем), L_0 – начальное расстояние между центрами масс концевых пар атомов фосфора (нм), ΔL – относительное удлинение соответствующего расстояния (нм).

Оценка влияния введения однонитевого разрыва на характер стэкинг-взаимодействий в области разрыва ДНК. Были проведены расчеты равновесной МД структур интактной ДНК и ДНК с однонитевым разрывом в водном растворе с физиологической концентрацией ионов Na^+ и Cl^- в течение 500 пс без баростата, и в течение 3 нс с баростатом. Параметры расчетной ячейки: размер – $5,7 \times 9,4 \times 5,6$ нм; количество атомов – 28693 для интактной ДНК и 25878 для ДНК с однонитевым разрывом в положении +12 НПП; количество противоионов Na/Cl в системах – 65/27 и 64/27 соответственно. Длина траекторий составила 20 нс. Расчет параметров подвижности для соседних нуклеотидных пар производился с использованием программы 3DNA (<http://x3dna.org>) [14–16] на основании координат, полученных из траекторий молекулярной динамики.

Оценивались следующие параметры соседних нуклеотидных пар:

- 1) Сдвиг вдоль оси x, Dx;
- 2) Сдвиг вдоль оси y, Dy;
- 3) Сдвиг вдоль оси z, Dz;
- 4) Угол наклона между плоскостями соседних пар нуклеотидов, r;
- 5) Угол наклона между плоскостями соседних пар нуклеотидов, p;
- 6) Угол «закручивания» между плоскостями соседних пар нуклеотидов, w.

Результаты и обсуждение

Для оценки влияния однонитевого разрыва на механические свойства фрагмента ДНК был применен разработанный нами ранее подход [17], изучали параметры жесткости и гибкости.

Жесткость оценивали с применением управляемой МД. В этом методе на отдельные атомы системы налагается дополнительный потенциал, который сообщает ускорение по определенным степеням свободы. График зависимости расстояний между центрами масс пар атомов фосфора на траектории молекулярной динамики для ускорения 10 нм/пс² приведен на рис. 1. Он показывает, что в начале управляемой динамики структуры ведут себя аналогичным образом до достижения расстояния между концевыми фосфатами ~6,5 нм. Предположительно, к этому моменту изменение стэкинг-взаимодействий доходит до нуклеотидных пар, соседних с однонитевым разрывом, и структуры начинают вести себя по-

разному. Во всех случаях при приложении ускорения структура ДНК с одонитевым разрывом растягивалась быстрее, чем аналогичная интактная структура, что свидетельствует в пользу меньшей жесткости структуры ДНК с одонитевым разрывом. Это подтверждается расчетными данными модуля Юнга: $(3,0 \pm 0,05) \times 10^9$ Па – для интактной ДНК, $(1,8 \pm 0,08) \times 10^9$ Па – для ДНК с одонитевым разрывом. Для расчета модуля упругости использовались участки траектории, соответствующие изменениям длин структуры в диапазоне 6,5–7,5 нм.

Для оценки влияния введения одонитевого разрыва на гибкость фрагмента ДНК определяли параметры стэкинг-взаимодействий между соседними парами нуклеотидов фрагмента ДНК. Данный подход широко используется для оценки гибкости ДНК [15, 18–19].

Проводилась оценка изменений следующих параметров из координат траекторий (рис. 2). Основным параметром для оценки гибкости является угол наклона между соседними парами нуклеотидов между плоскостями комплементарных пар вдоль оси у (Roll) [15, 18–19]. Мы также обратили

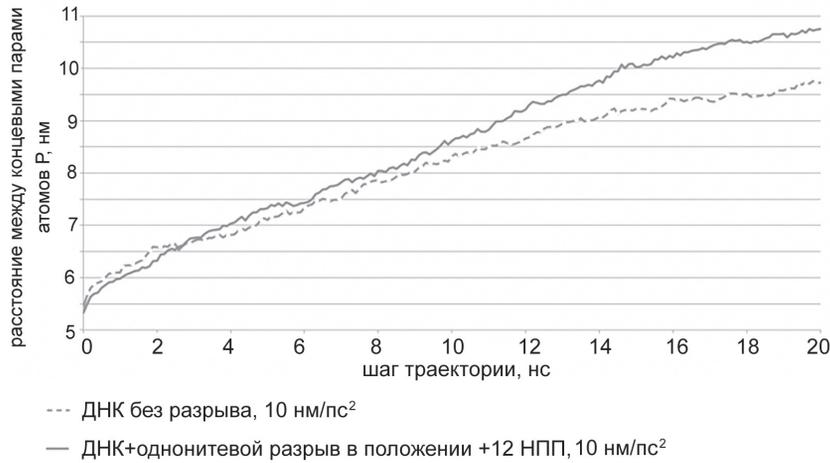


Рис. 1. График зависимости расстояний между центрами масс пар атомов фосфора на траектории управляемой молекулярной динамики. По оси x – шаг траектории (нс), по оси y – расстояние между центрами масс пар атомов P (нм).

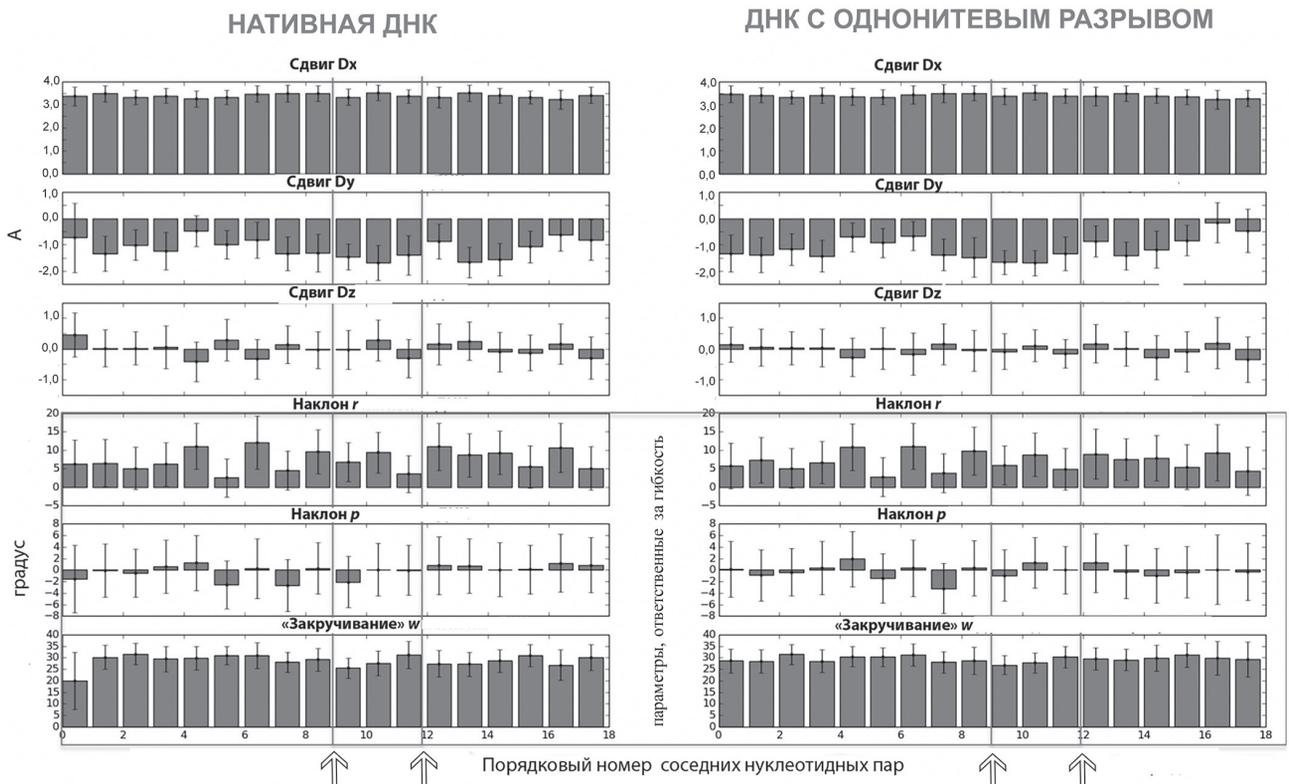


Рис. 2. Рассчитанные параметры стэкинг-взаимодействий нуклеотидных пар. Слева – данные для интактной структуры ДНК, справа – для ДНК с одонитевым разрывом, вертикальные выделенные стрелками блоки – соседние с одонитевым разрывом нуклеотидные пары. По оси y – значение смещения (в Å – для значений сдвига, в градусах – для углов наклона и «закручивания»). По оси x – порядковый номер соседних нуклеотидных пар. Доверительный интервал представляет собой стандартное отклонение рассчитанной величины на траектории.

внимание на угол наклона между плоскостями комплементарных нуклеотидных пар вдоль оси x (Tilt), и на угол поворота в плоскости комплементарных пар (Twist) (выделены горизонтальным блоком на рис. 2). Интерес представляет величина стандартного отклонения исследуемого параметра, так называемый «объем конформационного пространства» [20], в котором исследуемая переменная (величина угла) находится большую часть времени (рис. 3).

Из полученных графиков (рис. 2, 3) следует, что отношение отклонений параметров стэкинг-взаимодействий участков ДНК с однонитевым разрывом от соответствующих показателей ДНК без разрыва лежат в пределах 0,8–1,2 для ротационных и трансляционных степеней свободы. Значимых различий в поведении структур с однонитевым разрывом и без разрыва в ходе данного вычислительного эксперимента не выявлено. Это может быть связано с тем, что параметры стэкинг-взаимодействий в силовых полях, используемых в молекулярной динамике, существенно переоценены [21]. Таким образом, использование управляемой МД, где стэкинг-взаимодействия нарушаются за счет приложения силы, имеет преимущество, так как способно выявить различие в поведении систем с однонитевым разрывом и без него, в отличие от равновесной МД. Ранее мы исследовали методами равновесной и управляемой МД молекулярные модели фрагментов ДНК

с оценкой модуля Юнга растяжения, а также проводили сравнение поведения систем с экспериментальными данными [17]. В работе были продемонстрированы адекватное поведение молекулярно-динамических систем, совпадение порядковых значений расчетных данных с экспериментальными [22–24] и сопоставимость результатов расчетов с литературными данными [25], свидетельствующие в пользу адекватности МД-моделей комплексов ДНК и информативности использованного подхода, что послужило основанием для его использования к проведению расчетов и построению МД-систем для исследований других объектов ДНК, в том числе с белками в физиологическом ионном окружении.

Ионное окружение играет важную роль в функционировании ДНК-белковых комплексов в клетке. В частности, двухвалентные катионы способствуют компактизации хроматина [26, 29]. Взаимодействие между ионами двухвалентных металлов и ДНК было изучено нами ранее в системе с нуклеосомой [27] и с ДНК-связывающим белком прокариот Dps [28]. Мы показали, что заряды на ДНК эффективно экранированы белками на границе взаимодействия белок–ДНК. Появление одноцепочечного разрыва не изменит общего числа и расположения зарядов на ДНК по сравнению с интактной ДНК. Таким образом, ожидается, что влияние двухвалентных ионов на жесткость ДНК в обеих системах будет схожим

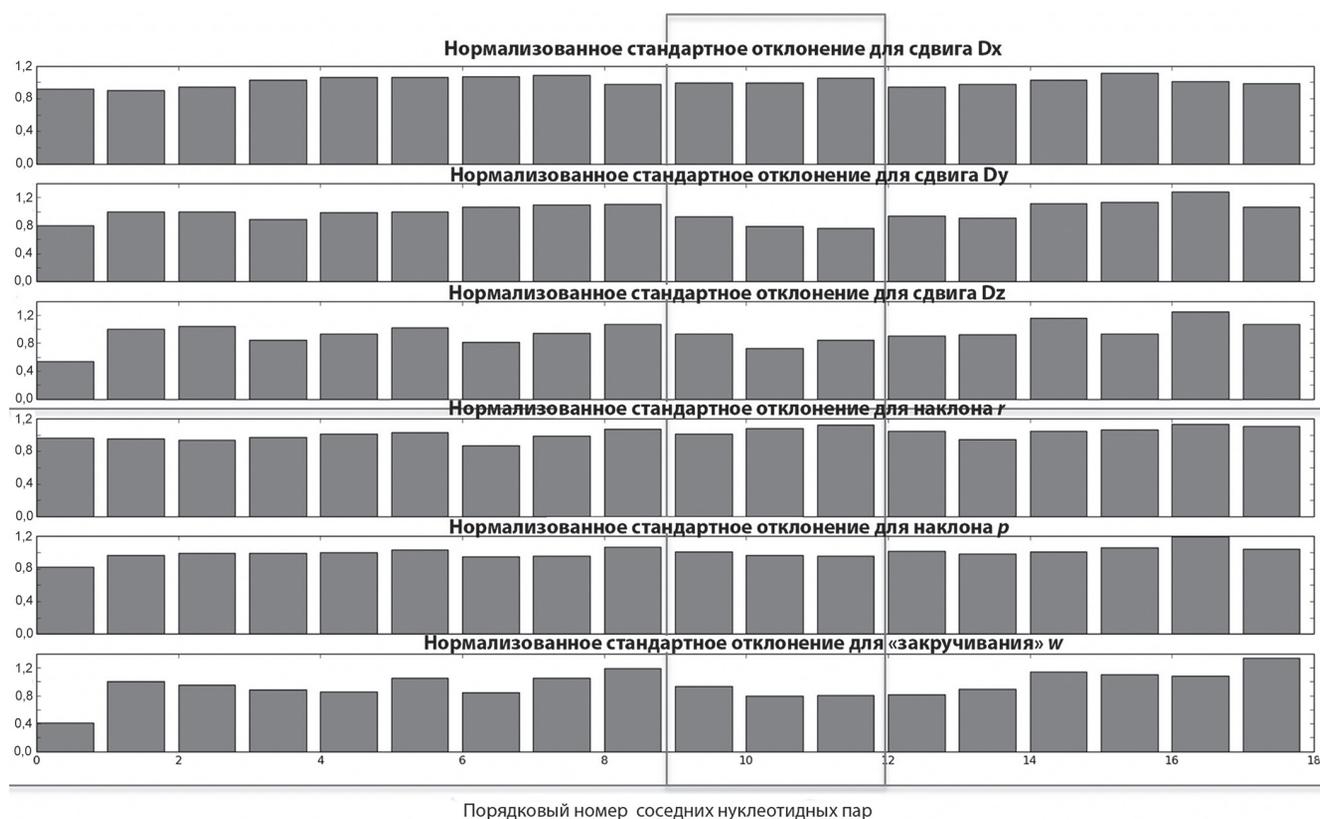


Рис. 3. Нормализованные значения стандартного отклонения параметров стэкинг-взаимодействий нуклеотидных пар. По оси x – нуклеотидные пары, по оси y – значения нормализованных по интактной ДНК стандартных отклонений параметров стэкинг-взаимодействий нуклеотидных пар.

и повлияет лишь на абсолютную величину, но не на относительное изменение механических характеристик ДНК.

В результате анализа полученных данных можно сделать вывод о том, что введение однонитевого разрыва приводит к снижению жесткости и повышению эластичности молекулы ДНК с однонитевым разрывом, по сравнению с интактной ДНК. Это может привести к релаксации сверхспирализации дефектной молекулы, связанной с нуклеосомой, и к остановке фермента РНКП в процессе транскрипции. Биологические процессы, связанные с ферментативным прочтением ДНК, характеризуются динамическим поведением двойной спирали, зависящим от первичной последовательности ДНК и «ненарушенности» связей между остатками. Таким образом, релаксация сверхспирализации может играть одну из ключевых ролей для осуществления транскрипции и преодоления нуклеосомных барьеров [30–32].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Klein H.L., Bačinskaja G., Che J., et al. Guidelines for DNA recombination and repair studies: Cellular assays of DNA repair pathways // *Microb. Cell.* 2019. Vol. 6. N 1. P. 1–64.
2. Higo T., Naito A., Sumida T., et al. DNA single-strand break-induced DNA damage response causes heart failure // *Nat. Commun.* 2017. Vol. 8: 15104.
3. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA // *Nature.* 1993. Vol. 362. N 6422. P. 709–715.
4. Kulaeva O., Gaykalova D., Pestov N., Golovostov V., Vassylyev D., Artsimovitch I., Studitsky V. Mechanism of chromatin remodeling and recovery during passage of RNA polymerase II // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009. Vol. 16. N 12. P. 1272–1278.
5. Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Volokh O., Shaytan A.K., Hsieh F.K., Kirpichnikov M.P., Sokolova O.S., Studitsky V.M. Structural analysis of nucleosomal barrier to transcription // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015. Vol. 112. N 43. P. E5787–E5795.
6. Gerasimova N.S., Pestov N. A., Kulaeva O.I., Nikitin D.V., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M. Repair of chromatinized DNA // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2015. Vol. 70. N 3. P. 122–126.
7. Pestov N.A., Gerasimova N.S., Kulaeva O.I., Studitsky V.M. Structure of transcribed chromatin is a sensor of DNA damage // *Sci. Adv.* 2015. Vol. 1. N 6: e1500021.
8. van der Spoel D., Lindahl E., Hess B., the GROMACS development team. GROMACS User Manual version 4.6.5. 2013.
9. 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.
10. Berendsen H.J.C., Grigera J.R., Straatsma T.P. The missing term in effective pair potentials // *J. Phys. Chem.* 1987. Vol. 91. N 24. P. 6269–6271.
11. Levitt M., Hirshberg M., Sharon R., Daggett V. Potential energy function and parameters for simulations of the molecular dynamics of proteins and nucleic acids in solution // *Comput. Phys. Commun.* 1995. Vol. 91. N 1–3. P. 215–231.
12. Darden T.A., Pedersen L.G. Molecular modeling: an experimental tool // *Environ. Health Perspect.* 1993. Vol. 101. N 5 P. 410–412.
13. Goddard T.D., Huang C.C., Ferrin T.E. Visualizing density maps with UCSF Chimera // *J. Struct. Biol.* 2007. Vol. 157. N 1. P. 281–287.
14. Lu X.-J., Shakked Z., Olson W.K. A-form conformational motifs in ligand-bound DNA structures // *J. Mol. Biol.* 2000. Vol. 300. N 4. P. 819–840.
15. Colasanti A.V., Lu X. J., Olson W.K. Analyzing and building nucleic acid structures with 3DNA // *J. Vis. Exp.* 2013. N 74: e4401.
16. Lu X. J., Olson W. K. 3DNA: a software package for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic acid structures // *NAR.* 2003. Vol. 31. N 17. P. 5108–5121.
17. Volokh O.I., Bozdoganyan M.E., Shaitan K.V. Assessment of the DNA-binding properties of actinomycin and its derivatives by molecular dynamics simulation // *Biophysics.* 2015. Vol. 60. N 6. P. 893–899.
18. Kumar R., Grubmüller H. do_x3dna: a tool to analyze structural fluctuations of dsDNA or dsRNA from molecular dynamics simulations // *Bioinformatics.* 2015. Vol. 31. N 15. P. 2583–2585.
19. Lankaš F., Šponer J., Langowski J., Cheatham T.E. DNA basepair step deformability inferred from molecular dynamics simulations // *Biophys. J.* 2003. Vol. 85. N 5. P. 2872–2883.
20. Olson W.K., Zhurkin V.B. Modeling DNA deformations // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2000. Vol. 10. N 3. P. 286–297.
21. Banáš P., Mládek A., Otyepka, M., Zgarbová, M., Jurečka, P., Svozil, D., Lankaš F., Šponer, J. Can we accurately describe the structure of adenine tracts in B-DNA? Reference quantum-chemical computations reveal overstabilization of stacking by molecular mechanics // *J. Chem. Theory Comput.* 2012. Vol. 8. N 7. P. 2448–2460.

22. Cocco S., Marko J. F., Monasson R. Theoretical models for single-molecule DNA and RNA experiments: from elasticity to unzipping // *C. R. Phys.* 2002. Vol. 3. N 5. P. 569–584.
23. Marko J.F., Cocco S. 2003. The micromechanics of DNA // *Phys World.* 2003. Vol. 16. N 3. P. 37–41.
24. Bloom K.S. Beyond the code: the mechanical properties of DNA as they relate to mitosis // *Chromosoma.* 2008. Vol. 117. N 2. P. 103–110.
25. Sobell H.M. Actinomycin and DNA transcription // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1985. Vol. 82. N 16. P. 5328–5331.
26. Liu Y.F., Ran S.Y. Divalent metal ions and intermolecular interactions facilitate DNA network formation // *Colloids Surf. B.* 2020. Vol. 194: 111117.
27. Armeev G.A., Shaitan K.V., Shaitan A.K. Molecular dynamics study of the ionic environment and electrical characteristics of nucleosomes // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2015. Vol. 70. N. 4. P. 173–176.
28. Moiseenko A., Loiko N., Tereshkina K., Danilova Y., Kovalenko V., Chertkov O., Feofanov A.V., Krupnyanskii Yu.F., Sokolova O.S. Projection structures reveal the position of the DNA within DNA-Dps Co-crystals // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019. Vol. 517. N 3. P. 463–469.
29. Jiang Y., Zhang H., Feng W., Tan T. Refined dummy atom model of Mg²⁺ by simple parameter screening strategy with revised experimental solvation free energy // *J. Chem. Inf. Model.* 2015. Vol. 55. N 12. P. 2575–2586.
30. Bondarenko V., Steele L., Ujvari A., Gaykalova D., Kulaeva O., Polikanov Y., Luse D., Studitsky V. Nucleosomes can form a polar barrier to transcript elongation by RNA polymerase II // *Mol. Cell.* 2006. Vol. 24. N 3. P. 469–479.
31. Hsieh F.K., Fisher M., Ujvari A., Studitsky V., Luse D. Histone Sin mutations promote nucleosome traversal and histone displacement by RNA polymerase II // *EMBO Rep.* 2010. Vol. 11. N 9. P. 705–710.
32. Kulaeva O., Gaykalova D., Pestov N., Golovastov V., Vassilyev D., Artsimovitch I., Studitsky V. Mechanism of chromatin remodeling and recovery during passage of RNA polymerase II // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009. Vol. 16. N 12. P. 1272–1278.
33. Sadovnichy V., Tikhonravov A., Voevodin V., Opanasenko V. “Lomonosov”: Supercomputing at Moscow State University // *Contemporary high performance computing: from petascale toward exascale* / Ed. S.V. Jeffery. Boca Raton: CRC Press, 2013. P. 283–307.

Поступила в редакцию 18.05.2020 г.

После доработки 22.06.2020 г.

Принята в печать 03.07.2020 г.

RESEARCH ARTICLE

Investigation of the effect of a single-strand break on the mechanical parameters of DNA by molecular dynamics method

O.I. Volokh, G.A. Armeev, E.S. Trifonova, O.S. Sokolova*

Department of Bioengineering, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia
*e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru

Early detection and repair of damaged DNA is important for cell functioning and survival. The recently proposed mechanism of intra-nucleosome loop formation suggests relaxation of DNA supercoiling accumulated during transcription through damaged chromatin. The degree of DNA relaxation is affected by the mechanical properties and structure of the double helix. In this paper we investigated the consequences of the introduction of a single-stranded break on the mechanical properties of a DNA fragment by molecular dynamics. It was concluded that the introduction of a single-stranded break leads to decreased stiffness and higher elasticity of the damaged DNA molecule as compared to the intact one. This, in turn, may lead to relief of the supercoiling of the defective DNA and arrest of the enzyme.

Keywords: DNA, molecular dynamics, Young modulus, single-stranded break, stiffness, elasticity

Сведения об авторах

Волох Олеся Игоревна – канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: olesyavolokh@gmail.com

Армеев Григорий Алексеевич – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: satary@yandex.ru

Трифонова Елизавета Сергеевна – инж. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: nyska57@gmail.com

Соколова Ольга Сергеевна – докт. биол. наук, доц. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru