



**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА**



Биологический факультет
Магистерская программа «Структурная биология и биотехнология»

Выпускная квалификационная работа магистра

Оптимизация пробоподготовки нуклеосом и исследование их динамики методами интегративной структурной биологии

Моторин Никита Андреевич

Научные руководители:

профессор, д. ф.-м. н., член-корреспондент РАН

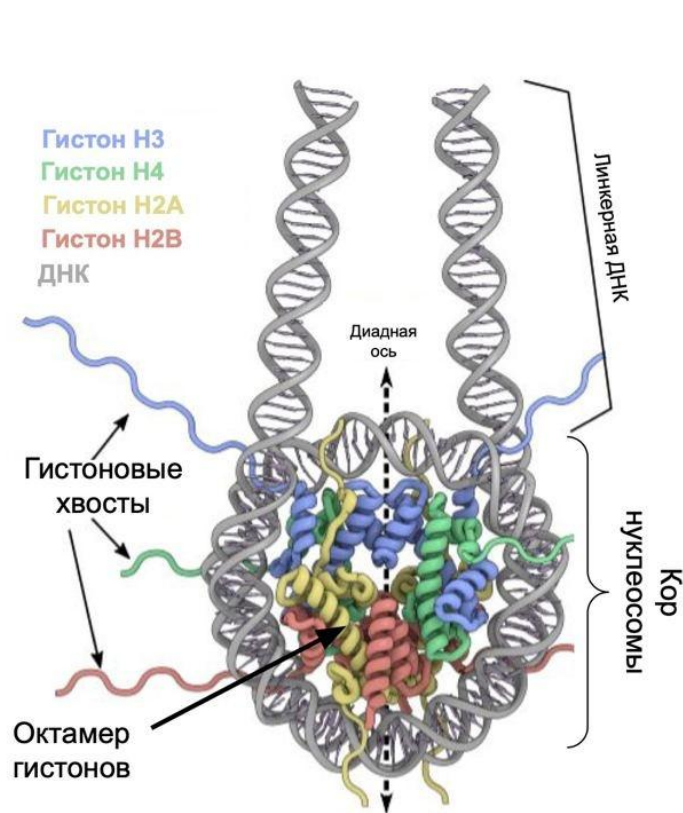
Шайтан Алексей Константинович

Ведущий научный сотрудник, к. ф.-м. н.

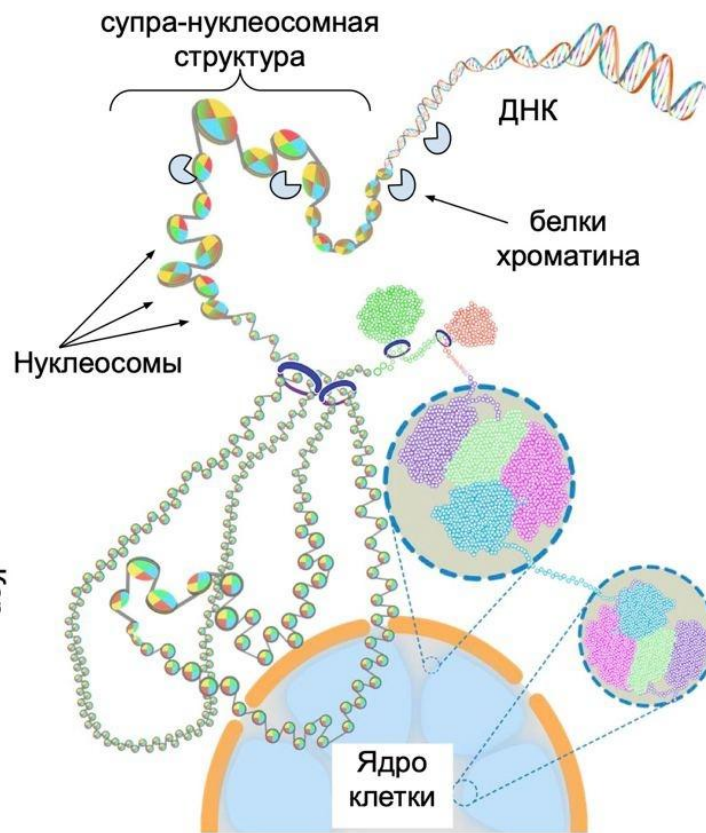
Армеев Григорий Алексеевич

Москва
2024

Объект исследования: нуклеосома



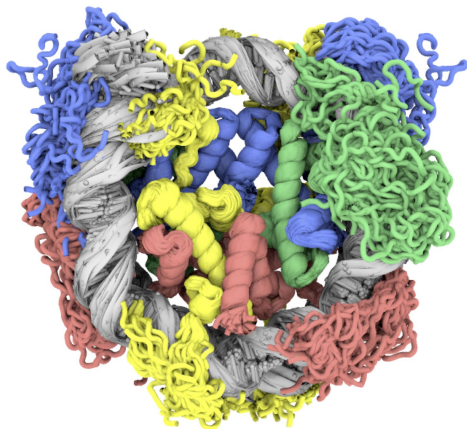
Нуклеосома



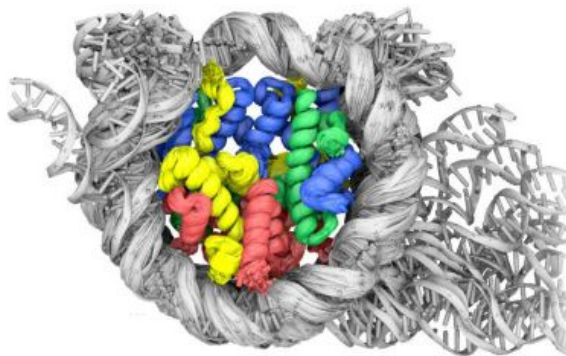
Хроматин

Динамические процессы в нуклеосомах: функциональная значимость

Динамика гистоновых хвостов



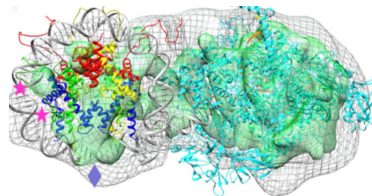
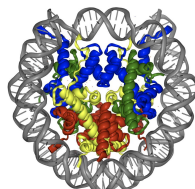
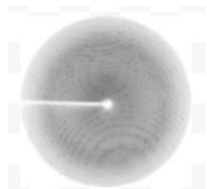
Динамика ДНК в нуклеосоме



(Armeev et al., Nat. Comm. 2021)

- Динамика нуклеосом - механизм управления работой генома
- Динамических моды связаны: динамика хвостов влияет на ДНК

Проблемы в изучении динамики нуклеосом



- Нужны комбинированные интегративные подходы: ЯМР, МД, РСА/криоЭМ

РСА - статичные структуры

(крио)ЭМ - не видит хвосты гистонов

Цель – изучение динамики хвоста гистона H3 в нуклеосомах и его влияния на откручивание ДНК

Задачи:

- 1) Анализ конформационной подвижности нуклеосом методами молекулярной динамики с использованием различных силовых полей для молекул воды.
- 2) Получение рекомбинантных нуклеосом с ДНК Widom 601 и 603 для экспериментов методами структурной биологии (ЭМ, МУРР, ЯМР).
- 3) Изучение динамики N-концевого хвоста гистона H3 методами ядерного магнитного резонанса (ЯМР) в свободном виде и в составе нуклеосомы, сопоставление результатов эксперимента с моделированием.
- 4) Изучение влияния ионной силы раствора на динамику хвоста гистона H3.

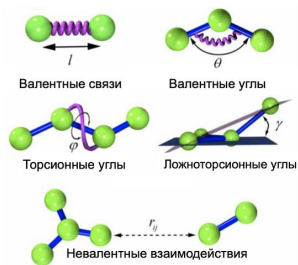
Материалы и методы

Молекулярная динамика

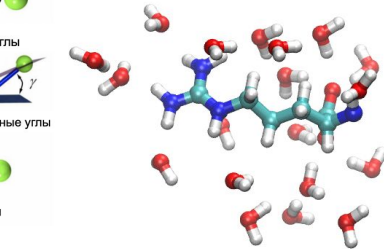
Полноатомное приближение

$$U(\{\vec{r}_i\}) = \sum_{bonds} \frac{1}{2} k_b (l - l_0)^2 + \sum_{angles} \frac{1}{2} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{torsions} \frac{1}{2} V_n [1 + \cos(n\varphi - \varphi_0)] +$$

$$\sum_{impropers} \frac{1}{2} k_\gamma (\gamma - \gamma_0)^2 + \sum_{j+1}^{N-1} \sum_{i=j+1}^N \left\{ 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right\} f_{ij}$$



Численное решение уравнений движения ($\vec{F} = m\vec{a}$)

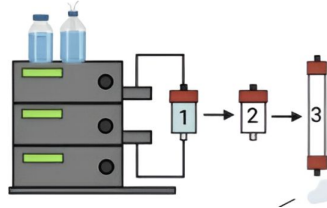


(Супер)
компьютер

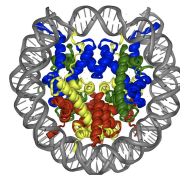


Получение in vitro МОНОНУКЛЕОСОМ

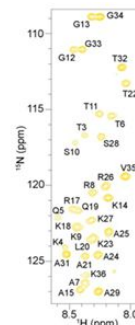
Очистка белка



Наработка ДНК



ЯМР в растворе



N15, C13 - меченные образцы
HSQC, параметры релаксации R1, R2, NOE для хвостов

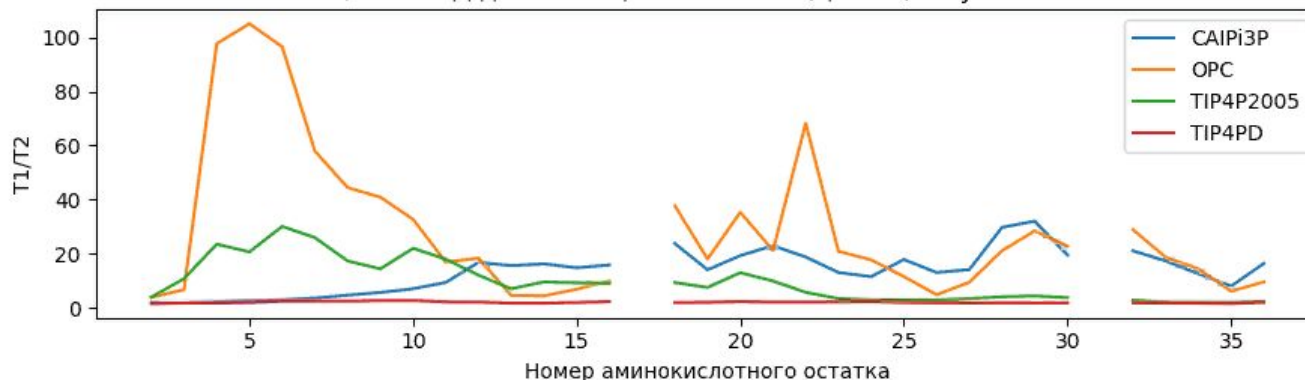
Сравнение результатов

Анализ конформационной подвижности нуклеосом методами МД в разных моделях воды

- При температуре 300 К и концентрации NaCl 150 мМ были рассчитаны параметры T1/T2 для аминокислотных остатков хвоста гистона H3 (скрипт для анализа траекторий МД предоставлен профессором Y. Peng)

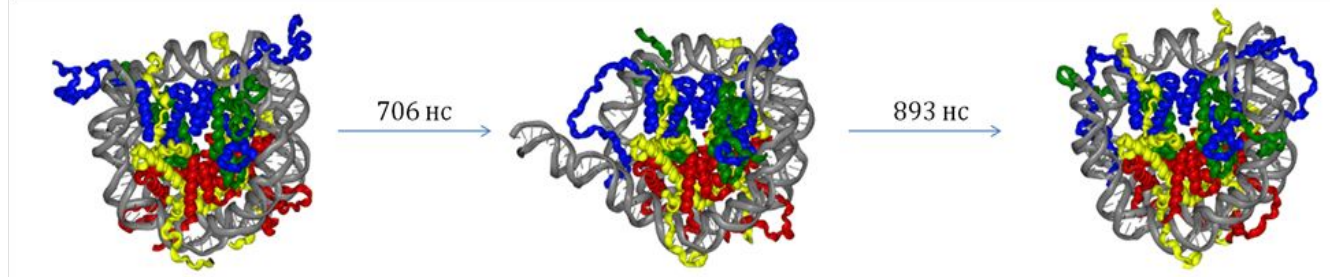
$$T1/T2=R2/R1$$

T1/T2 из МД для N-конца гистона H3 (цепь A) в нуклеосоме

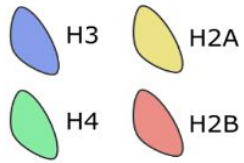


Наименьшее значение T1/T2 (наибольшая подвижность) наблюдается при моделировании с использованием модели воды TIP4P-D

- Также показано обратимое откручивание ДНК при использовании модели воды TIP4P-D на временах порядка 1 мкс

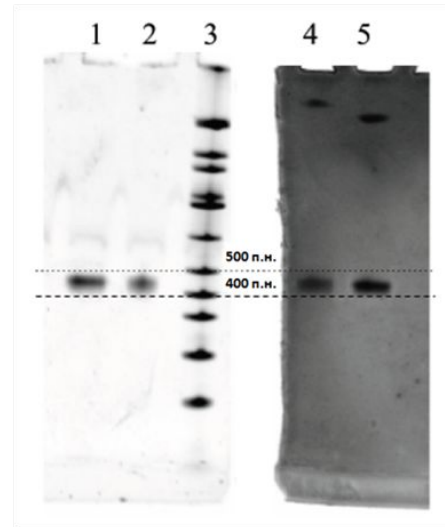
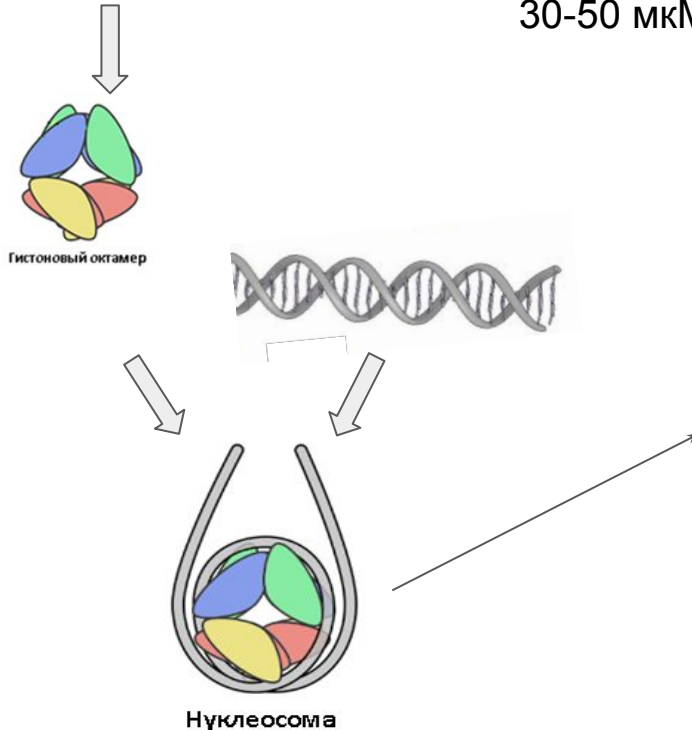


Оптимизация методов получения рекомбинантных мононуклеосом *in vitro*



Решенные задачи:

- 1) Получение не менее 3 мг каждого гистона
- 2) Получение N15, C13 меченного гистона H3
- 3) Получение моодисперсных препаратов нуклеосом в концентрации 30-50 мкМ и объемом 400 мкл



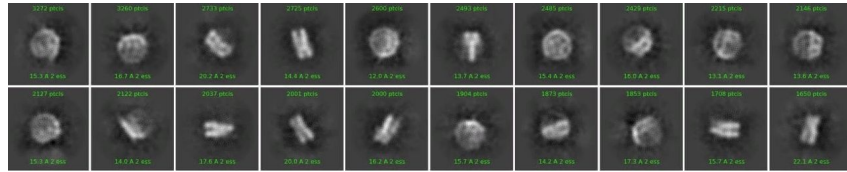
Нативный 4% ПААГ

1,5 - нуклеосомы с ДНК Widom 603, 2,4 - нуклеосомы с ДНК Widom 601, 3 – 1 kb маркер

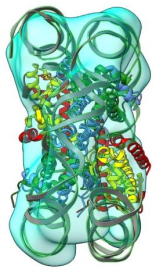
SYBR GOLD Coomassie Brilliant Blue

Исследования полученные препаратов различными методами структурной биологии

Криоэлектронная микроскопия нуклеосом с ДНК последовательности Widom 603 (сделано Моисеенко А. В.).

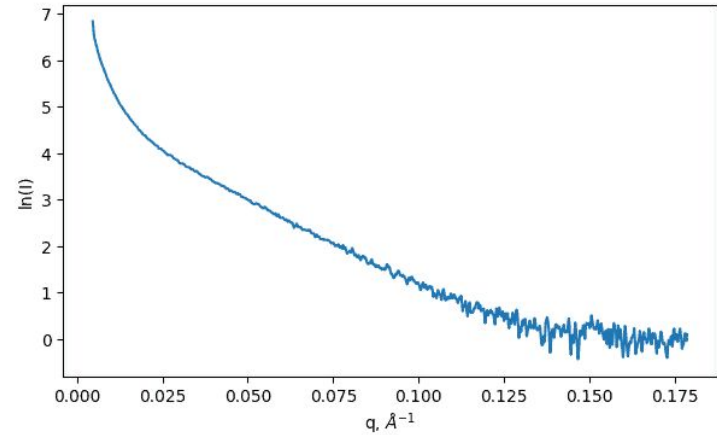


2D-классы, полученные в ходе анализа



Реконструкция структуры нуклеосомы: светлоголубым показана электронная плотность, в которую вписана структура нуклеосомы. Разрешение $\sim 10 \text{ \AA}$.

Профиль МУРР для препарат с мононуклеосомами с ДНК последовательности Widom 603

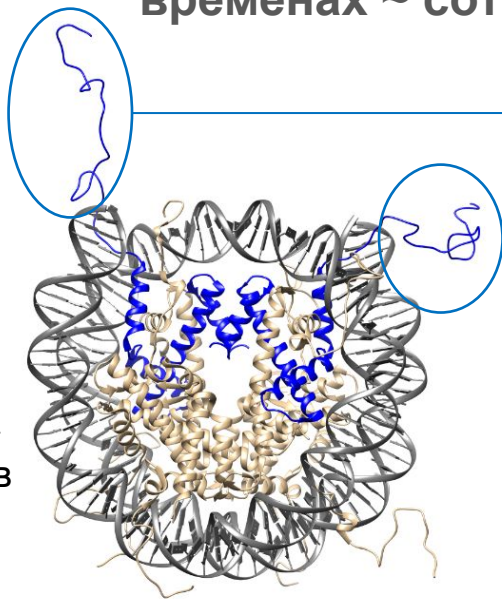


Приготовленные с использованием такой методики препараты могут быть исследованы с помощью методов структурной биологии

Изучение конформационной динамики хвоста гистона Н3 в нуклеосоме методами ЯМР-спектроскопии

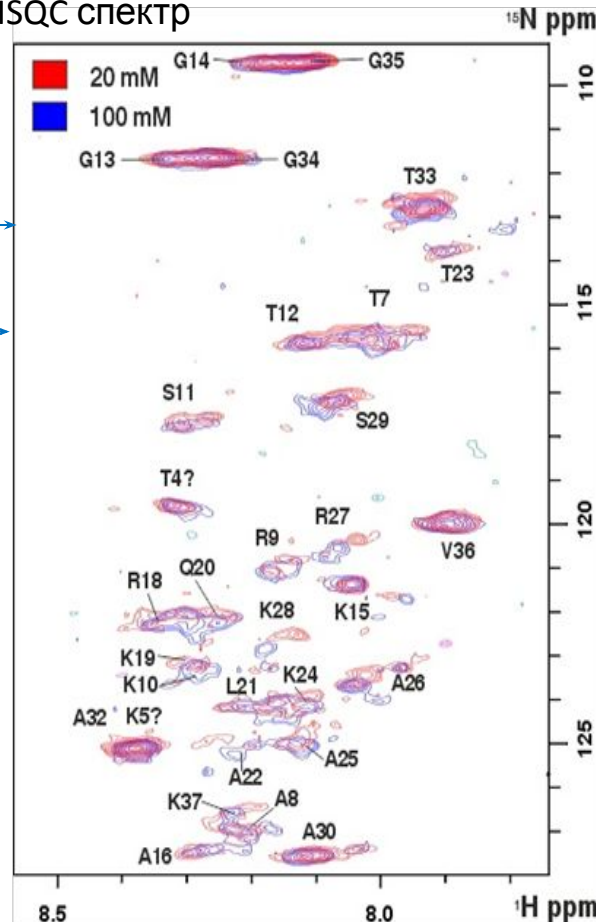
Хвосты динамичны - на временах ~ сотни нс

Нуклеосомы с ДНК Widom 601 и гистонам ^{15}N -меченым Н3 в их составе



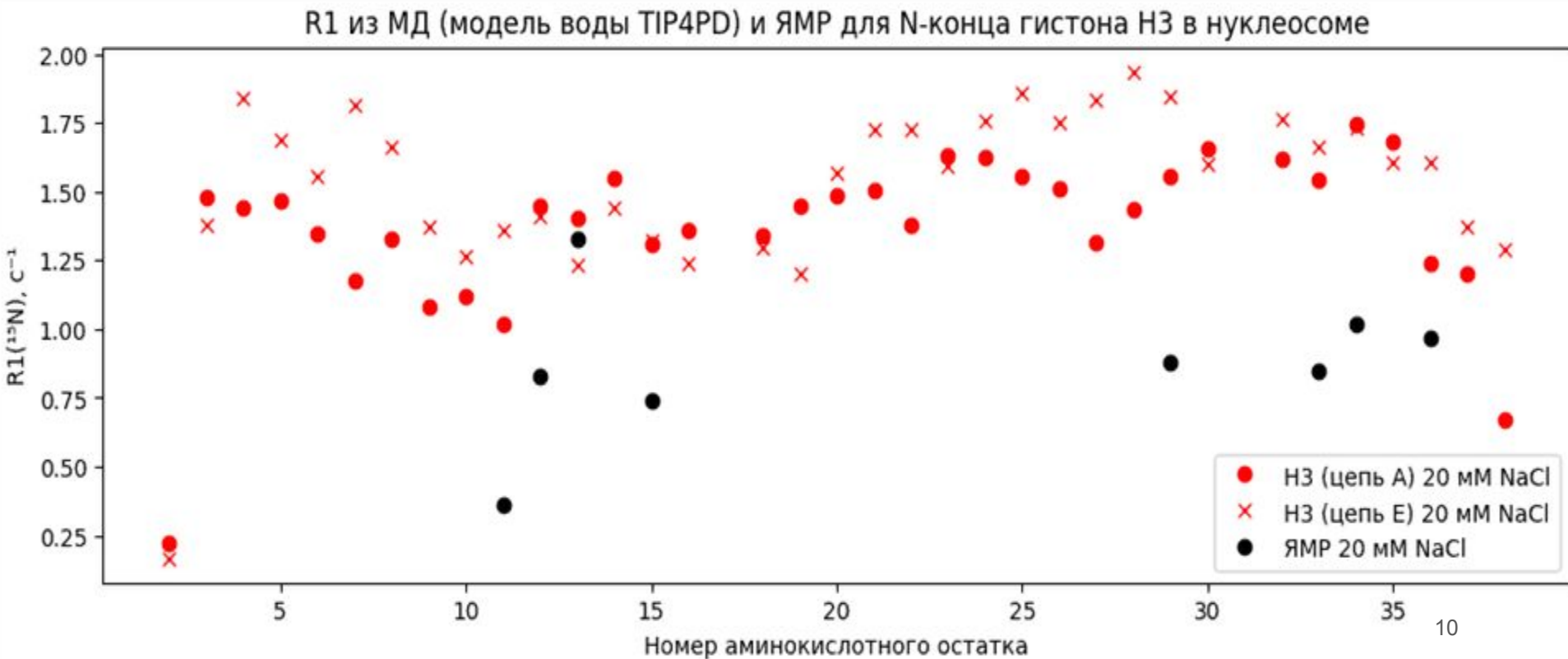
Получен спектр HSQC и проведено отнесение сигналов ЯМР для аминокислотных остатков N-конца гистона Н3.1 (при концентрации NaCl 20 и 100 mM)

HSQC спектр

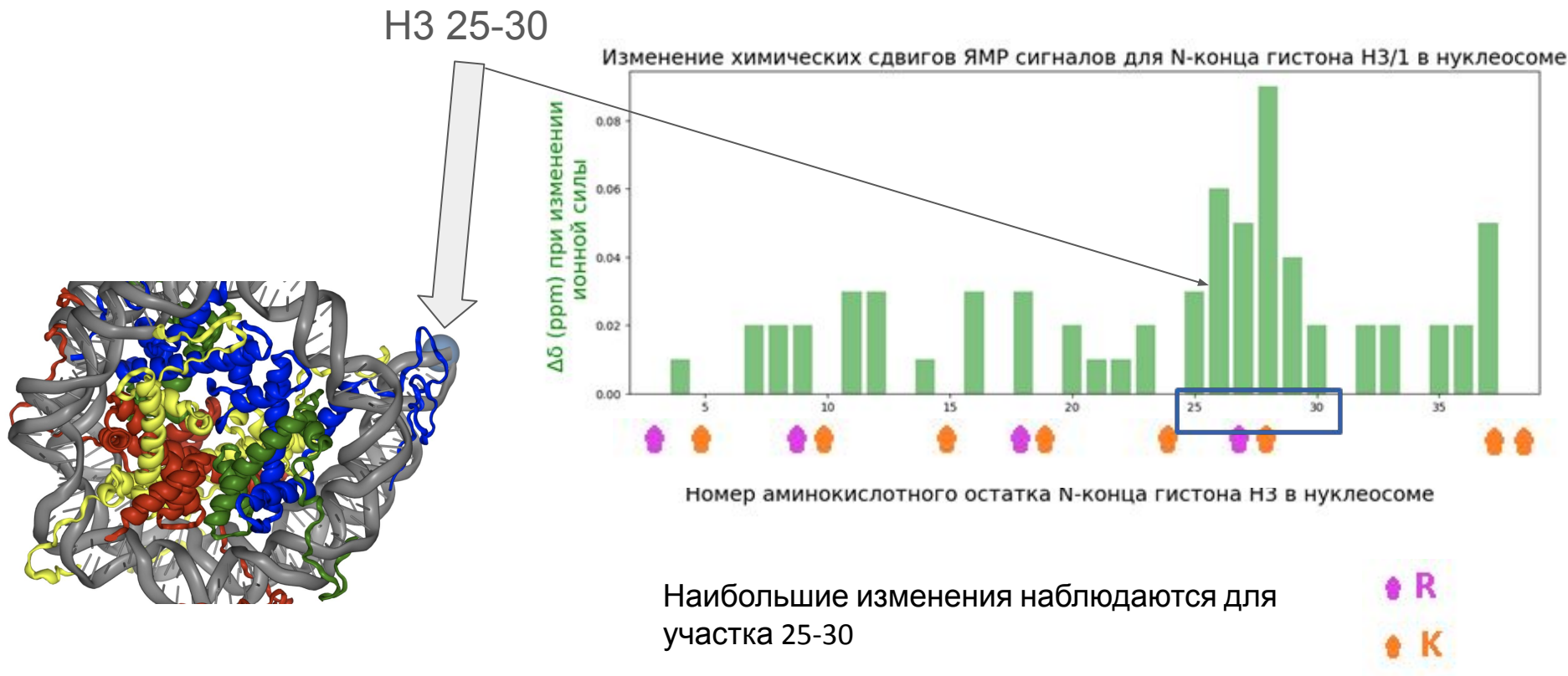


Сравнение значений R1 из молекулярной динамики и ЯМР (при 20 мМ NaCl)

Экспериментальные значения R1 занижены относительно рассчитанных из МД, возможно для лучшего совпадения значений стоит проводить более длительные расчеты.

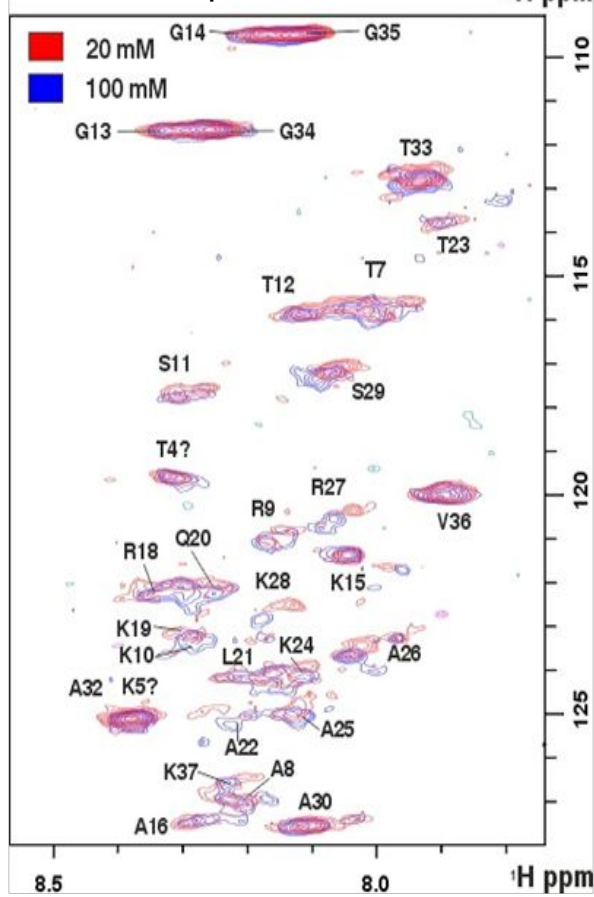


Влияние ионной силы раствора на химические сдвиги аминокислотных остатков хвоста гистона H3 в нуклеосоме

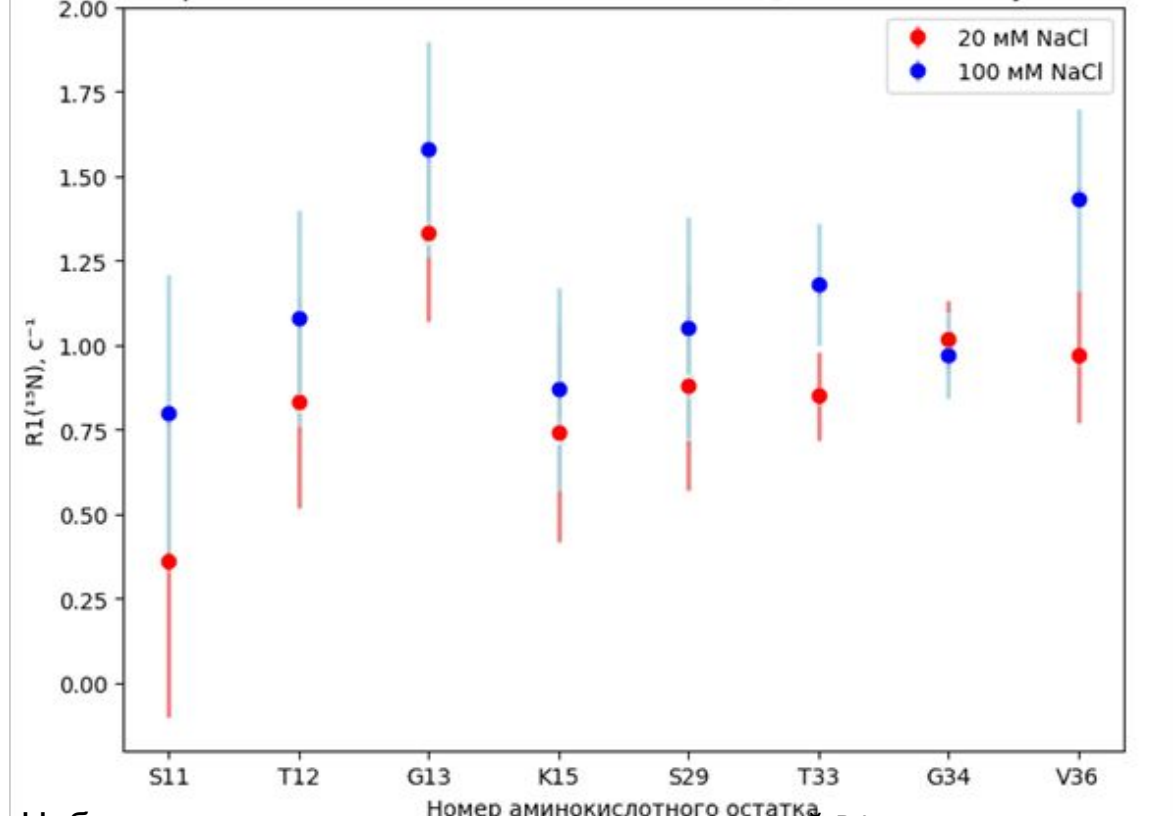


Влияние ионной силы раствора на значения R1 аминокислотных остатков хвоста гистона H3 в нуклеосоме

HSQC спектр

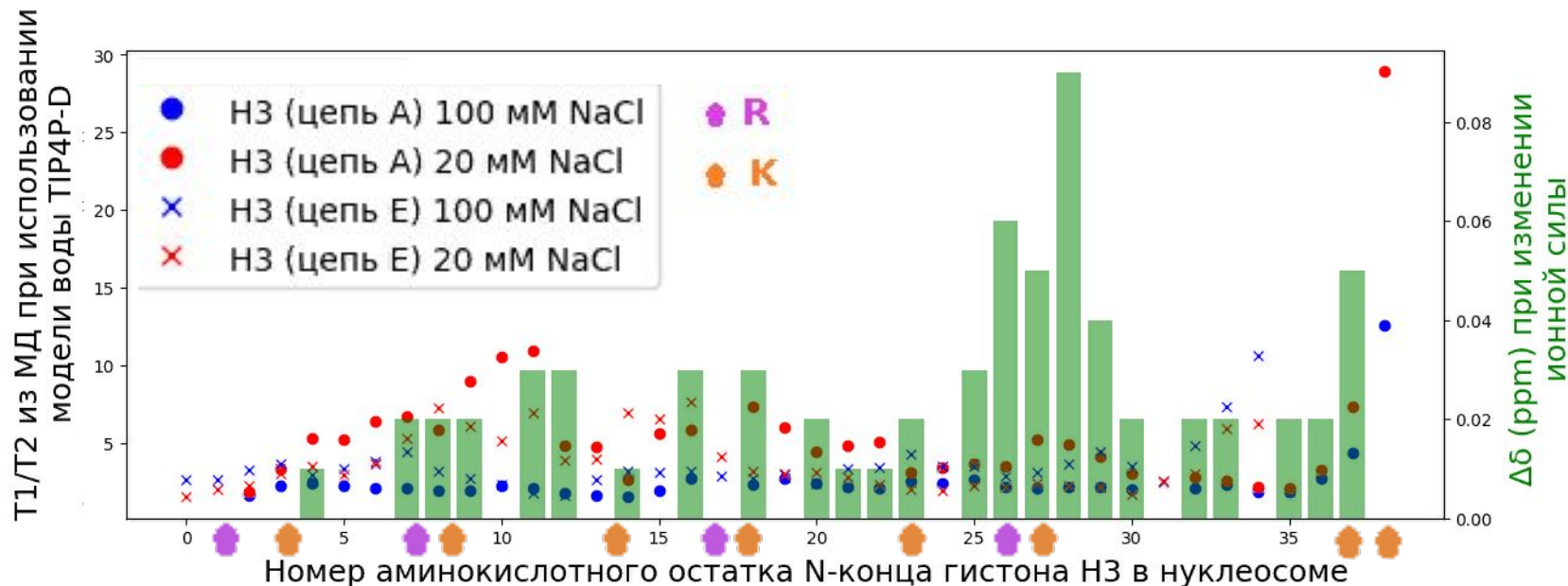


R1 выбранных аминокислотных остатков N-конца гистона H3 в нуклеосоме



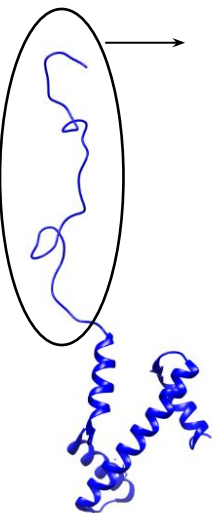
Наблюдается тенденция увеличения значений R_1 при увеличении значения ионной силы раствора

Влияние ионной силы раствора на значения T1/T2 и химические сдвиги аминокислотных остатков хвоста гистона H3 в нуклеосоме (МД и ЯМР анализ)

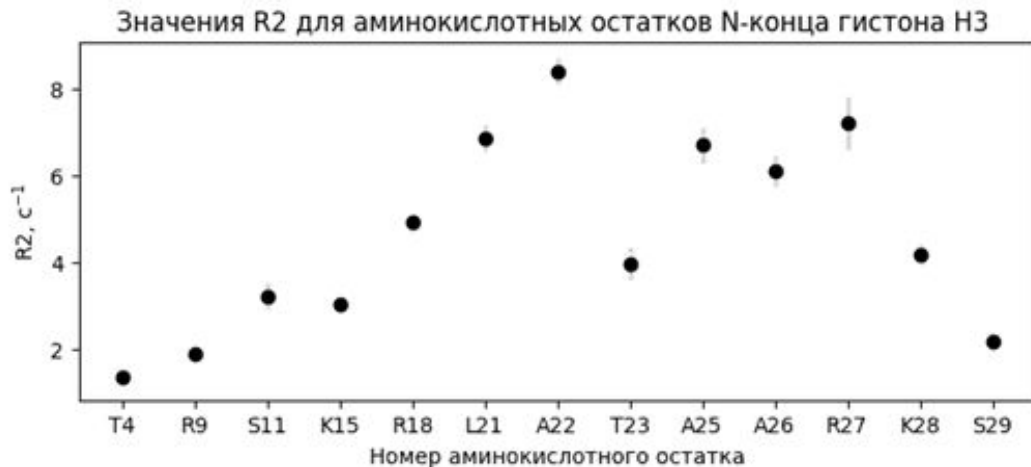
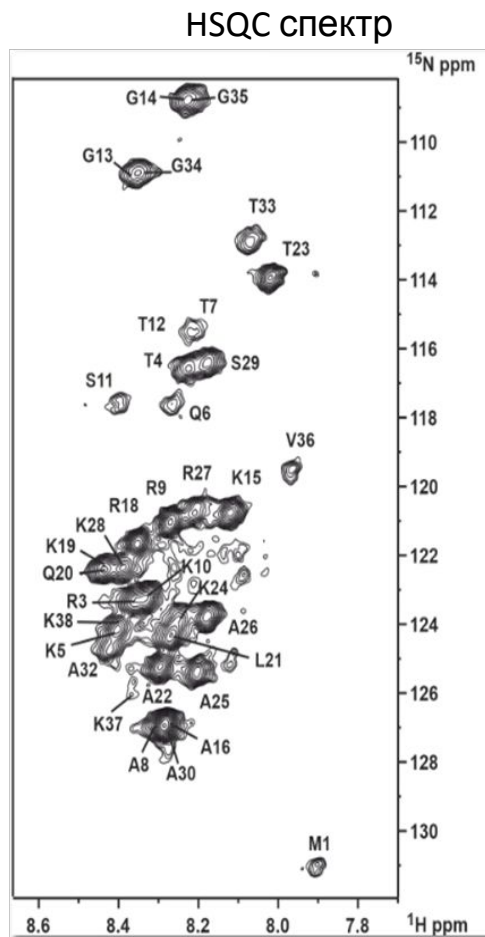


- Ионная сила раствора сильнее всего влияет на подвижность (T1/T2 из МД расчетов) в которых присутствуют аминокислотные остатки аргининов. Может быть связано с спецификой взаимодействия аргининов с малой бороздкой ДНК.
- Ионная сила раствора сильнее всего влияет на химическое окружение участка 25-30 (из данных ЯМР).

Изучение структуры и динамики свободного гистона Н3 методами ЯМР-спектроскопии

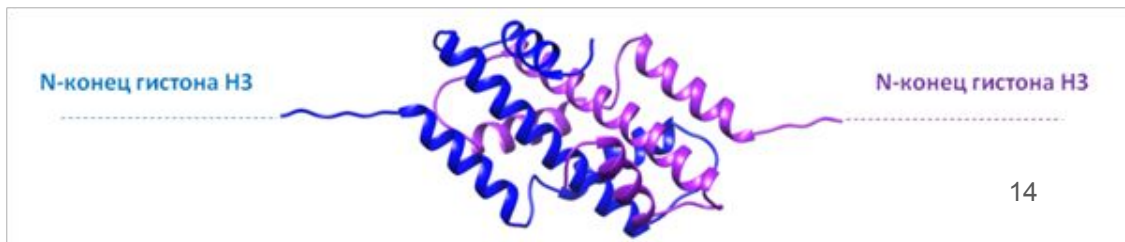


^{15}N ^{13}C -
меченый
свободный
гистон Н3.1



Наблюдаются ЯМР-сигналы только от N-концевой части Н3.1 гистона, подвижность как у свободного пептида.

Вероятно, формируются **олигомеры Н3.1**, в основе которых может лежать димер Н3.1-Н3.1, структура которого предсказана программой AlphaFold2:



Выводы

- 1) Нуклеосомы на основе рекомбинантных гистонов человека (в том числе изотопно-меченных) и позиционирующих последовательностей ДНК Widom 601 и 603 могут быть получены *in vitro* в концентрации до 35 мкМ, что позволяет исследовать их структуру и динамику методами ЭМ, МУРР, ЯМР.
- 2) В ходе моделирования методами молекулярной динамики показано, что наблюдаемая подвижность гистоновых хвостов и ДНК зависит от используемых моделей воды. Модель воды TIP4P-D обеспечивает наиболее быструю динамику хвоста гистона H3. Использование модели воды TIP4P-D позволяет промоделировать откручивание и прикручивание ДНК в нуклеосоме опосредуемое хвостом гистона H3 на микросекундных временах.
- 3) С помощью методов ЯМР-спектроскопии показано, что свободный гистон H3.1, возможно, формирует гомоолигомеры, в которых его N-конец сохраняет высокую подвижность.
- 4) С помощью методов ЯМР-спектроскопии и молекулярной динамики показаны участки N-конца гистона H3, конформационная динамика которых наиболее чувствительна к изменению ионной силы раствора.

Спасибо за внимание!

Благодарности

д.ф.-м.н., чл.-корр. РАН **Алексей Константинович Шайтан**
к.ф.м.н. **Григорий Алексеевич Армеев**

Группа интегративной биологии
Анастасия Федулова



ИБХ РАН

д.ф.-м.н. **Захар Олегович Шенкарев**
к.б.н. **Александр Сергеевич Парамонов**
Павел Миронов
д.б.н. **Екатерина Назымовна Люкманова**



Лаборатория регуляции транскрипции репликации (рук. проф. В.М. Студитский)
Дмитрий Афонин

Лаборатория структурной биотехнологии (рук. проф. О.С. Соколова)
Андрей Владимирович Моисеенко
к.б.н. **Григорий Сергеевич Глухов**

Central China Normal University
Prof. Yunhui Peng

Shenzhen MSU-BIT University
Prof. Xiangyan Shi



Преподаватели программы “Структурная биология и биотехнология”

Коллектив кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ

Использованные гистоны и ДНК

Название нуклеосомной ДНК	Последовательность ДНК
Widom 601	ATCAGAATCCCGGTGCCGAGGCCGCTCAATTGGT CGTAGACAGCTCTAGCACCGCTTAAACGCACGTA CGCGCTGTCCCCGCGTTTTAACCGCCAAGGGGA TTACTCCCTAGTCTCCAGGCACGTGTCAATATAT ACATCGAT
Widom 603	ATCAGTTCGCGCGCCCACTACCGTGTGAAGTCGT CACTCGGGCTTCTAAGTACGCTTAGGCCACGGTA GAGGGCAATCCAAGGCTAACCACCGTGCATCGAT GTTGAAAGAGGCCCTCCGTCTATTACTTCAAGT CCCTGGGAT

Название гистона	Аминокислотная последовательность	Молекулярная масса (кДа)
H2A	MSGRGKQGGKARAKAKTRSSRAGLOFPVGRVHRLLR KGNYSERVGAGAPVYLAHVLELTAEILELAGNAARD NKKTRIIPRHLQLAIRNDEELNKLGRVTIAOGGVLPNI QAVLLPKKTESHKAKGK	14.14
H2B	MPEPAKSAPAPKKGSKKAVTKAQKKDGKKRKRSRKE SYSVVYVKVLKQVHPDTGISSKAMGIMNSFVNDIFERI AGEASRLAHYNKRSTITSREIQTAVRLLLPGLAKHAVS EGTKAVTKYTSK	13.89
H3.1	MARTKQTARKSTGGKAPRQLATKAARKSAPATGGV KKPHRYRPGTVALREIRRYQKSTELLIRKLPFQRLVREIA QDFKTDLRFOSSAVMALQEACEAYLVGLFEDTNLCAI HAKRVTIMPKDIQLARRIRGERA	15.40
H4	MSGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLRDNIQGITKPAIR RLARRGGVKRISGLIYEETRGVLKVFLENVIRDAVITYTE HAKRKTVTAMDVVYALKRQGRITLYGFEGG	11.37

Последовательность Widom 601 (145 п.н.) – однозначно позиционируемая и наиболее изученная последовательность с высоким сродством к кору гистонов (Bondarenko et al., 2006).

Последовательность Widom 603 (147 п.н.) – последовательность, через которую может происходить транскрипция, но также имеющее высокое сродство к кору гистонов (Bondarenko et al., 2006).

Сиквенсы очень отличаются (Lowary and Widom, 1998).

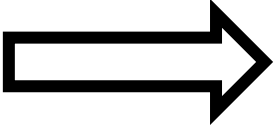
Оптимизация методов получения рекомбинантных мономерных нуклеосом *in vitro*

Наработка плазмид с кассетой из 8 копий нуклеосомной ДНК (Widom 601 / Widom 603). Копии разделены сайтами рестриктазы EcoR V. Рестрикция и очистка нуклеосомной ДНК.




ДНК (Widom 601 / Widom 603)

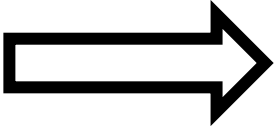
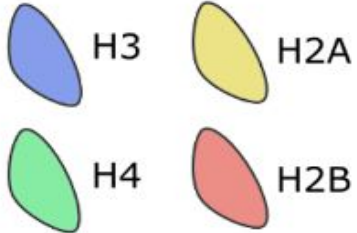
+



Снижение ионной силы раствора



Нуклеосома

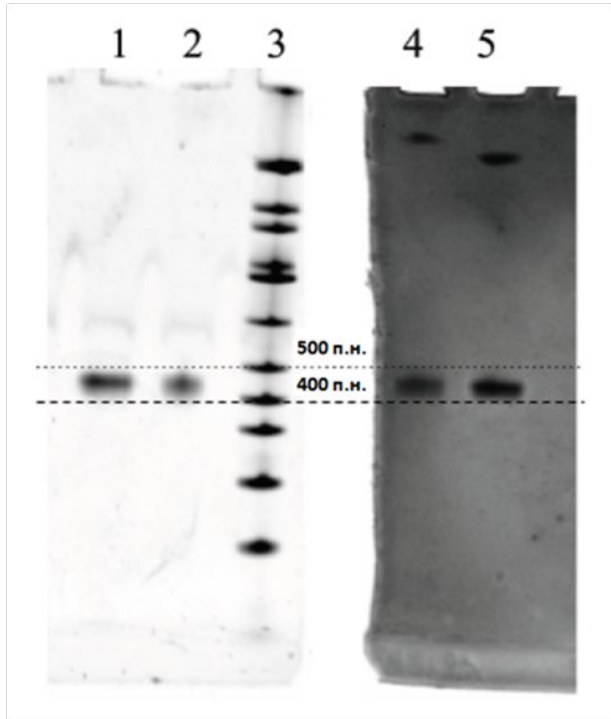


Гистоновый октамер

Наработка и очистка гистонов с помощью ионообменной хроматографии.

Сборка и очистка гистонического октамера с помощью гель-фильтрационной хроматографии.

Контроль качества гистоновых октамеров и нуклеосомной ДНК



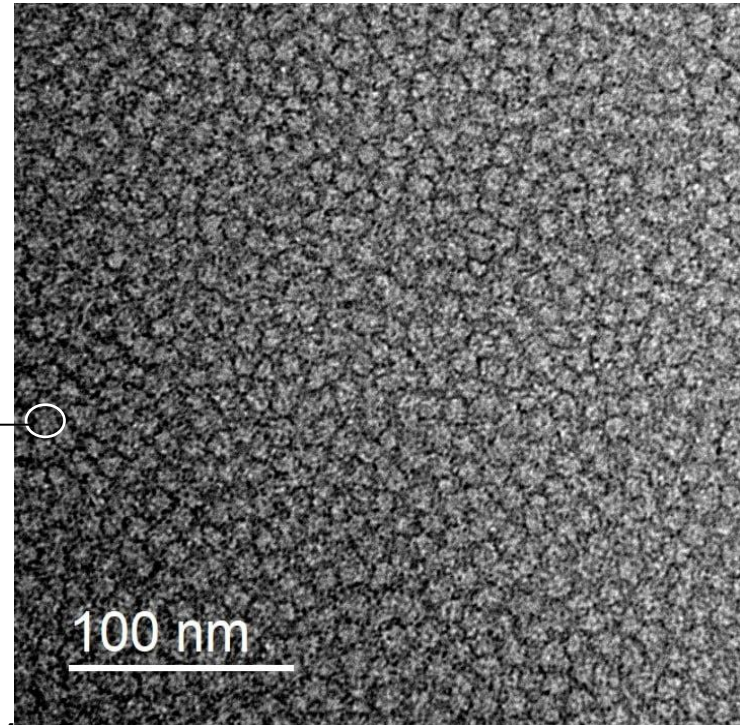
SYBR GOLD

Coomassie Brilliant Blue

Нативный 4% ПААГ

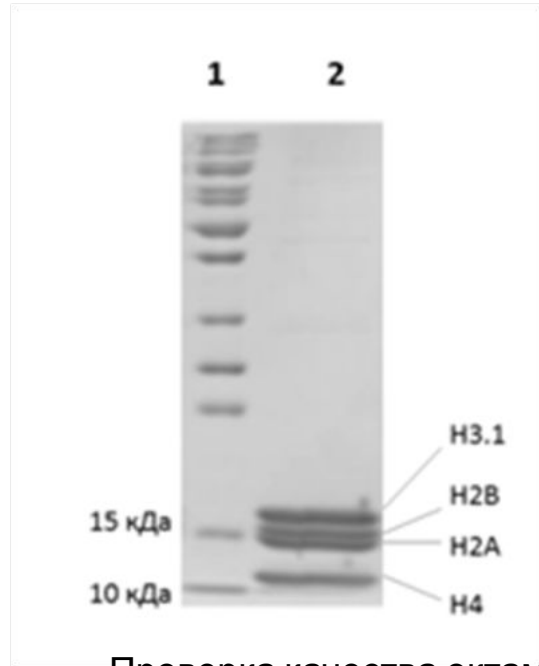
1,5 - нуклеосомы с ДНК Widom 603, 2,4 - нуклеосомы с ДНК Widom 601, 3 - 1 kb маркер

Диаметр
~10 нм



Изображение нуклеосом, полученное методом электронной просвечивающей микроскопии с негативным контрастированием (для нуклеосом с 601 Widom последовательностью) - изображение

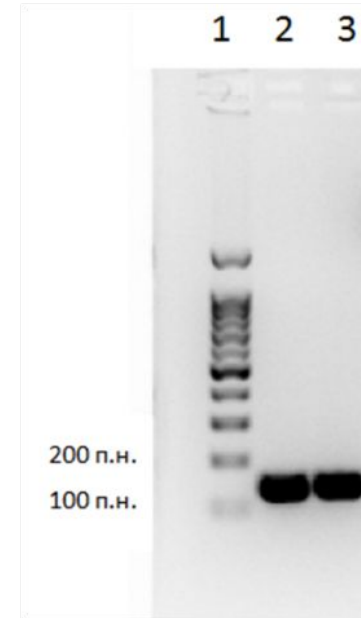
Контроль качества гистоновых октамеров и нуклеосомной ДНК



Проверка качества октамеров.

18% ДСН-ПААГ.

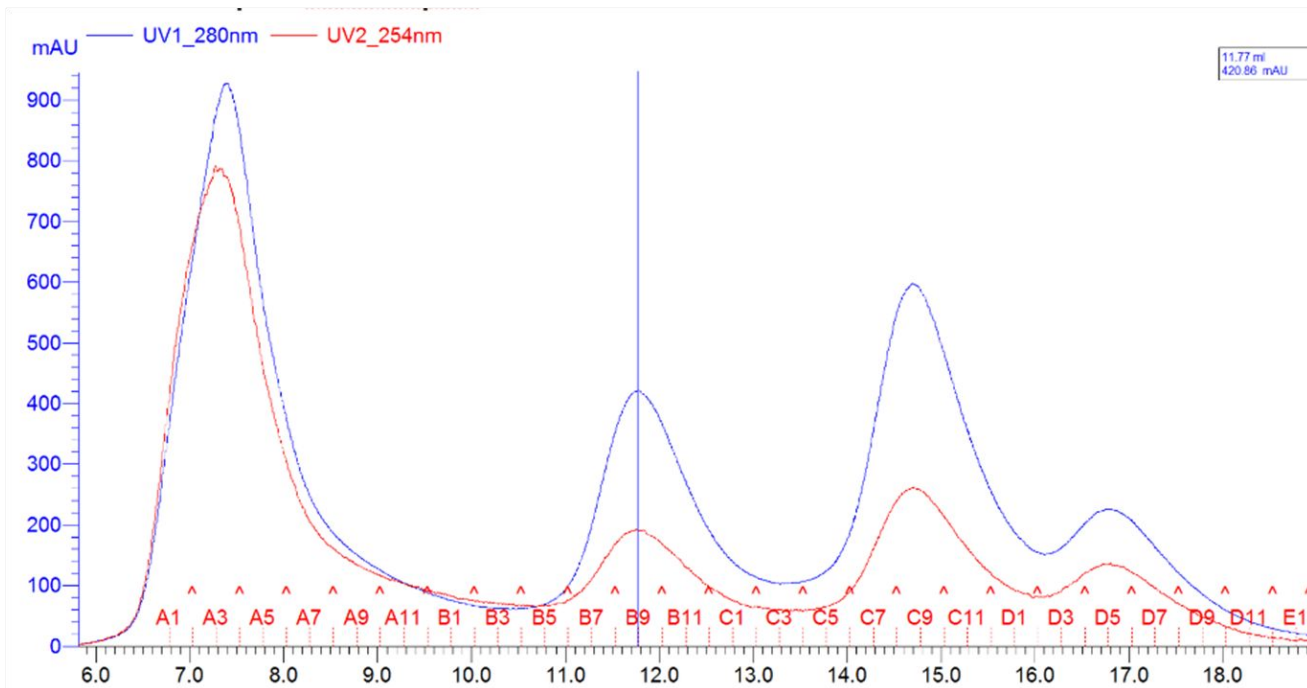
1 – маркер, 2 – фракция очищенных октамеров



Проверка качества нуклеосомной ДНК.

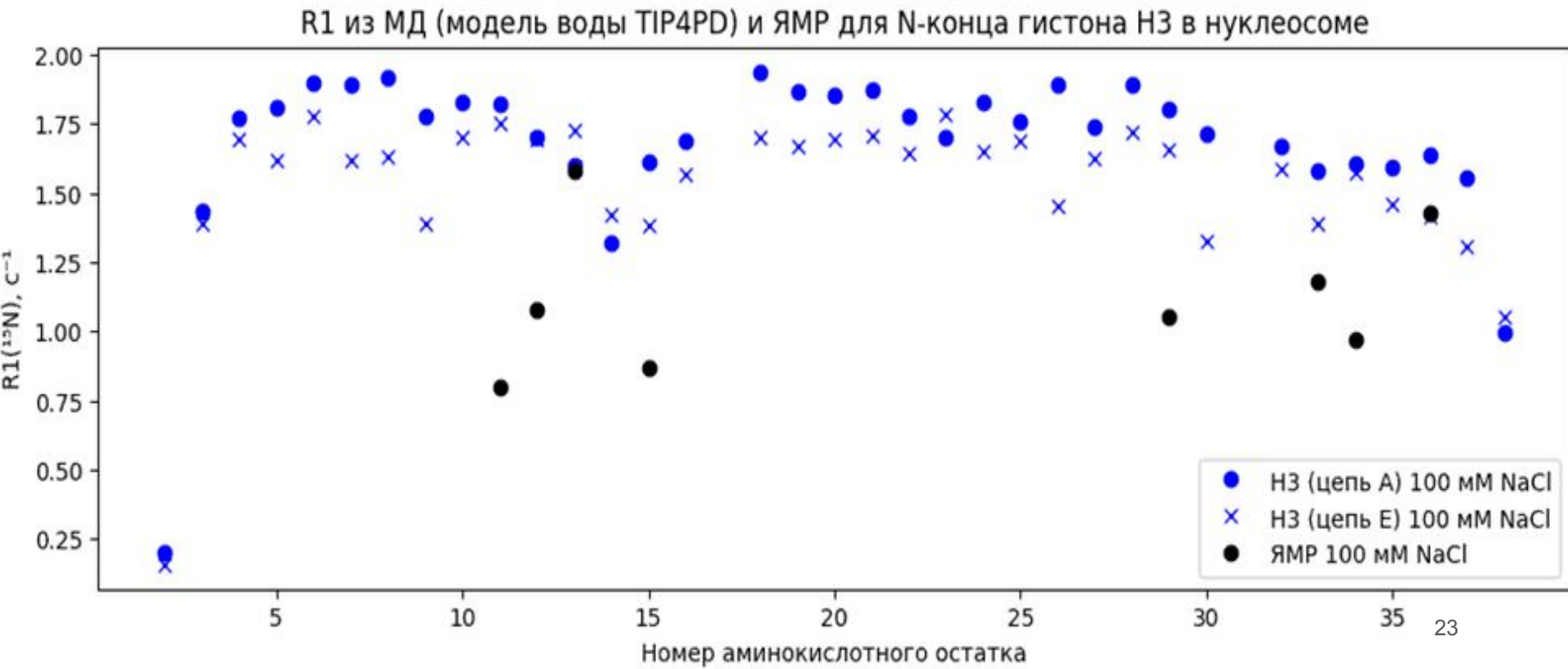
Гель 2% агароза ТАЕ-буфер. 1- ДНК-маркер 100 bp, 2 – очищенная нуклеосомная ДНК Widom 601, 3 – очищенная нуклеосомная ДНК Widom 603

Очистка октамеров гистонов (гель-фильтрационная колонка Superdex 200 16/60)

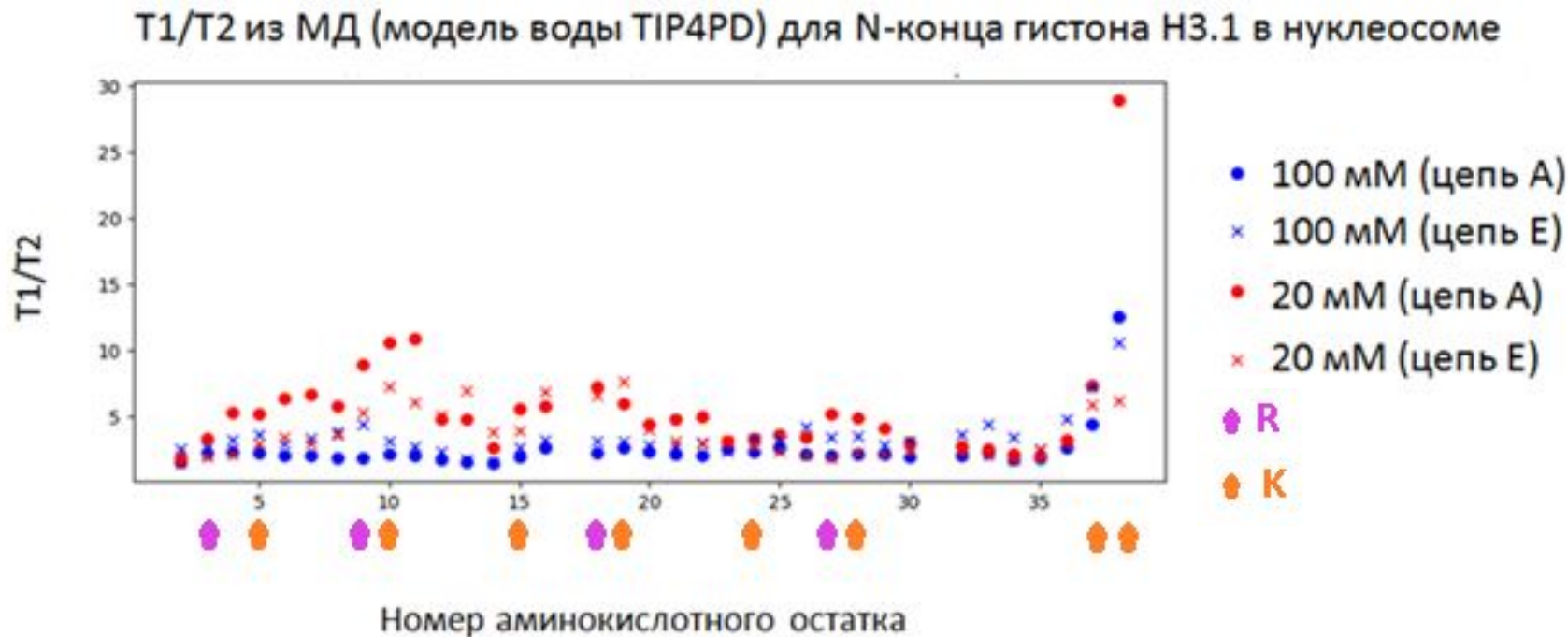


Сравнение значений R1 из молекулярной динамики и ЯМР (при 100 мМ NaCl)

Экспериментальные значения R1 занижены относительно рассчитанных из МД, возможно для лучшего совпадения значений стоит проводить более длительные расчеты.



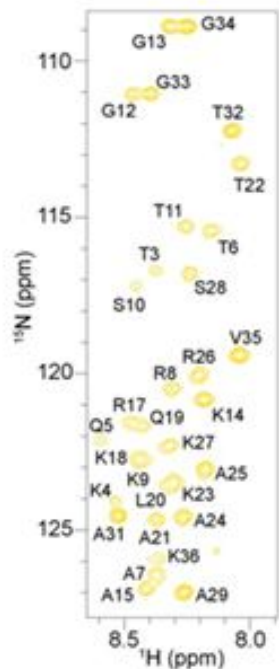
Влияние ионной силы раствора на значения T_1/T_2 для аминокислотных остатков хвоста гистона H3 в нуклеосоме (из МД)



Ионная сила раствора сильнее всего влияет на подвижность (участков, в которых присутствуют аминокислотные остатки аргининов).

Изучение динамики неупорядоченных гистоновых хвостов

Методы ЯМР



Методы молекулярной динамики

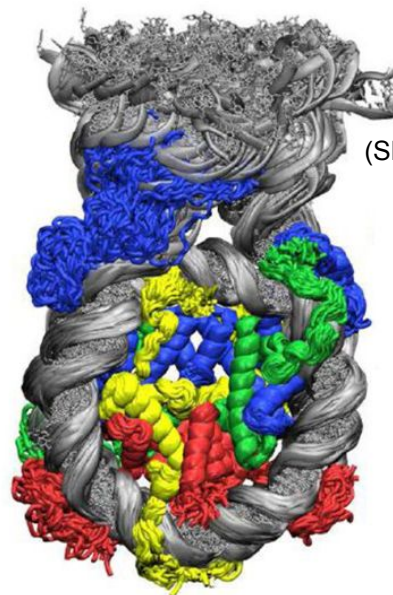
R1

R2

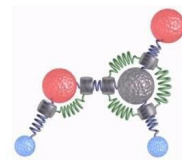
R2/R1

Параметры, описывающие динамику

(Morrison et al., 2018)



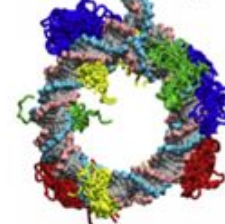
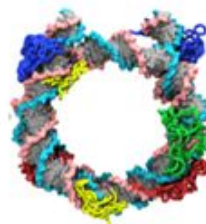
(Shaytan et al. J Mol Biol, 2015)



TIP3P



OPC



Shaytan et al., JMB, 2016

Peng et al., NatCom, 2021