

Московский государственный университет имени
М.В.Ломоносова
Биологический факультет
Кафедра биоинженерии



Выпускная квалификационная работа бакалавра

Изучение динамики гистонов и влияния
посттрансляционных модификаций методами молекулярной
динамики с использованием различных моделей воды

Выполнила студентка IV курса
ШАРЯФЕТДИНОВА АЛЕКСАНДРА СЕРГЕЕВНА

Научные руководители:

канд. физ.-мат. наук,
вед. научн. сотр. кафедры биоинженерии

Армеев Григорий Алексеевич,

асп. второго г.о. кафедры биоинженерии

Князева Анастасия Сергеевна

Москва

2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	4
1.1. Структура нуклеосом и гистоновых хвостов и их взаимодействие с ДНК	4
1.2. Экспериментальные методы исследования нуклеосом	7
1.3. Исследование гистоновых хвостов методами молекулярной динамики	10
1.4. Посттрансляционные модификации гистоновых хвостов и их влияние на функции нуклеосом	17
2. МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ	21
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	23
3.1. Оценка изменения молекулярной динамики в разных типах воды: TIP3P и OPC	23
3.2. Оценка изменения молекулярной динамики при внесении посттрансляционных модификаций	37
4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	45
5. ВЫВОДЫ	45
6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	47

ВВЕДЕНИЕ

Нуклеосома – структурная единица упаковки ДНК в клетке. Она представляет белковый октамер, вокруг которого обернуто около 147 пар нуклеотидов ДНК. В состав октамера входят по две пары белков - гистонов: H2A, H2B, H3 и H4, каждый из которых имеет на концах неупорядоченные последовательности – гистоновые хвосты. Их взаимодействие с ДНК носит электростатический характер. Гистоновые хвосты принимают участие в таких важных процессах как раскручивание ДНК при транскрипции генов, проскальзывание ДНК, обеспечение термодинамической стабильности нуклеосомы, взаимодействие с факторами хроматина и другие. Такой широкий спектр функций гистоновых хвостов обеспечивается за счет наличия гистоновых вариантов, в которых последовательность аминокислот отличается от канонической, в том числе в хвостовой части, и за счет посттрансляционных модификаций (ПТМ). На данный момент существует проблема в изучении неупорядоченных белковых структур, так как их нельзя исследовать с помощью электронной микроскопии (ЭМ) и рентгеноструктурного анализа (РСА), поэтому применяются такие методы, как ядерно-магнитный резонанс (ЯМР) и молекулярная динамика (МД). Сложность изучения неупорядоченных структур с помощью МД заключается в ориентированности классических методов МД на моделирование глобулярных белков и неточность в моделировании неупорядоченных. Также существует широкий диапазон ПТМ, которые не параметризованы в силовых полях. В данной работе будет изучаться динамика гистонов, в том числе гистоновых хвостов, с точки зрения влияния модели воды и ПТМ.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Структура нуклеосом и гистоновых хвостов и их взаимодействие с ДНК

Генетическая информация в клетках высших эукариот заключена в молекуле ДНК, которая в комплексе с РНК и белками находится в виде хроматина в ядре эукариот. Хроматин иерархически организован в ядре, то есть имеет несколько уровней компактизации (рис. 1А) [21].

Нуклеосома – первый уровень компактизации хроматина. Она образована октамером гистонов и обернутой вокруг него ДНК. Октамер образован двумя типами димеров (Н2А-Н2В и Н3-Н4), которые, в свою очередь, состоят из четырех типов гистонов (Н2А, Н2В, Н3, Н4). Как видно из кристаллографических исследований, ~ 145-147 пар оснований ДНК огибают октамер в ~ 1,7 витках левосторонней суперспирали, образуя нуклеосому (рис. 1Б).

Все гистоны содержат N-концевые хвостовые сегменты (гистон Н2А имеет N- и C-концевые хвостовые сегменты) – гистоновые хвосты, насчитывающие от десятка до нескольких десятков остатков. Хвосты гистонов богаты положительно заряженными аминокислотами, особенно лизинами; некоторые также включают несколько остатков глицина. Гистоновые хвосты являются неупорядоченными структурами, что согласуется с их аминокислотным составом. Также было обнаружено, что гистоновые хвосты могут взаимодействовать с отрицательно заряженной ДНК. Эти взаимодействия носят электростатический характер и могут быть уменьшены за счет нейтрализации заряда хвоста, то есть за счет модификаций остатков лизина (Lys) и аргинина (Arg), или просто за счет повышения ионной силы раствора [18]. Многочисленные экспериментальные данные указывают на то, что гистоновые хвосты в растворе остаются неупорядоченными и поддерживают незначительную связь с нуклеосомной ДНК [5].

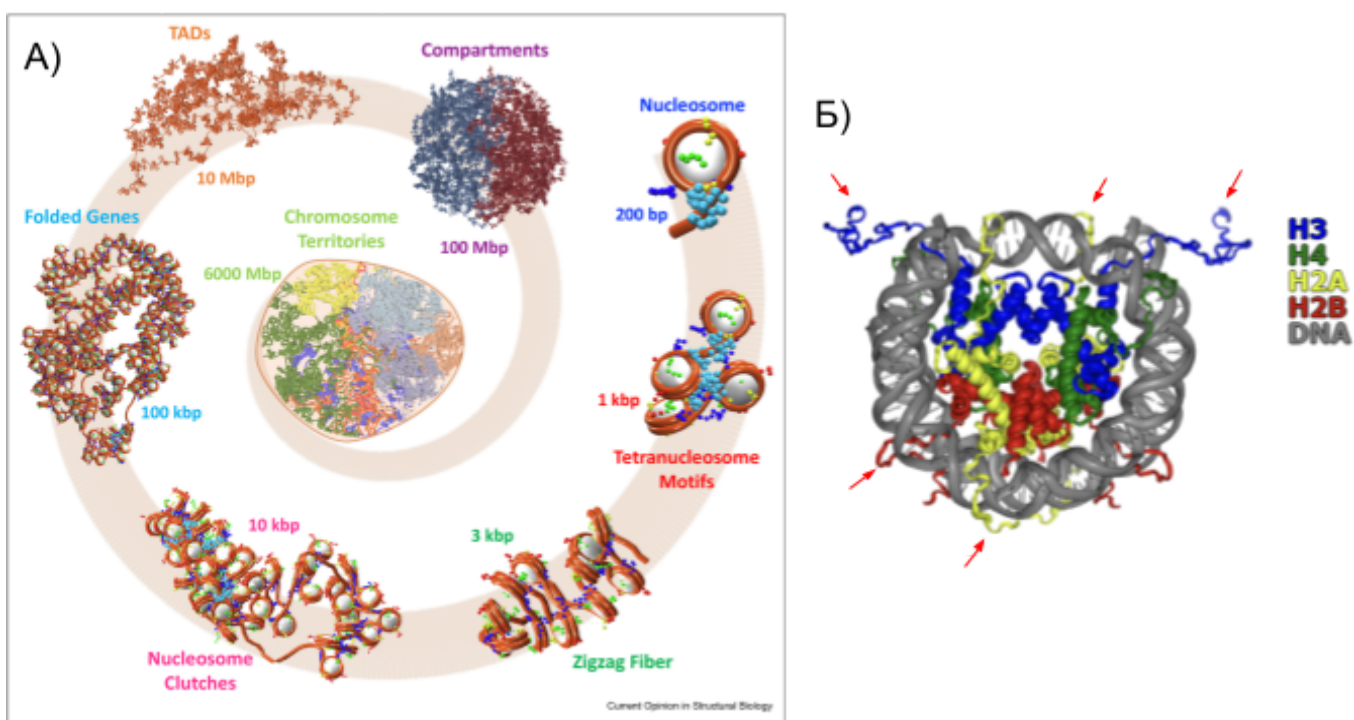


Рисунок 1. А) Современное представление об организации структуры хроматина [21], Б) Структура нуклеосомы. Типы гистонов и ДНК показаны цветом в соответствии с легендой. Красными стрелочками показаны некоторые из гистоновых хвостов. (PDB ID 1KX5) (Luger et al., 1997).

Согласно последним данным, важную роль во взаимодействии ДНК и гистоновых хвостов играют так называемые кратковременные электростатические взаимодействия (fuzzy interactions [5]). Данные взаимодействия характеризуются возникновением нестабильных и недолгоживущих водородных связей и солевых мостиков между аминокислотными остатками гистонов и ДНК. Было высказано предположение, что такие взаимодействия могут способствовать быстрому сигналингу в хроматине. Механизм осуществления такого сигналинга не до конца изучен, но предполагается, что он происходит за счет кратковременных электростатических взаимодействий между гистоновыми хвостами и ДНК. Хвосты минимизируют потерю конформационной энтропии при связывании с отрицательно заряженными молекулами, что способствует присоединению гистон модифицирующих ферментов к сайтам ПТМ и формированию комплексов белков при участии гистоновых хвостов. [4].

Также гистоновые хвосты могут подвергаться конформационным переходам из неупорядоченного состояния в упорядоченное (disorder–order transition). Это может обеспечивать пространственную кластеризацию аминокислотных остатков (например, скопление положительно заряженных аминокислотных остатков на одной стороне сформированной альфа-спирали хвоста гистона H1, что способствует его связыванию с ДНК). Также хвосты могут принимать разные стабильные конформации во время связывания с различными партнерами, формировать сигнал и осуществлять аллостерическую передачу (аллостерическая регуляция факторов хроматина) [4].

Многообразие функциональных активностей гистонов увеличивается за счет внесения посттрансляционных модификаций в их аминокислотную последовательность и за счет наличия гистоновых вариантов, которыми заменяются канонические гистоны. По сравнению с каноническими гистонами варианты гистонов могут иметь ряд различий в последовательностях. Замены вариантов гистонов могут изменить множественные ДНК-гистоновые и гистон-гистоновые взаимодействия одновременно, что влияет на изменение характеристик одиночных нуклеосом и хроматиновых фибрилл. Варианты гистонов также могут подвергаться ПТМ, что может обеспечивать уникальные эффекты, которые гистоновые варианты оказывают на динамику нуклеосом.

На данный момент исследование гистоновых хвостов является одной из важнейших задач, так как они играют ключевую роль в таких биологических процессах, как экспрессия генов и транскрипция. Далее будут рассмотрены основные методы структурной биологии в контексте применения к исследованию гистоновых хвостов.

Экспериментальные методы исследования нуклеосом

Рентгеноструктурный анализ

Рентгеноструктурный анализ (РСА) - один из способов экспериментального определения атомной и пространственной структуры молекул, в основе которого лежит дифракция рентгеновских лучей. Из данных рентгенограммы получают карту распределения электронной плотности, из чего затем определяют положения атомов в исследуемом объекте. Получив положения всех атомов структуры, можно вычислить межатомные расстояния, валентные углы, углы вращения вокруг связей, распределение поверхностного заряда и другие геометрические параметры, что позволяет определить структуру белка с атомарной точностью.

Главным недостатком данного метода является то, что для его использования нужны большие количества белка, который способен правильно закристаллизоваться, причем при кристаллизации структура может исказиться. С помощью него невозможно разрешить структуру неупорядоченных областей белка, так как их структура не обладает пространственной периодичностью в кристалле. Методом РСА была разрешена единственная структура нуклеосомы с гистоновыми хвостами (PDB ID 1KX5 [8]), однако положение хвостов в ней является артефактом кристаллизации.

Электронная микроскопия.

В электронном микроскопе (ЭМ) используется электронный пучок, который направляется на образец. Регистрируются электроны, прошедшие через образец, и упруго рассеянные электроны, энергия которых не передалась образцу. Пучок электронов помогает видеть очень маленькие участки образца, потому что его длина волны намного меньше, чем длина волны видимого света, что позволяет видеть элементы до нанометров.

Для наблюдения внутренней структуры биологических объектов в практике зачастую используется криоэлектронная микроскопия (Крио-ЭМ), особенностью которой является замораживание образца в жидком азоте, что позволяет повысить разрешение изображения.

Преимущество ЭМ – это большое увеличение. Однако у ЭМ существует ряд недостатков, таких как радиационное повреждение образца, стоимость оборудования и сложность в эксплуатации (они очень чувствительны к вибрации и внешним магнитным полям, требуют стабильного напряжения питания, токов на электромагнитную линзу и циркуляции холодной воды, чтобы образцы не пострадали от тепла, выделяемого в процессе возбуждения электронов). Также при исследовании образца, содержащего неупорядоченные белковые домены, регистрация этих участков затруднительна. Это происходит потому, что для реконструкции неупорядоченных доменов требуется большое количество снимков образца, из-за чего возникают слишком сильные радиационные повреждения, препятствующие дальнейшему исследованию.

Ядерно-магнитный резонанс.

Явление ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) основано на поглощении кванта электромагнитного излучения радиочастотного диапазона ядром, помещенным в постоянное магнитное поле.

Основу применения спектроскопии ядерного магнитного резонанса для определения структуры неизвестных веществ составляют эмпирически найденные корреляции между спектральными параметрами, химическим сдвигом и спин-спиновым взаимодействием, с одной стороны, и строением образца — с другой. Так, по значению химического сдвига можно судить о химическом окружении, в котором находится ядро, дающее данный резонансный сигнал. Спин-спиновое взаимодействие дает возможность определить положения ядер относительно друг друга, поскольку величина этого взаимодействия, константа спин-спинового взаимодействия J , зависит от числа и типа связей, разделяющих ядра. Более того, мультиплетности резонансных сигналов и распределение интенсивностей внутри мультиплетов в простых случаях строго определяются числом протонов в соседних группировках [14].

В основе спектроскопии ядерного магнитного резонанса лежат магнитные свойства атомного ядра. Некоторые ядра, в том числе и протон, обладают угловым моментом P , который в свою очередь обуславливает появление у этого ядра магнитного момента μ . В соответствии с квантовой теорией угловой момент и ядерный магнитный момент квантованы, то есть они принимают дискретные значения. При облучении магнитных ядер переменным магнитным полем, частота которого соответствует разнице между этими дискретными энергетическими уровнями, то магнитные ядра начинают переходить с одного уровня на другой, при этом поглощая энергию переменного поля. В этом и состоит явление магнитного резонанса.

Одно из основных достоинств ЯМР состоит в том, что он позволяет получать пространственно-селективные данные о расположении и окружении каждого атома выбранного типа, причем такие атомы распределены по всей молекуле. Почти все остальные методы дают информацию либо усредненную по всей молекуле, либо только о какой-то одной ее части. Также на ЯМР спектрах удается различить разные конформации молекул, образование/диссоциацию комплексов и многое другое. Недостатки ЯМР заключаются в том, что у данного метода низкая чувствительность по сравнению с большинством других экспериментальных методов (ЭМ, флюоресцентная микроскопия, ЭПР). Это приводит к тому, что для усреднения шумов сигнал нужно накапливать долгое время. Помимо этого, существует сложность в анализе и интерпретации данных, полученных от неупорядоченных белковых доменов. Так одни исследования показывают, что гистоновые хвосты, в частности H4, находятся в неупорядоченном диссоциированном от нуклеосомы состоянии на протяжении всего измерения [5], в то время как в других исследованиях приходят к выводу, что гистоновые хвосты взаимодействуют с ДНК в растворе [3].

Одними из важных оценочных параметров ЯМР являются времена релаксации. Релаксация - процесс восстановления термодинамического

равновесия в спиновой системе после возбуждения ядерных спинов. Этот процесс соответствует восстановлению равновесного распределения заселенностей энергетических уровней. Причины явления релаксации: 1) взаимодействие ядерных спинов с окружающими их атомами и молекулами; 2) взаимодействие между спинами ядер. Спин-решеточная (продольная) релаксация - это процесс, при котором ядро рассеивает избыток энергии “в решетку” за счет взаимодействия с флуктуирующими магнитными полями, которые создаются движущимися полярными или заряженными молекулами (T1). Спин-спиновая (поперечная) релаксация - это процесс, связанный с неоднородностью магнитного поля и наличием слабых локальных магнитных полей, создаваемых магнитными ядрами и обусловленных внутримолекулярными и межмолекулярными процессами (T2). Наибольшие успехи в исследовании гистоновых хвостов получены именно методом ЯМР [11, 13], поэтому часто работы по ЯМР интегрируют результаты МД моделирования [3, 5, 12].

Исследование гистоновых хвостов методами молекулярной динамики

Последние экспериментальные данные показывают, что взаимодействия между ДНК и гистоновыми хвостами носят кратковременный неустойчивый характер (fuzzy interactions) и возникают на временах порядка наносекунд или десятков наносекунд. Экспериментально точно охарактеризовать эти взаимодействия сложно, поскольку они очень динамичны. В этой ситуации ценную информацию можно получить с помощью моделирования молекулярной динамики (МД). С помощью молекулярной динамики можно наблюдать процесс на временах порядка от фемтосекунд до микросекунд с высокой точностью. Однако присутствует проблема, связанная с моделированием неупорядоченных структур, как гистоновые хвосты. Согласно исследованиям, на временах порядка сотен наносекунд хвосты «схлопываются» на поверхность нуклеосомы и прочно связываются с ДНК [1]. Другими словами, хвосты в значительной степени иммобилизованы на

поверхности нуклеосомы, оставаясь конформационно ограниченными на временах порядка микросекунд. Это описание, однако, не согласуется с экспериментальными данными, особенно данными ЯМР, которые указывают на надежную конформационную динамику гистоновых хвостов во временном масштабе около 10 наносекунд [22]. Это привело к предположению, что МД захватывает те конформации, которые находятся в ловушке локальных минимумов свободной энергии. Предполагается, что эти конформации с иммобилизованными гистоновыми хвостами находятся в состоянии медленного перехода в конформации с неупорядоченными хвостами. Проблема может заключаться в том, что использующиеся на данный момент способ параметризации солевых мостиков и модель воды были разработаны для реализации МД глобулярных белков, поэтому не подходят для моделирования неупорядоченных структур. На данный момент большая часть МД-исследований использует модель воды TIP3P.

Различные типы воды

Жесткие модели, к которым относятся трехточечная TIP3P, четырехточечная TIP4P-D и другие, считаются простейшими моделями воды и основаны на несвязанных взаимодействиях. В этих моделях связывающие взаимодействия неявно учитываются голономными ограничениями. Электростатическое взаимодействие моделируется с использованием закона Кулона, а силы дисперсии и отталкивания — с использованием потенциала Леннарда-Джонса. Потенциал для таких моделей, как TIP3P (переносимый межмолекулярный потенциал с 3 точками) и TIP4P рассчитывается по формуле 1.1.1.

$$E_{ab} = \sum_i^{\text{on } a} \sum_j^{\text{on } b} \frac{k_C q_i q_j}{r_{ij}} + \frac{A}{r_{\text{OO}}^{12}} - \frac{B}{r_{\text{OO}}^6} \quad (1.3.1.)$$

, где k_C — электростатическая постоянная, имеет значение 332,1 Å·ккал/(моль·e²); q_i и q_j — парциальные заряды, относительно заряда электрона; r_{ij} — расстояние между двумя атомами или заряженными узлами;

А и В — параметры Леннарда-Джонса. Заряженные сайты могут быть на атомах или на фиктивных сайтах (таких как неподеленные пары электронов в четырех- и пятиточечных моделях воды). В большинстве моделей воды термин Леннард-Джонса применяется только к взаимодействию между атомами кислорода.

Модель воды TIP3P является трехточечной и имеет переносимый межмолекулярный потенциал (рис. 2А).

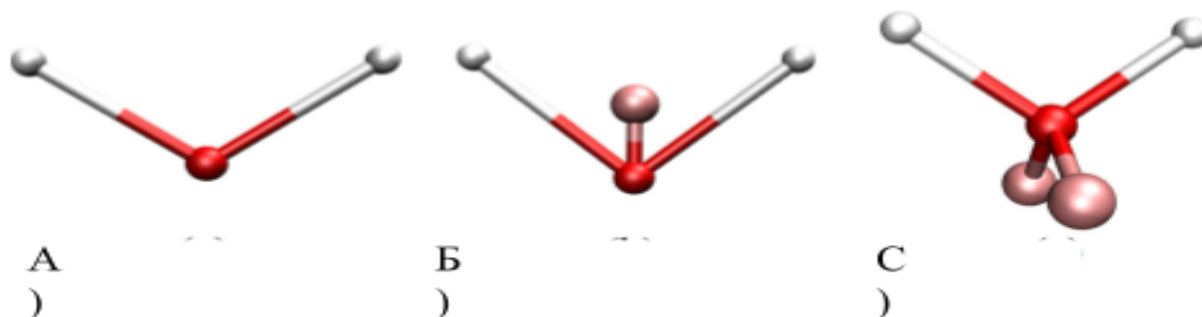


Рисунок 2. Общая геометрия классических моделей воды с фиксированным зарядом на n-точках: А) трехточечная модель, имитирующая структуру НОН; Б) четырехточечная модель, компенсирующая кислородный заряд на 4-й точке; С) пятиточечная модель с двумя дополнительными зарядами, имитирующими неподеленные электронные пары. [28]

Модель воды OPC была разработана иначе, чем большинство других распространенных моделей воды. Используя пространство параметров электрического мультипольного момента, модель воды OPC была построена как глобальный оптимум для воспроизведения шести важных свойств объемной воды, она имеет четырехточечную модель (рис. 2Б). Согласно некоторым исследованиям, данная модель воды лучше подходит для МД неупорядоченных структур [19].

Одна из новых четырехточечных моделей воды TIP4P-D корректирует лондонские дисперсионные взаимодействия, которые предположительно могут приводить к ошибкам моделирования. TIP4P-D приблизительно

исправляет эти недостатки в моделировании дисперсионных взаимодействий воды. В данной модели коэффициент дисперсии воды C_6 примерно на 50% больше, чем в существующих моделях воды, а остальные параметры оптимизированы в соответствии с экспериментальными свойствами жидкой воды [20, 22] (рис. 4Б). Сравнительные характеристики для моделей воды TIP3P, OPC и TIP4P-D указаны в таблице 1.

Таблица 1. Сравнительная таблица характеристик для разных типов воды (TIP3P, OPC, TIP4P-D) [15]

	TIP3P	OPC	TIP4P-D
Дипольный момент, Д	2,35	2,48	2,403
Заряд водорода	+0,417	+0,6791	+0,58
Заряд кислорода	-0,8340	-1,3582	-1,1128
C_6 , ккал/моль \AA^6	595	858	900
C_{12} , ккал/моль \AA^{12}	582000	864635	904657
Межатомное расстояние, \AA	0,9572	0,8724	0,9572
Угол между атомами водорода	104,52	103,6	104,52
Диффузия, $\text{см}^2/\text{с}$	5,19	2,3	2,08

Силовые поля

Молекулярная динамика (МД) - метод, при котором изучаемая молекула рассматривается как набор атомов, взаимодействие между которыми описывается рядом эмпирических потенциальных функций. Потенциальные

функции, в свою очередь, зависят от параметров, которые определяются из наилучшего соответствия расчетных и экспериментальных данных. Принято описывать такие молекулярные взаимодействия, как энергия валентных связей, валентных углов, торсионных углов и плоских групп, углы внутреннего вращения, Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия, кулоновские взаимодействия и невалентные взаимодействия. Суммарная потенциальная энергия системы выглядит так, как представлено на формуле 1.3.2.

$$U = U_{\text{вал. св.}} + U_{\text{вал. уг.}} + U_{\text{торс. уг.}} + U_{\text{пл. гр.}} + U_{\text{В.-д.-В.}} + U_{\text{Кул. вз-ий}} \quad (1.3.2.)$$

В основе данного метода лежит представление атомов в виде материальных точек. Движения молекулярных систем на атомарном уровне описываются с помощью уравнения Ньютона. После расчета потенциальных энергий, действующих внутри системы, происходит вычисление сил, которые в свою очередь определяют направление и величину ускорения движения (формулы 1.3.3. и 1.3.4.).

$$F_i = - \frac{dU(r_1, \dots, r_N)}{dr_i} \quad (1.3.3.)$$

$$m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} = F, \quad i = 1, \dots, N \quad (1.3.4.)$$

Далее система действием сил изменяется в вычисленных направлениях за время шага молекулярной динамики, после чего силы рассчитываются снова.

Эффективность моделирования в значительной степени определяются силовым полем, выбранным для расчета. Для биологических макромолекул часто используются такие поля как AMBER, GROMOS, CHARMM, OPLS, ECEPP, CVFF/CFF и другие. Хотя в основе всех полей и лежит уравнение Ньютона, они различаются разной параметризацией составных частей потенциальной энергии молекулы.

Динамические характеристики, рассчитываемые на основе траектории МД

Для анализа динамики хвостов гистонов в составе нуклеосом проводился расчет следующих характеристик: время жизни “связанного” с ДНК состояния (residence time); коэффициент самодиффузии; поверхность, доступная для растворителя (SASA) и параметр порядка.

Время жизни “связанного” с ДНК состояния (время жизни “связанного” состояния для целого хвоста) было вычислено как средняя длина “залипания” на всей траектории. Для расчета требуется дать определение “связанному” состоянию. Кадр траектории показывает “связанное” состояние хвоста, если количество взаимодействующих остатков хвоста с ДНК превышает значение отсечки (cut-off). Аминокислотный остаток считается взаимодействующим с ДНК, когда хотя бы 1 тяжелый атом остатка связан (находится в радиусе 4 Å) с тяжелым атомом ДНК.

Для описания кинетики связывания хвоста также вводится константа перехода из связанного состояния в несвязанное (K_c), которая рассчитывается по формуле 1.3.5.

$$K_c = \frac{\text{Количество кадров в несвязанном состоянии}}{\text{Количество кадров в связанном состоянии}} \quad (1.3.5.)$$

Время жизни “связанного” состояния для отдельной аминокислоты вычисляется как параметр τ экспоненты $e^{-\tau/t}$, в которую вписываются зависимость количеств “связанных” состояний от их длин.

Самодиффузия - процесс перемещения молекул среди себе подобных на расстояния, превышающие их диаметр. Коэффициент самодиффузии определяет силу межмолекулярного взаимодействия. То, насколько свободно молекулы могут передвигаться в пространстве.

Коэффициент трехмерной самодиффузии был найден исходя из формул 1.3.6. и 1.3.7.

$$MSD(r_d) = \left\langle \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |r_d - r_d(t_0)|^2 \right\rangle_{t_0}, \quad (1.3.6.)$$

где r_d - координаты молекулы в данный момент времени, $r_d(t_0)$ - координаты молекулы в начальный момент времени, N - количество эквивалентных частиц, по которым рассчитывается MSD.

$$MSD = 2nDt, \quad (1.3.7.)$$

где t - время, n - размерность пространства.

Доступная площадь поверхности (ASA) или доступная для растворителя площадь поверхности (SASA) — это площадь поверхности биомолекулы, доступная для растворителя. Измерение ASA обычно описывается в квадратных ангстремах. ASA обычно рассчитывается с использованием алгоритма «катящегося шара». Этот алгоритм использует сферу (растворителя) определенного радиуса для «прокатки» поверхности молекулы. Расчет осуществляется с помощью алгоритма Шрейка-Рапли.

Он представляет собой численный метод, который рисует сетку точек, равноудаленных от каждого атома молекулы, и использует количество этих точек, доступных для растворителя, для определения площади поверхности. Точки нарисованы на предполагаемом радиусе молекулы воды за пределами радиуса Ван-дер-Ваальса, что фактически похоже на «катание мяча» по поверхности. Все точки сверяются с поверхностью соседних атомов, чтобы определить, скрыты они или доступны. Количество доступных точек умножается на часть площади поверхности, которую представляет каждая точка, для расчета SASA.

Параметр порядка характеризует то, насколько вектор намагниченности может свободно вращаться в пространстве. Когда вектор может занимать любые положения $S^2 = 0$, а когда белок плотно упакован $S^2 = 1$. Параметр порядка был рассчитан по формуле 1.3.8.

$$S^2 = \lim_{t \rightarrow \infty} C(t), \quad (1.3.8.)$$

где t - размер рамки, которой проходят по траектории, $C(t)$ - функция корреляции.

Функция корреляции была посчитана по траектории исходя из формулы 1.3.9.

$$C(t) = \langle P_2(\mu(t_0)\mu(t_0 + t)) \rangle, \quad (1.3.9.)$$

где $\mu(t_0)$ - единичный вектор между атомами азота и водорода в пептидной связи в начальный момент времени, $\mu(t_0 + t)$ - единичный вектор между атомами азота и водорода в момент времени $t_0 + t$, P_2 - полином Лежандра второго порядка.

Эти параметры могут быть использованы для описания динамики неупорядоченных гистоновых хвостов в составе нуклеосом. Далее рассмотрим один из факторов, который могут влиять на их динамику.

Посттрансляционные модификации гистоновых хвостов и их влияние на функции нуклеосом

Посттрансляционные модификации гистонов опосредуют множество путей регуляции хроматина. На данный момент наиболее изученными ПТМ гистонов являются ацетилирование, метилирование, фосфорилирование, убиквитинирование и АДФ-рибозилирование. Эти метки и другие изменяют силу ДНК-гистоновых и гистон-гистоновых взаимодействий, что изменяет динамику нуклеосомы. В сочетании с наличием гистоновых вариантов, ПТМ не только влияют на стабильность нуклеосомы, но и обеспечивают возникновение химических маркеров, которые помогают ориентироваться белковым факторам и узнавать специфические геномные участки. Путем привлечения клеточных факторов, которые связываются с гистонами, маркированными ПТМ («гистоновый код»), определяется и поддерживается функционально различные области генома.

Такие ПТМ, как ацетилирование, метилирование, триметилирование положительно заряженных аминокислотных остатков хвостов (лизин, аргинин, в меньшей степени гистидин) предположительно приводят к откручиванию ДНК от гистонового кора [10]. Это происходит вследствие того, что из-за данных ПТМ уменьшается положительный заряд гистонового хвоста, что уменьшает степень его взаимодействия с отрицательно заряженной ДНК.

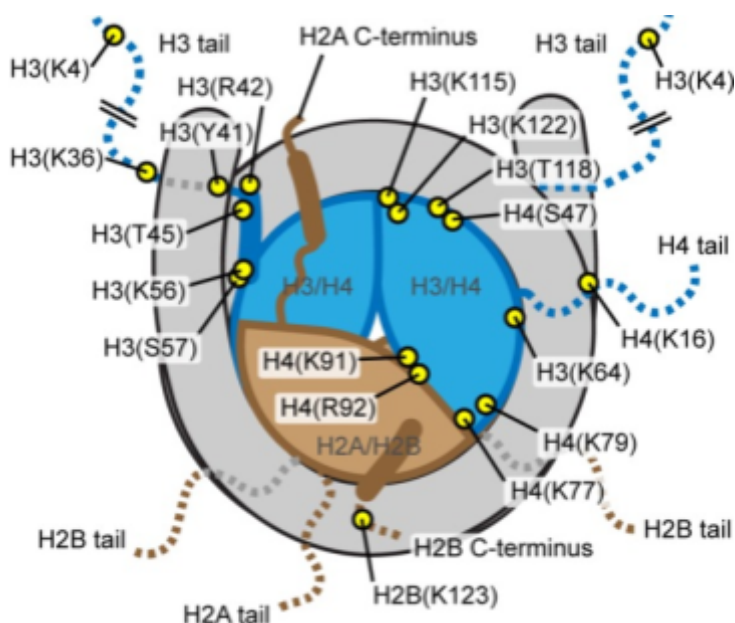


Рисунок 3. Примеры расположения некоторых посттрансляционных модификаций гистонового кора и гистоновых хвостов. [7]

ПТМ гистонового кора или хвостов могут или напрямую влиять на стабильность и динамику нуклеосомы, или делать это опосредованно, через ремоделеры хроматина [7]. Большинство ПТМ, по-видимому, помогают в осуществлению определенных ремоделирующих активностей в различных биологических условиях.

Согласно последним исследованиям, ПТМ в одном и том же белке могут специфично влиять друг на друга. Это явление называется "взаимодействие ПТМ" (crosstalk). Он может быть положительным, когда ПТМ одного остатка способствует возникновению ПТМ на другом остатке, и

отрицательным, когда ПТМ являются взаимоисключающими. Данный феномен возникает в результате влияния, вызванного электрическими одного аминокислотного остатка по отношению к другому остатку. Явление “взаимодействия ПТМ” распространено среди многих биологических молекул, в том числе оно было найдено у гистонов. Благодаря нему осуществляются многие биологические функции хроматина [24]. Примером положительного “взаимодействия ПТМ” служит транскрипция гена *p21 (CDKN1A)*, опосредованная возникновением двух ПТМ (H3S10ph и H3K14ac), не происходит, когда существует только одна из двух данных ПТМ, значит эти две модификации работают скоординированно. Отрицательное “взаимодействие ПТМ” в хроматине можно пронаблюдать на другом примере: белок HP1 узнает H3K9me2/me3 и распространяет ее по хроматину (вследствие чего происходит его уплотнение), но узнавания не происходит, если рядом присутствует фосфорилированный остаток H3S10.

Также негативный кросс-ток выявлен между H3K9me3 и H3K27me3. Было обнаружено, что кросс-ток среди ацетилированных лизинов или любых монометилованных остатков в основном положителен на коротких расстояниях (1–5 аминокислот между ПТМ), но становятся отрицательными на больших расстояниях (> 10 аминокислот) в хвосте H3. Таким образом, вполне вероятно, что ферменты, ответственные за внесение этих меток, не обладают высокой специфичностью и могут также модифицировать соседние остатки. С ди- и триметилированием дела обстоят иным образом: на маленьких расстояниях между ними проявляется отрицательным кросс-ток. Более того, большинство триметильных меток, как правило, не встречаются одновременно на одном и том же гистоновом хвосте, поскольку это привело бы к избытку положительных зарядов. Кроме того, триметилирование лизина на гистоне H3 имеет разные биологические функции, что объясняет, почему они в основном не встречаются одновременно на одном и том же белке

(K4me3, активные промоторы; K9me3, конститутивный гетерохроматин; K27me3, факультативный гетерохроматин; K36me3, тела активных генов).

Метилирования K9, K27 и K36 - самые распространенные ПТМ на гистоне H3, они занимают большие регионы на хроматиновой фибрилле. Кроме того, ацетилирования (K9, K14, K18, K23, and K27), ассоциированные с эухроматином, наряду с K4me1, служащим маркером для энхансеров, их количество составляет 1% от всех ПТМ.

Существует ряд гистоновых ПТМ, которые находятся рядом с областью входа/выхода ДНК из нуклеосомы и расположены так, чтобы потенциально влиять на интерфейс ДНК-гистон, включая H3 (Y41ph), H3 (R42me2a), H3 (T45ph), H3 (K56ac) и H3 (S57ph). Эти же остатки входят в область H3-"застежки" (H3-latch) [1]. Приведенные гистоновые ПТМ участвуют в ряде биологических процессов, включая транскрипцию, репарацию ДНК, репликацию и апоптоз. Каждая из этих ПТМ находится со внутренней стороны по отношению к нуклеосомной ДНК, поэтому для связывания белка с любой из этих ПТМ требуется нарушение структуры нуклеосомы. Это позволяет им напрямую влиять на структуру или динамику нуклеосом. Например, H3(K56ac) значительно увеличивает разворачивание нуклеосом, в то время как о влиянии других ПТМ еще не сообщалось. Кроме того, H3(K56ac) влияет на сборку нуклеосом, изменяя взаимодействие H3/H4 с гистоновыми шаперонами. Однако напрямую H3(K56ac) не изменяет степень уплотнения хроматина, а лишь слегка влияет на ремоделирование хроматина с помощью SWI/SNF и RSC. Наличие H3(K56ac) не препятствует образованию полностью свернутой нуклеосомной структуры, а лишь смещает равновесие в сторону частично развернутых состояний, увеличивая доступность нуклеосомной ДНК. Остальные ПТМ остатков из области H3-"застежки" изучены меньше, однако существуют данные, что H3(Y41) фосфорилируется с помощью киназы JAK2, которая участвует в регуляции транскрипции. Также существуют исследования отмечающие, что количество

фосфорилированной аминокислоты H3(T45) возрастает в апоптотических клетках. Уровень этой модификации достигает пика во время репликации ДНК, а потеря H3(T45ph) вызывает репликативные дефекты. Помимо этого, аминокислота H3(R42) асимметрично диметилируется в клетках человека, что увеличивает транскрипцию *in vitro* в 2,5 раза. Предполагается, что это увеличение связано с нарушением взаимодействий ДНК и гистонов. Однако неизвестно, является ли этот эффект прямым результатом влияния модификации или эта ПТМ действует через факторы, взаимодействующие с нуклеосомами [7].

Несмотря на большой объем экспериментальных данных в области исследования ПТМ, многое еще остается неизученным, в частности механизмы влияния ПТМ на динамику нуклеосом. В работе представлены результаты по моделированию нуклеосом с модификациями и без них, полученные методом МД. На данный момент нет готовых решений для моделирования неупорядоченных гистоновых хвостов с модификациями, поэтому большая часть работы посвящена подбору оптимальных условий моделирования нуклеосом и разработке подходов к изучению влияния модификаций, в том числе изменение силового поля для моделирования МД с ПТМ.

МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

В первой части исследования была использована структура из базы данных PDB – нуклеосома *Xenopus laevis* с PDB ID 3LZ0 [9]. В ней представлены гистоны лягушки и 601 позиционирующая последовательность ДНК [27].

Проводился анализ динамики хвостов на траекториях МД нуклеосом (PDB ID 1KX5) с двумя моделями воды (TIP3P и OPC), которые были ранее получены в нашей научной группе (длины траекторий составляют 16 мкс и 6 мкс соответственно).

Выбранные траектории анализировались с помощью библиотек numpy, matplotlib, pandas, ngview, MDAnalysis [2, 16], io, pynuc, pyddb, freesasa, seaborn, scipy и с помощью разработанных скриптов, написанных на языке Python 3. SASA был рассчитан с помощью программы FreeSASA [17] с параметрами Ван-дер-Ваальсовых радиусов, взятыми из MDAnalysis.

Для исследования влияния ПТМ на динамику нуклеосомы были применены 3 подхода: 1) внесение мимиков заряд-экранирующих замен и проведение МД с ними, 2) внесение модификаций фосфорилирований (серин → фосфорилированный серин, тирозин → фосфорилированный тирозин, треонин → фосфорилированный треонин) и расчет энергий нуклеосом с помощью FoldX, 3) параметризация ПТМ, интегрирование в силовое поле и проведена МД нуклеосомы со внесенными ПТМ.

В первом подходе все положительно заряженные аминокислотные остатки (лизин, аргинин) в обеих цепях хвоста гистона H3 одновременно были заменены на нейтрально заряженный остаток – аланин. На полученных нуклеосомах с мутациями была проведена молекулярная динамика в силовом

поле AMBER14SB [20]+ parambsc1[21] с откорректированными параметрами ионов – CUFIX (Yoo, Aksimentiev, 2018) с помощью программы Gromacs2020.1. [22]. При подготовке системы в ее расчетную ячейку были добавлены молекулы воды, ионы Na^+ и Cl^- . Затем была проведена минимизация и расчет динамики в течение 327 нс (шаг моделирования – 2 фс, шаг записи кадров – 1 нс).

Для внесения мимиков заряд-экранирующих ПТМ и предварительной оценки влияния ПТМ на стабильность нуклеосом использовалась программа Foldx [6]. Foldx - это программа и одноименное эмпирическое силовое поле, которое было разработано для быстрой оценки влияния мутация на стабильность, укладку и динамику белков и нуклеиновых кислот. Основная функция Foldx - расчет свободной энергии макромолекулы на основе ее пространственной структуры в хорошем разрешении.

Во втором подходе была проведена оценки энергетического влияния фосфорилирований на структуру нуклеосомы с помощью программы Foldx. Были внесены одиночные мутации по всем серинам, тирозинам и треонинам и затем посчитаны энергии полученных структур.

Третий подход был реализован на примере параметризация фосфорилированного серина (фосфосерина). В программе PyMOL [23] был создан трипептид ALA-SER-ALA, который впоследствии был фосфорилирован с помощью плагина pytms [26]. Параметризация фосфосерина осуществлялась с помощью программ асуре [25], в которой была сгенерирована топология модифицированной аминокислоты (файл в формате itp), и PsiRESP, в котором были подсчитаны заряды для трипептида с ПТМ. При работе с программой PsiRESP были зафиксированы заряды основной цепи трипептида и уравнены заряды на кислородах в фосфатной группе. Алгоритм параметризации и внедрения в силовое поле представлен на рис. 4. Разработка алгоритма проводилась на таких языках

программирования как Python 3, bash в интегрированной среде разработки JupyterLab.

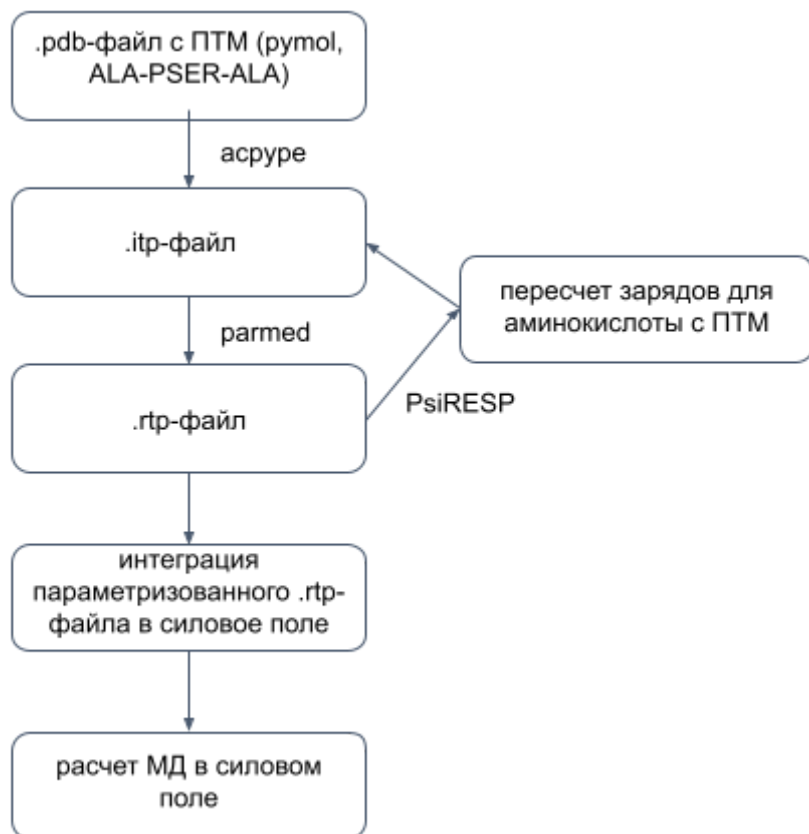


Рисунок 4. Алгоритм параметризации аминокислотных остатков с ПТМ.

Чтобы проверить стабильность параметризованного трипептида, был проведен пробный расчет МД в модифицированом силовом поле AMBER14SB + parambsc1 + CUFIX с моделью воды TIP3P (шаг моделирования – 2 фс, шаг записи кадров – 1 нс. Далее проводился расчет МД нуклеосомы (PDB ID 1KX5) с ПТМ H3S57ph в силовом поле AMBER14SB + parambsc1 + CUFIX с моделью воды OPC (шаг моделирования – 2 фс, шаг записи кадров – 10 пс). Сравнение проводилось с микросекундной траекторией нуклеосомы 1KX5 в окружении воды OPC, которая ранее была полученной в группе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение молекулярной динамики нуклеосом с разными моделями воды: TIP3P и OPC

В первой части работы мы проводили подбор условий моделирования нуклеосом, в частности подбор модели воды. Стандартная модель TIP3P может с ошибками, в частности ошибками в динамике взаимодействия хвостов с ДНК, воспроизводить динамику неупорядоченных структур, таких как гистоновые хвосты, т.к. была параметризована только для глобулярных белков. Для сравнения динамики хвостов проводилось моделирование с использованием 4-точечной модели воды OPC, которая, как предполагается, лучше описывает динамику неупорядоченных белков. Сравнение проводилось на полученных ранее в лаборатории траекториях: нуклеосомы в окружении воды TIP3P длиной 16 мкс (шаг моделирования – 2 фс, шаг записи кадров – 1 нс) и нуклеосомы в окружении воды OPC длиной 6 мкс (шаг моделирования – 2 фс, шаг записи кадров – 1 нс). Далее приведены результаты сравнительного анализа этих траекторий.

Анализ динамики переходов между связанными и несвязанными состояниями показал, что моделировании системы в модели воды TIP3P хвост H2A-N не совершает переходов из “связанного” с ДНК состояния в “несвязанное” (при значении отсечки равному 10%) (рис. 5). В воде OPC он совершает только один переход. Исходя из этого, для данного хвоста нельзя судить о правильной модели воды для проведения молекулярной динамики. Однако мы можем наблюдать противоположный результат для С-конца гистона H2A: в воде TIP3P он “залипает” примерно с 7 микросекунды до конца траектории (660 кадров отображают “несвязанное” состояние, 14592 - “связанное”), в воде OPC мы видим частые переходы между состояниями (1030 кадров отображают “несвязанное” состояние, 5126 - “связанное”). Увеличение количества кадров, показывающих “несвязанное” состояние при

моделировании в воде ОРС наблюдается также для хвостов Н2В (12 →49), Н3(1→12) и Н4(8→40).

Исходя из графика, представленного на рис. 6 и табл. 2, можно подтвердить, что среднее время жизни “связанного” с нуклеосомой состояния в воде ОРС меньше для каждого из хвостов, чем в воде ТРЗР. Также можно заметить, что хвосты Н2А-Н и Н3 в ТРЗР “залипают” почти в течение всей траектории.

Время “связанного” состояния для аминокислотных остатков в составе каждого из хвостов, как видно на рис. 7-10, по большей части уменьшается в воде ОРС, значит они “залипают” на коре нуклеосомы реже или на меньшие промежутки времени.

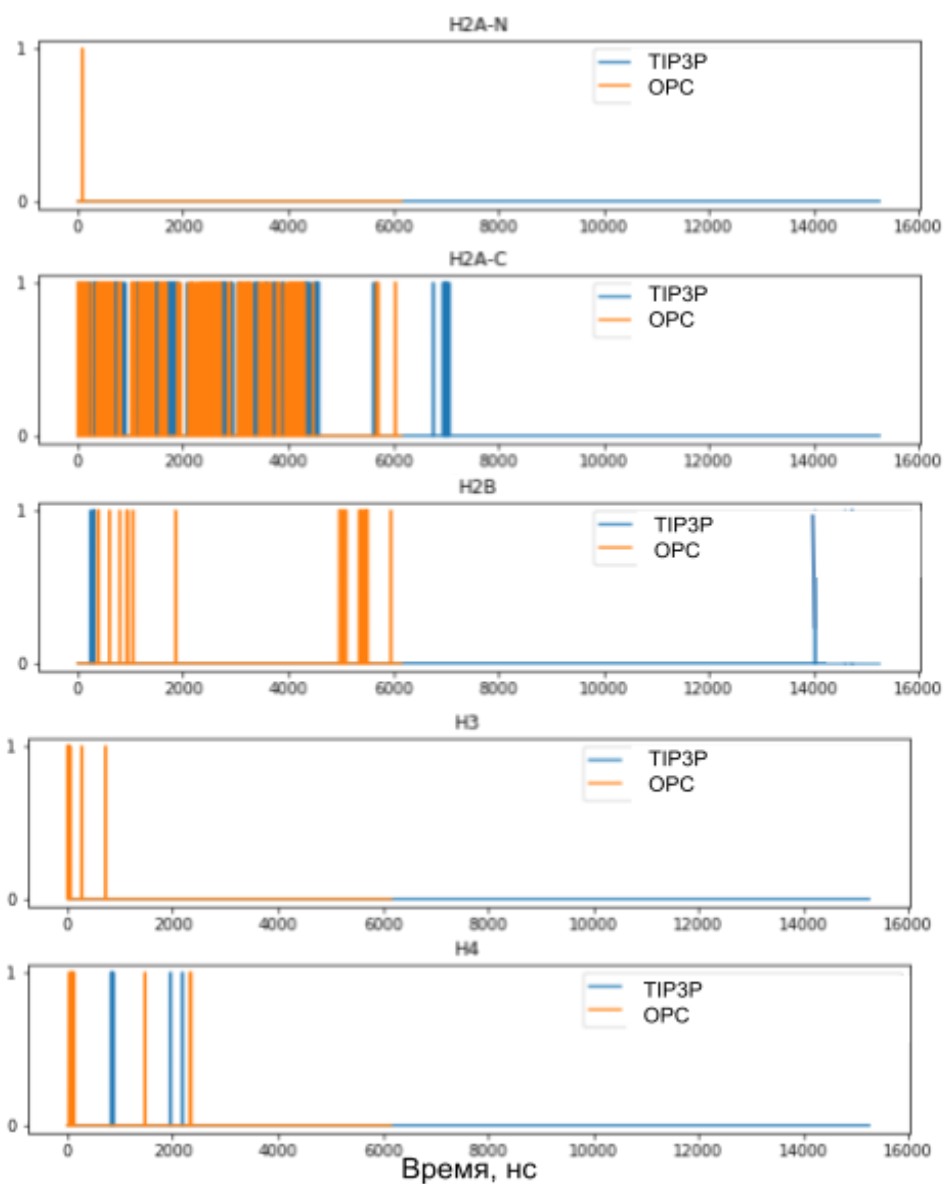


Рисунок 5. Динамика переходов между “связанным” с нуклеосомой состоянием и “несвязанным” в моделях воды TIP3P (синий цвет) и OPC (оранжевый цвет). 0 обозначает “связанное” состояние, 1 – “несвязанное”.

Таблица 2. Время жизни “связанного” с нуклеосомой состояния и константа диссоциации комплекса ДНК+хвосты для каждого гистонового хвоста для разных типов воды: А) ТРЗР, Б) ОРС.

	Количество “несвязанных” кадров		Количество “связанных” кадров		Время жизни “связанного” состояния, нс
	Количество “несвязанных” кадров	Количество “связанных” кадров	Количество “несвязанных” кадров	Количество “связанных” кадров	
А) H2A-N хвост	0	15252	0	15252.0	
H2A-C хвост	660	14592	0.04523	45.6	
H2B хвост	12	15240	0.00079	1270.0	
H3 хвост	1	15251	<0.0001	15251.0	
H4 хвост	8	15144	0.00053	1693.8	
Б) H2A-N хвост	1	6155	0.00016	3077.5	
H2A-C хвост	1030	5126	0.20094	13.9	
H2B хвост	49	6107	0.00802	197.0	
H3 хвост	12	6144	0.00195	768.0	
H4 хвост	40	6116	0.00654	407.7	

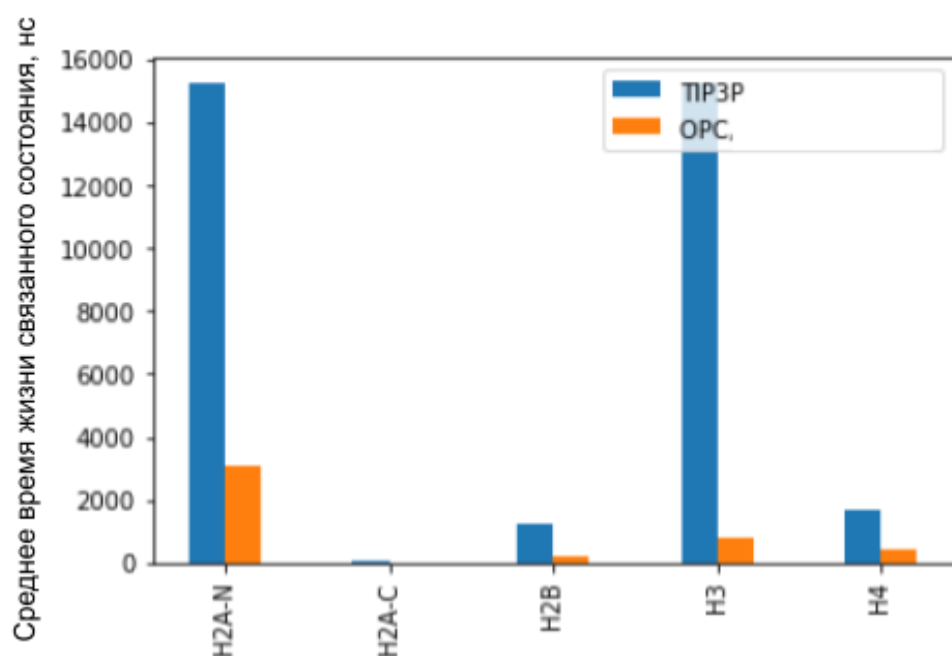
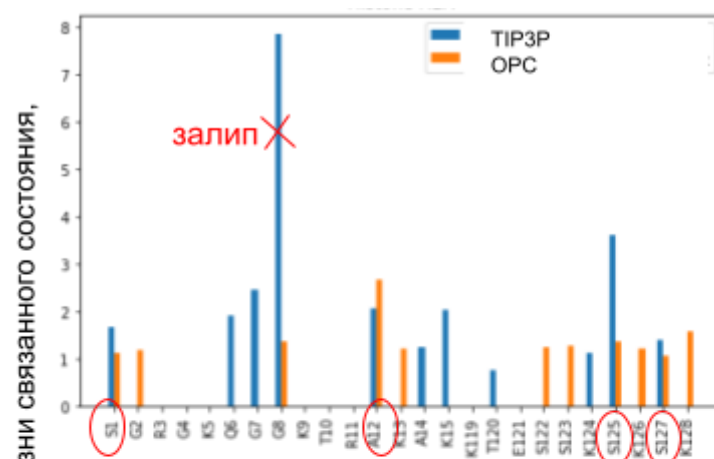


Рисунок 6. Среднее время жизни “связанного” с нуклеосомой состояния для каждого гистонового хвоста.

Цепь С



Цепь G

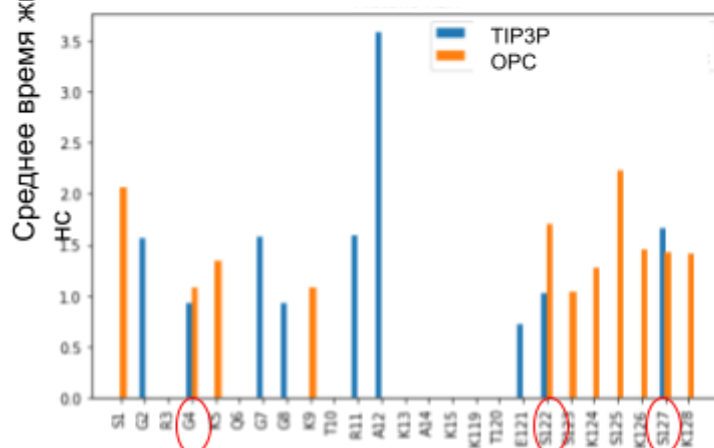
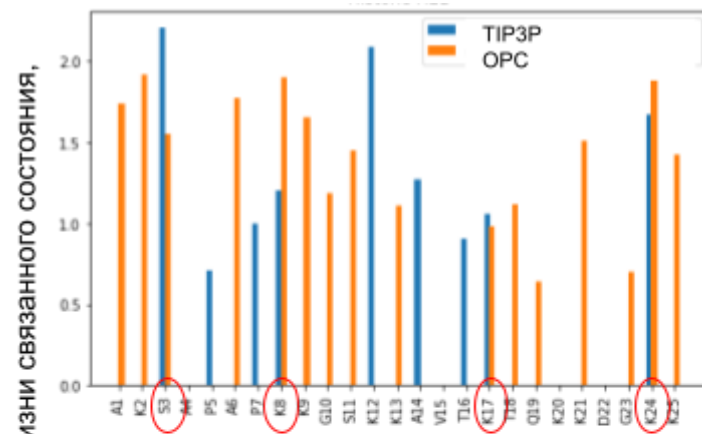


Рисунок 7. Среднее время жизни “связанного” с нуклеосомой состояния для каждого аминокислотного остатка гистона H2A.

Цепь D



Цепь H

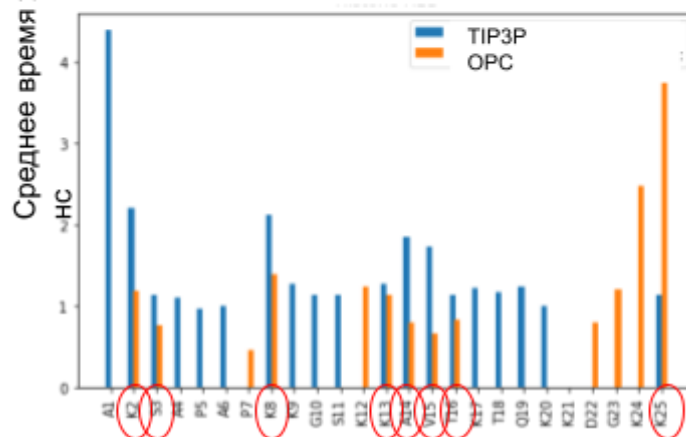
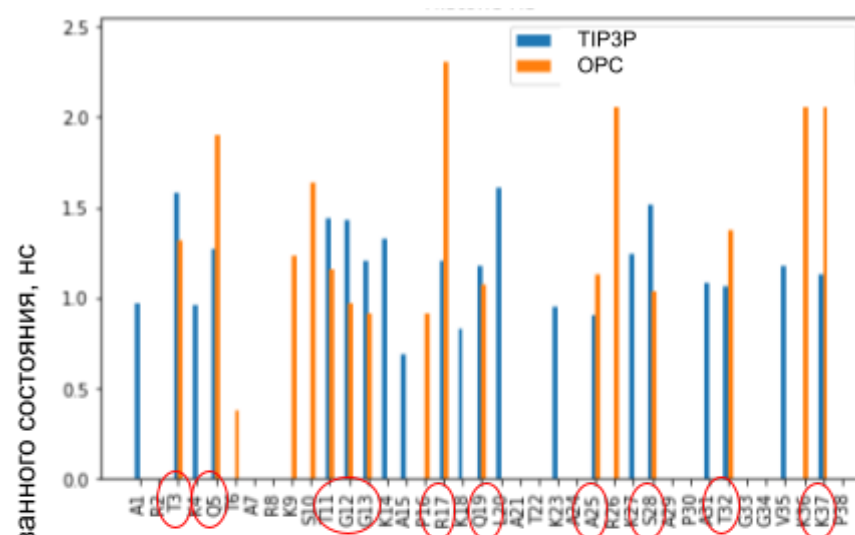


Рисунок 8. Среднее время жизни “связанного” с нуклеосомой состояния для каждого аминокислотного остатка гистона H2B.

Цепь А



Цепь Е

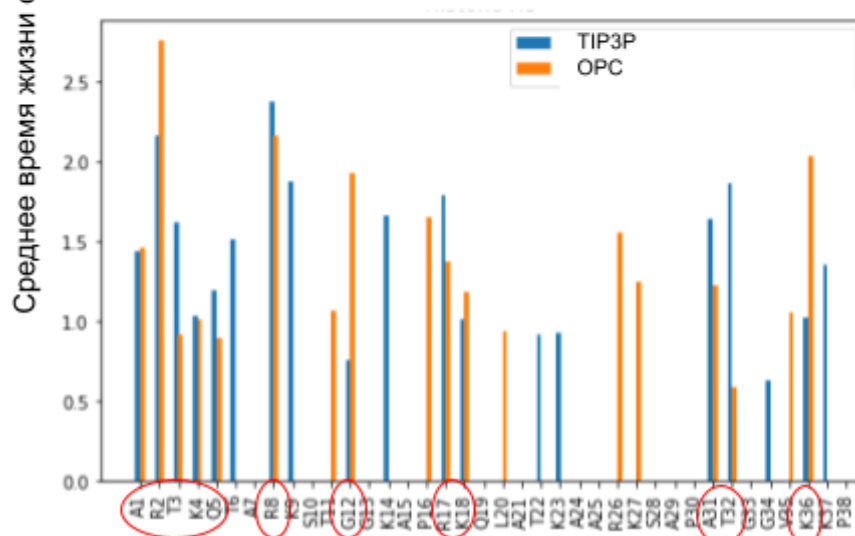
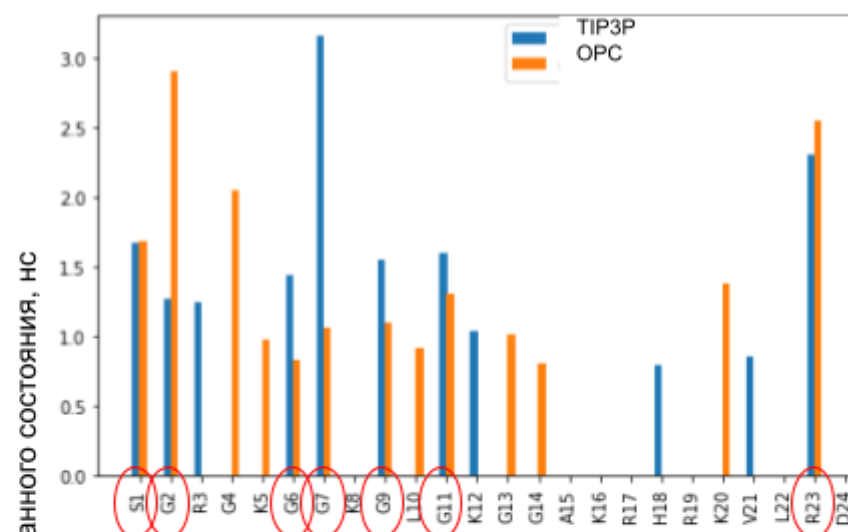


Рисунок 9. Среднее время жизни “связанного” с нуклеосомой состояния для каждого аминокислотного остатка гистона H3.

Цепь В



Цепь F

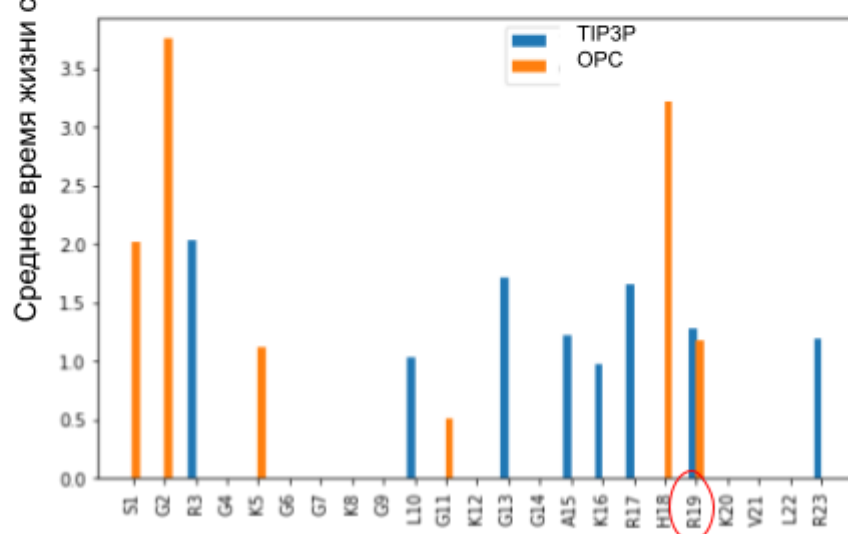


Рисунок 10. Среднее время жизни “связанного” с нуклеосомой состояния состояния для каждого аминокислотного остатка гистона H4.

Как видно из графика на рис. 11 зависимости коэффициента самодиффузии от времени моделирования, самый резкий спад происходит на интервале от 0 до 50 нс. Исходя из этого, я провела измерения коэффициентов самодиффузии для всех аминокислотных остатков всех хвостов на этом же интервале.

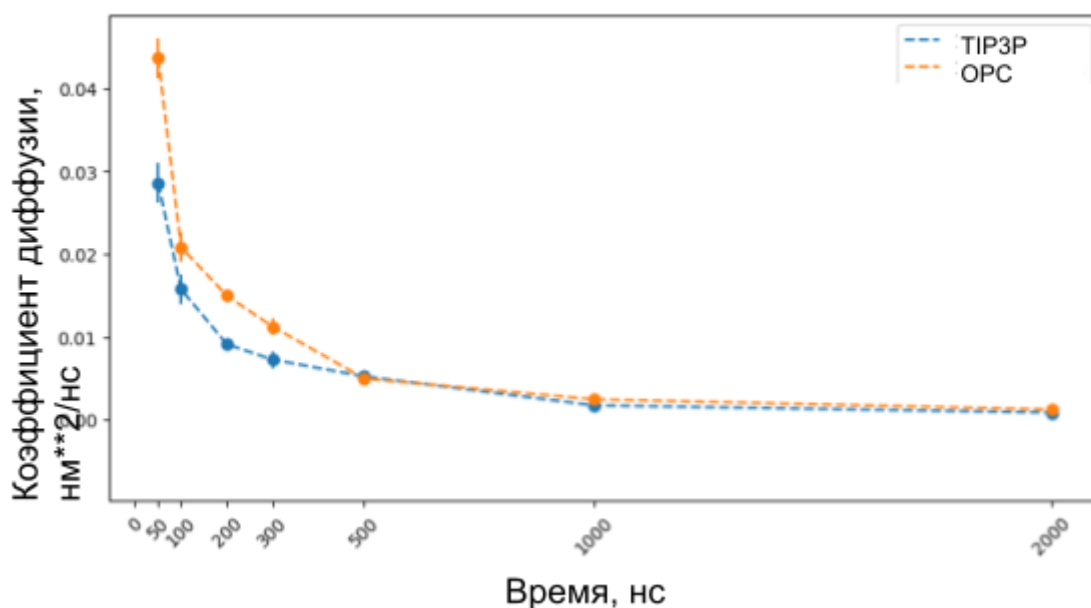


Рисунок 11. Зависимости коэффициента самодиффузии от времени моделирования, рассчитанная для хвоста гистона H2B (для остальных гистонов зависимость схожа).

На графиках сравнения коэффициентов самодиффузии (рис. 12) наблюдается общая тенденция увеличения коэффициента самодиффузии в воде OPC по сравнению с водой TIP3P. Чем он выше, тем остатку легче передвигаться в пространстве. Результаты можно считать статистически значимыми, так как расчет ошибки производился по результатам от двух хвостов.

Также мы можем видеть, что коэффициент диффузии уменьшается с приближением аминокислотного остатка к глобулярной части нуклеосомы (кроме хвоста H3, где 1-12 остатки залипли в бороздке ДНК на протяжении всей траектории).

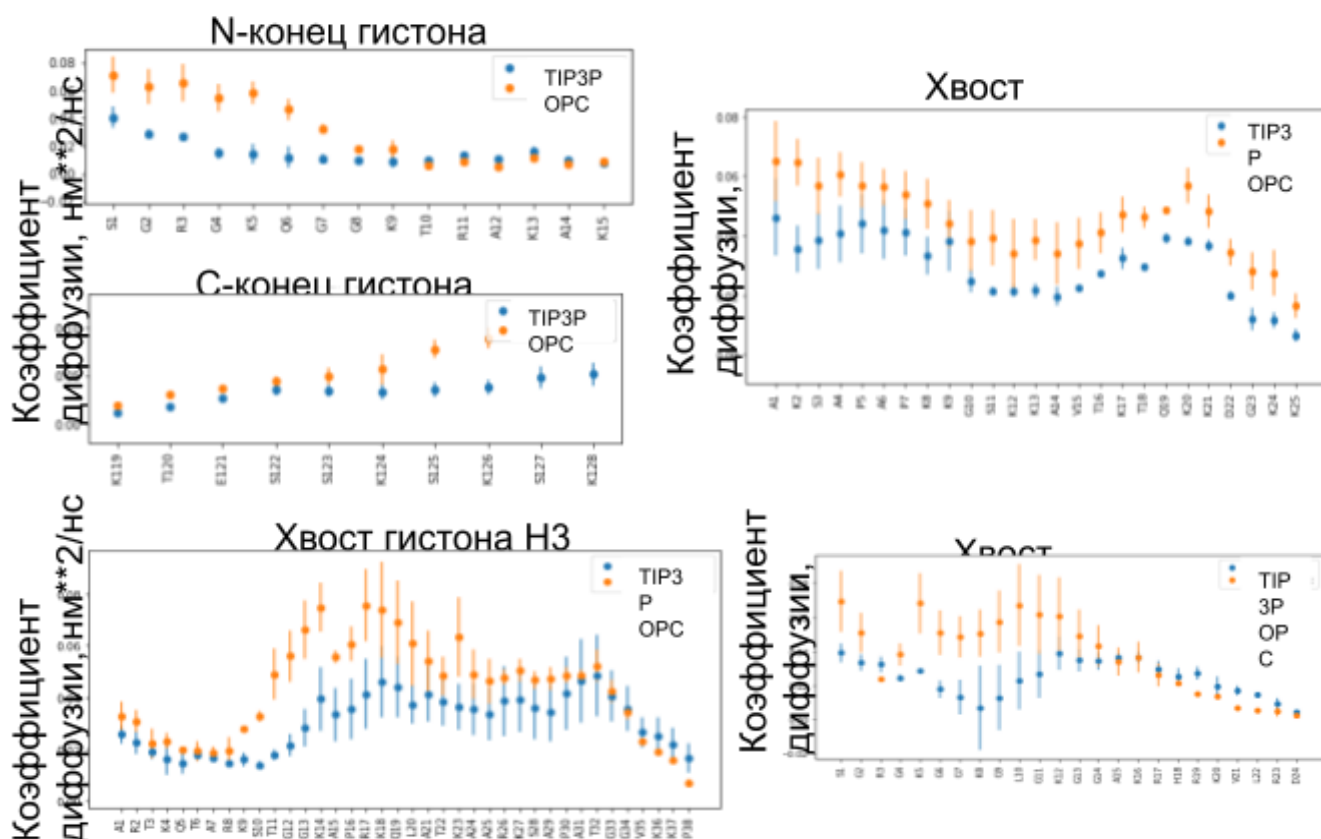


Рисунок 12. Коэффициенты диффузии, рассчитанные для хвостов гистонов H2A, H2B, H3 и H4 в среде с разными моделями воды. Синим цветом обозначены результаты в воде TIP3P, оранжевым - в воде OPC. Ошибка была посчитана из результатов хвостов обоих гистонов.

На следующем этапе проводилось сравнение траекторий с разной моделью воды путем расчета поверхности, доступной для растворителя (SASA). Следующие результаты, полученные из графиков на рис. 13-16, статистически значимы, так как коробки на графиках для данных остатков не пересекаются.

H2A: для остатков G7, G8, K9, K23 SASA в воде OPC больше, чем в TIP3P. У K5, R11, A14, K119 пики SASA в воде OPC раздваиваются. R11, A12, K13 - SASA в воде TIP3P больше.

H2B: A1, K2, A14, T16, K17, Q19, K25 - SASA в воде OPC больше.

H3: G13, K14, T22, K36, K37 - SASA в воде OPC больше. Для Q5 SASA в воде TIP3P больше.

Н4: G4, K5, K8, G13, H18, V21, L22 - SASA в воде OPC больше. K20 - SASA в воде TIP3P больше.

Наблюдается общая тенденция увеличения площади, доступной для растворителя, в воде OPC по сравнению с водой TIP3P, так как у H2A значение SASA увеличилось для 4 остатков, H2B – 7, у H3 – 5, H4 – 7, в то время как значение SASA уменьшилось только у H2A для 3 остатков, у H3 для 1 остатка и у H4 для 1 остатка. Для остальных остатков результат не является статистически значимым или SASA не изменилось.

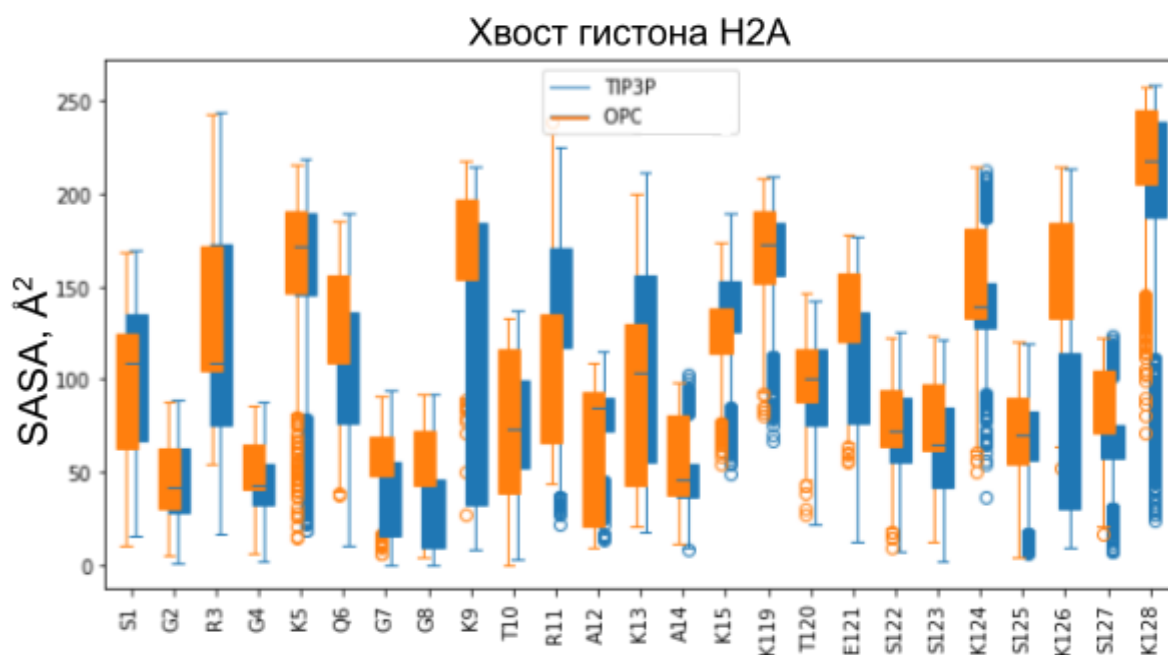


Рисунок 13. Площади поверхности, доступные для растворителя (SASA), рассчитанные для хвостов гистона H2A в средах с разными моделями воды.

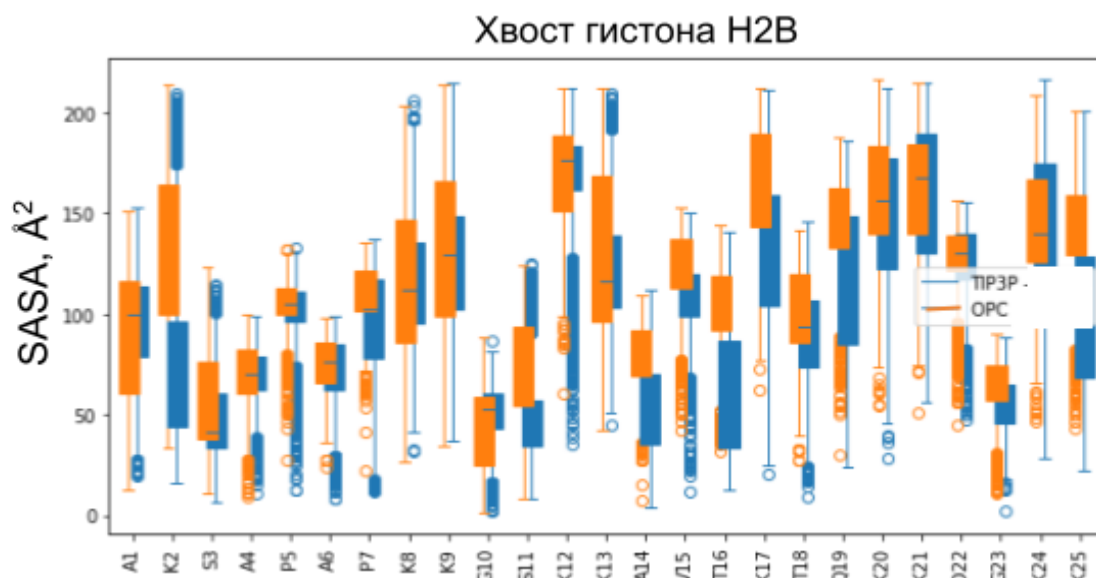


Рисунок 14. Площади поверхности, доступные для растворителя (SASA), рассчитанные для хвостов гистона H2B в средах с разными моделями воды.

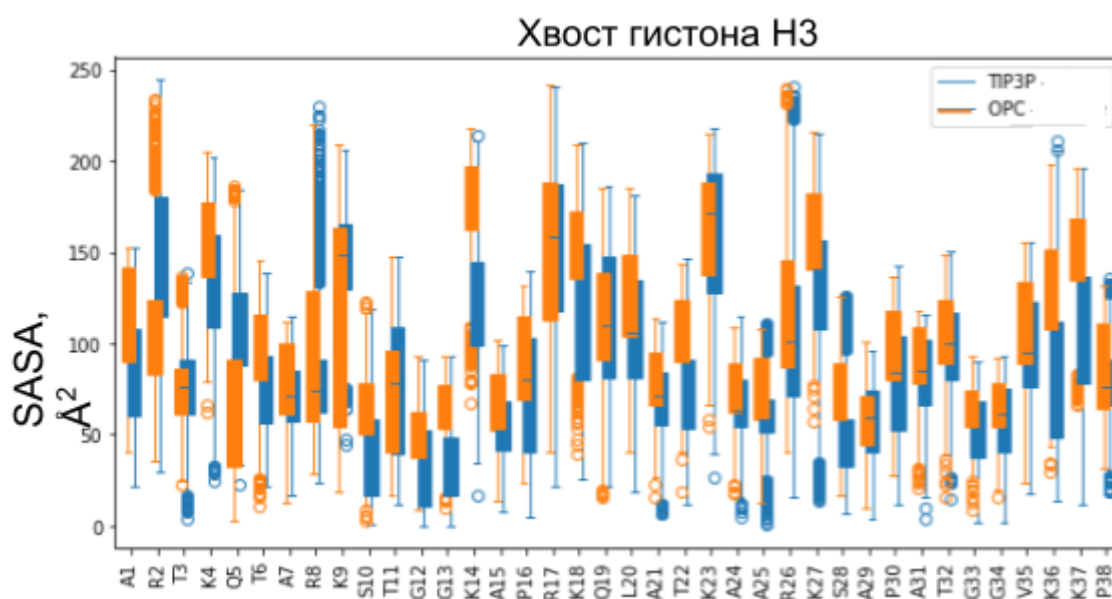


Рисунок 15. Площади поверхности, доступные для растворителя (SASA), рассчитанные для хвостов гистона H3 в средах с разными моделями воды.

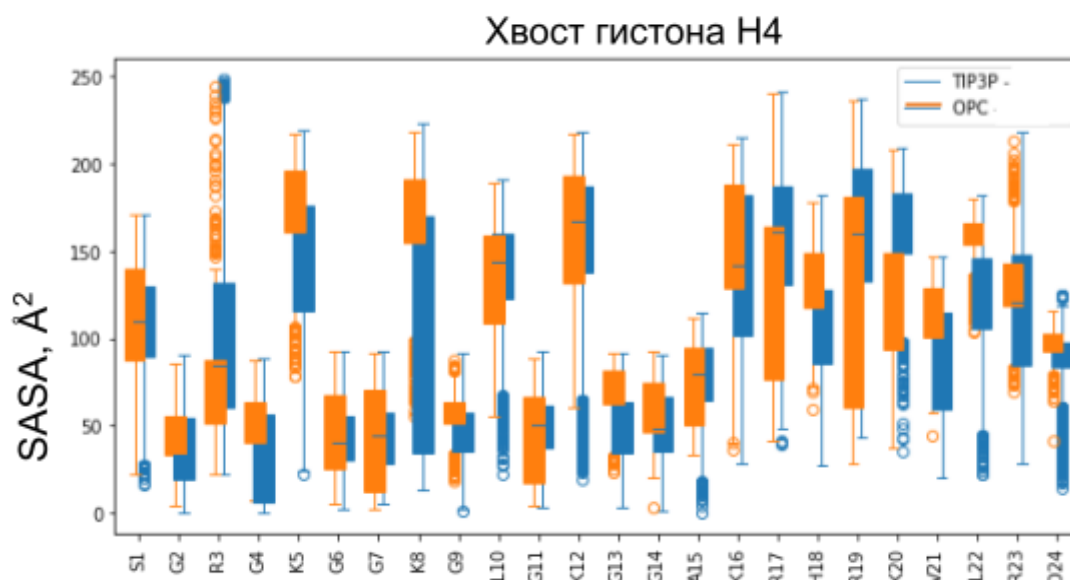


Рисунок 16. Площади поверхности, доступные для растворителя (SASA), рассчитанные для хвостов гистона Н4 в средах с разными моделями воды.

Анализ параметров порядка аминокислот гистоновых хвостов показал, что (рис. 17,18):

У хвоста гистона Н2А для остатков 123-128, то есть для С-конца можно однозначно сказать, что движения в пространстве стали менее стерически затрудненными (параметр порядка стал меньше). У С-конца наоборот - хвост начинает “залипать” на нуклеосоме в воде OPC (в районе остатков 10-15).

У хвостов гистонов Н4 (с 3 по 14 остатки), Н3 (8-9, 12-17, 24-37), Н2В(3, 6, 10-18) также наблюдается уменьшение параметра порядка, по сравнению с водой TIP3P.

Также видно, что хвосты в воде “залипают” чаще в воде TIP3P: 123-128 остаток С-конец хвоста Н2А, 10-17 остатки хвоста Н2В, хвост Н4 до 17 остатка. Хвост Н3 залипает в обоих типах воды: 4-7 остатки – в воде OPC, 7-8, 10-12 – в воде TIP3P.

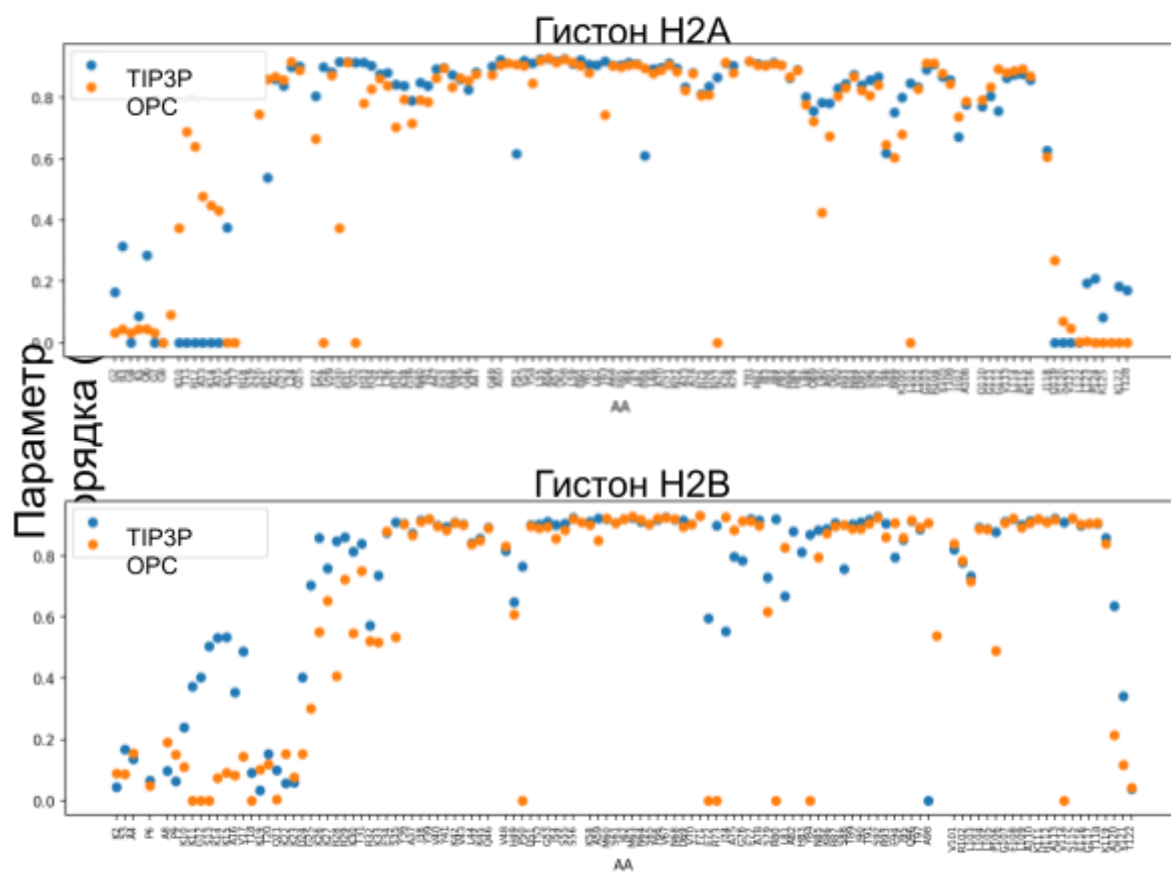


Рисунок 17. Параметр порядка, рассчитанный для гистонов H2A и H2B.

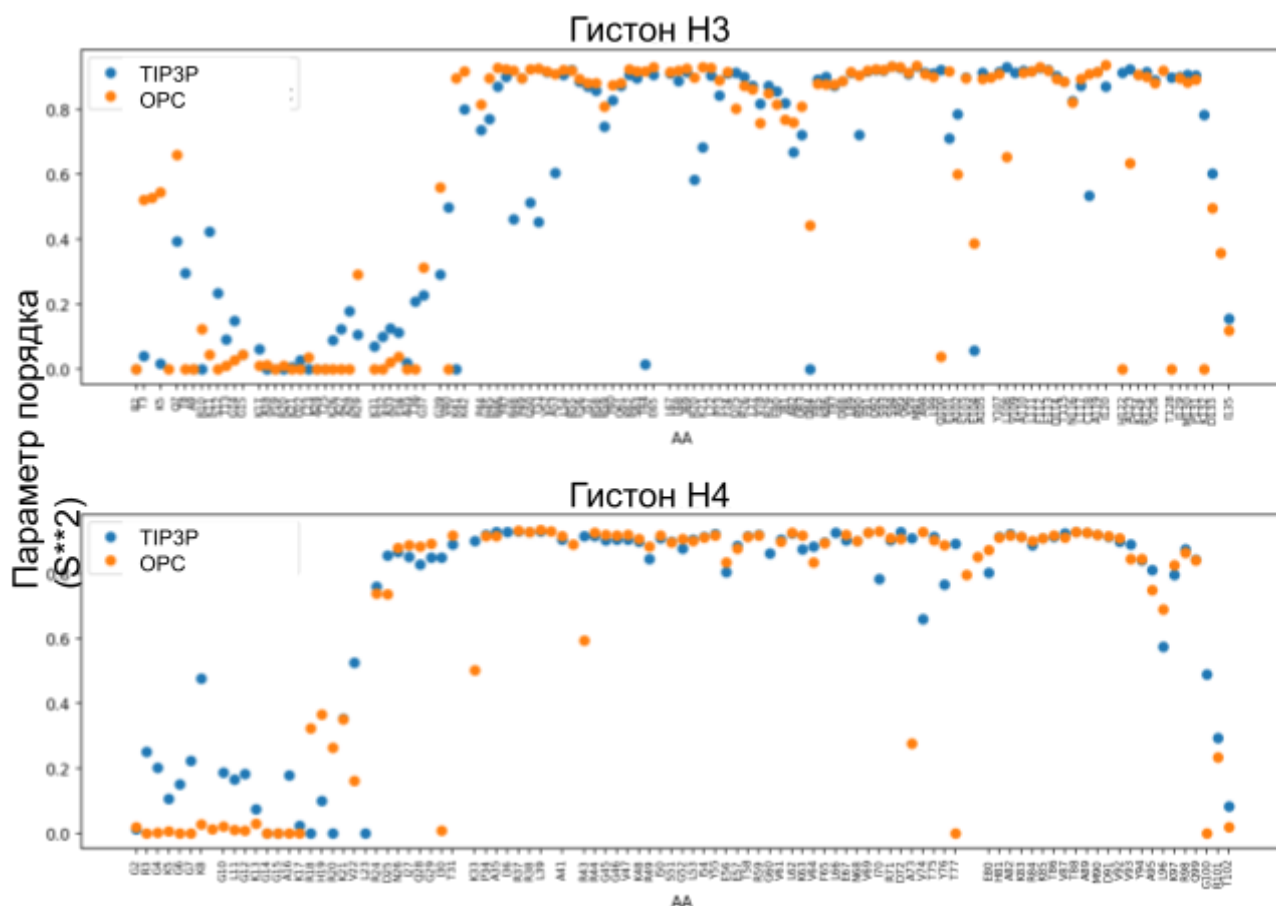


Рисунок 18. Параметр порядка, рассчитанный для гистонов H3 и H4.

Таким образом, путем анализа ряда динамических характеристик, было показано, что движение гистоновых хвостов при моделировании с использованием модели воды OPC более динамично, чем при моделировании с моделью TIP3P. Следовательно, данная модель воды была выбрана для дальнейшего исследования влияния ПТМ на динамику нуклеосомы.

Результаты моделирования нуклеосом с ПТМ и исследование влияния ПТМ

При исследовании влияния ПТМ на динамику нуклеосом было использовано три подхода, два из которых являются методами оценки влияния ПТМ (проведение МД расчетов с использованием замен на канонические аминокислоты, имитирующие заряд-экранирующие ПТМ, и оценка изменения свободной энергии нуклеосомы при введении

фосфорилирования без проведения МД). Третий подход - параметризация модифицированных остатков и проведение МД нуклеосом с модификациями - является наиболее достоверным, однако оказался наиболее трудоемким.

При использовании мимиков заряд-экранирующих замен на обеих цепях гистона H3 методом молекулярной динамики была рассчитана траектория длиной 327 нс. В качестве мимиков использовались замены аргининов и лизинов на аланины.

В результате сравнения полученной траектории нуклеосомы с заменами с референсной нуклеосомой было подтверждено, что внесение заряд-нейтрализующих ПТМ уменьшает взаимодействие между гистоновыми хвостами и ДНК. Из рис. 19 видно, что хвосты гистона H3 после внесения мимиков стали исследовать большую часть пространства.

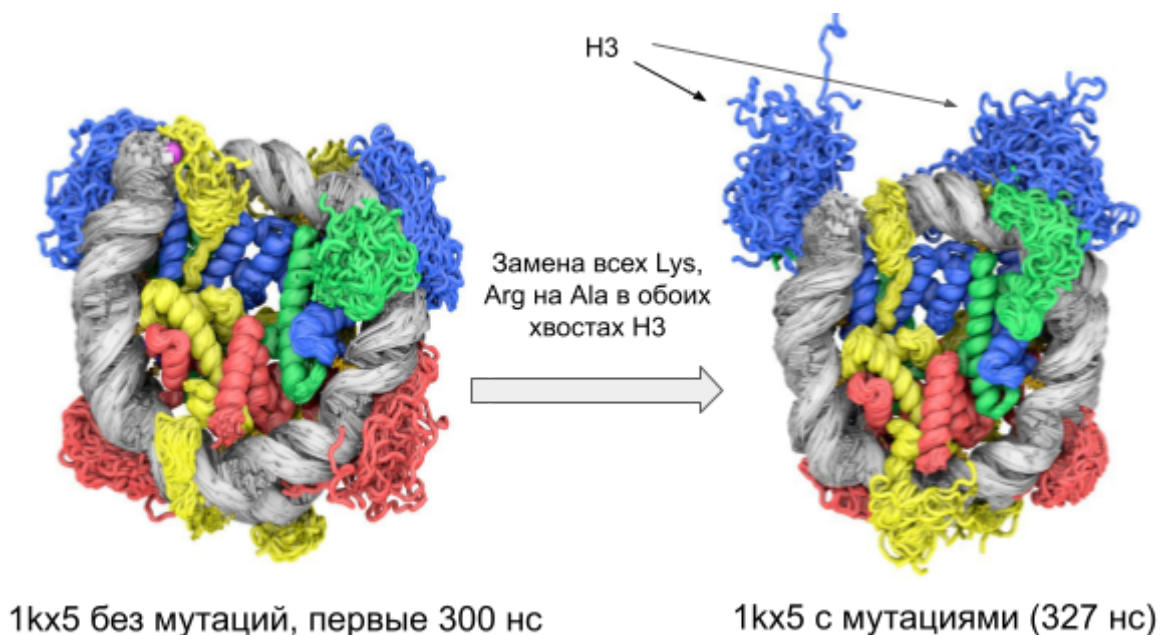


Рисунок 19. Изменение динамики хвостов гистона H3 после внесения мимиков заряд-экранирующих ПТМ.

В следующем подходе была оценена свободная энергия всех теоретически возможных сайтов фосфорилирования кора без проведения МД расчетов, с помощью программы FoldX. Результаты представлены в виде таблицы (табл. 3) в порядке возрастания свободной энергии, а также доступны для просмотра в интерактивном режиме по ссылке

референсной нуклеосомы (без ПТМ) равна -44.57 ккал/моль.

Таблица 3. Все возможные сайты фосфорилирования кора нуклеосомы и их свободные энергии. Зеленым цветом обозначены строки с ПТМ, энергия которых меньше энергии нуклеосомы без ПТМ. Красным – строки с ПТМ, энергия которых больше энергии нуклеосомы без ПТМ. ‘’ помечены ПТМ, о которых было упоминание в экспериментальных исследованиях.*

Сайт ПТМ кора	Свободная энергия, ккал/моль	Сайт ПТМ кора	Свободная энергия, ккал/моль	Сайт ПТМ кора	Свободная энергия, ккал/моль
*H3S57ph	-53.79	H2BS120ph	-47.47	H4T73ph	-39.13
H4T71ph	-52.5	H3Y54ph	-47.03	H2BT85ph	-38.26
*H2BS88ph	-52.39	H4Y51ph	-45.87	*H3T45ph	-37.89
*H3S86ph	-52.15	H2BT87ph	-45.5	H4T80ph	-37.84
H2BT29ph	-51.77	H3Y99ph	-45.42	H2AY50ph	-37.28
H3T58ph	-51.51	H2BT112ph	-45.16	H2BS33ph	-36.7
H2BT49ph	-50.56	H2BY39ph	-44.84	H2BY118ph	-36.58
H4T96ph	-50.45	H2BS57ph	-44.74	*H3Y41ph	-36.01
H2AS19ph	-50.37	H2BS84ph	-44.65	*H4Y88ph	-35.24
H2AS113ph	-50.12	*H3T80ph	-44.38	H4T54ph	-35.06
H2BS109p h	-49.71	H4T82ph	-43.99	H2BY80ph	-34.64
H2AT101p h	-49.38	H2BS75ph	-42.93	H4Y72ph	-34.23
H2AT76ph	-49.31	H2BY34ph	-42.34	H2BS61ph	-34.01
H2BS52ph	-49.28	H4T30ph	-41.94	H4Y98ph	-32.22

H2BT119p h	-48.78	H2BY37ph	-41.91	H2AY57ph	-31.36
H2BT116p h	-48.7	*H3T118ph	-41.62	*H3T107ph	-25.87
H3S87ph	-48.08	H2AS18ph	-41.37	H2AT59ph	-19.6
H2BT93ph	-47.68	*H4S47ph	-41.36		
H2AT16ph	-47.56	H2AY39ph	-40.44		
H2BS53ph	-47.5	H3S96ph	-40.4		

Полученные данные можно в дальнейшем использовать в таких практических целях, как увеличение стабильности нуклеосомы *in vitro*.

В третьем подходе проводилась параметризация ПТМ и интеграция ее в силовое поле Amber14SB+parambcs+suffix на примере фосфосерина. Для параметризации использовался трипептид Ala-Pser-Ala, подробный алгоритм описан в Методах.

Результат расчета распределения зарядов фосфосерина в трипептиде показан рис. 20(А). После проведения МД трипептида с фосфосерином (длина траектории составила 1084 нс), была построена карта Рамачандрана для этого трипептида (рис. 20(Б)). На ней можно видеть, что значения двугранных углов фосфосерина в составе трипептида лежат в пределах значений двугранных углов серина в составе трипептида, однако область посередине сдвинута в сторону меньших значений угла пси. Исходя из этого можно сделать вывод, что модель трипептида с фосфосерином параметризована хорошо.

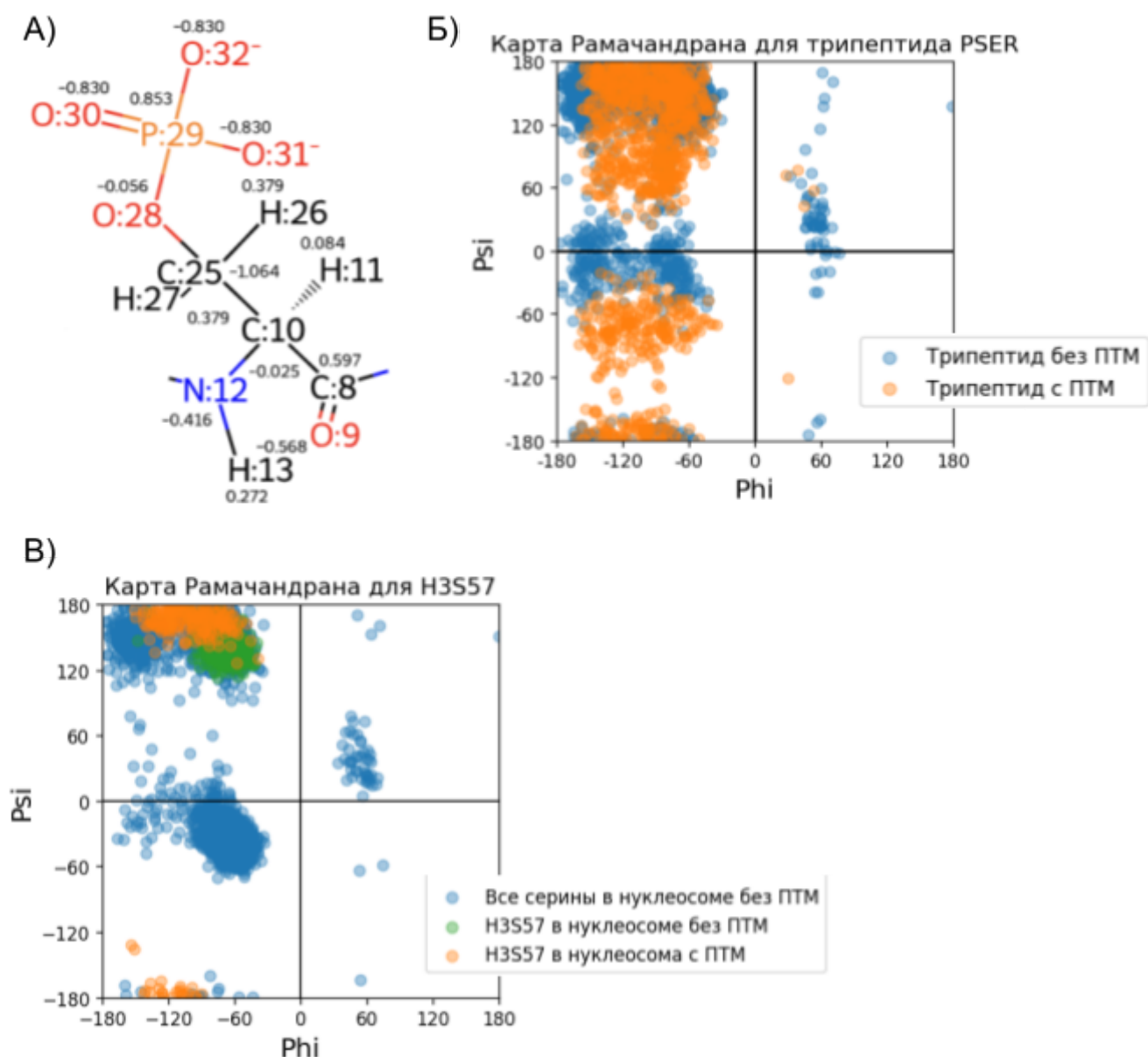


Рис 20. Параметризация фосфосерина и проверка качества параметризации на осевое МД трипептидов *Ala-Pser-Ala* и *Ala-Ser-Ala* и нуклеосом. (а) Распределение зарядов на молекуле фосфосерина (Pser), полученное с помощью RsiPESP (б) Распределение углов Рамачандрана в МД трипептидов *Ala-Pser-Ala* и *Ala-Ser-Ala* (в) Распределение углов Рамачандрана для всех серинов нуклеосомы, для серина в положении H357 и фосфосерина в положении H357.

Для проведения молекулярной динамики нуклеосомы с параметризованной ПТМ было выбрано фосфорилирование 57 аминокислотного остатка серина в составе гистона H3 (H3S57ph). Данная

ПТМ была выбрана как модификация, молекулярный механизм которой до сих пор не показан. Она располагается в aN спирали гистона H3, для которой показано участие в частичном откручивании ДНК. На основе этого факта мы предположили, что данная ПТМ может влиять на стабильность нуклеосомы путем изменения динамики откручивания ДНК. Была рассчитана траектория МД длиной 110 нс, что на данном этапе не позволяет оценить динамику откручивания ДНК напрямую, но позволяет исследовать локальное изменение контактов гистонов с ДНК. Валидация модели также была осуществлена при помощи построения карты Рамачандрана для H3S57ph в нуклеосоме с ПТМ, H3S57 в нуклеосоме без ПТМ и всех серинов в нуклеосоме без ПТМ (рис. 20(В)). Двугранные углы фосфосерина входят в область всех возможных углов для серинов, однако больше сдвинуты в область β -слоя относительно двугранных углов серина без ПТМ в положении H3S57, а также принимают значения, доступные для серинов в целом, но не показаны для серина в положении H3S57, что свидетельствует об изменении локальной структуры этого остатка при введении ПТМ.

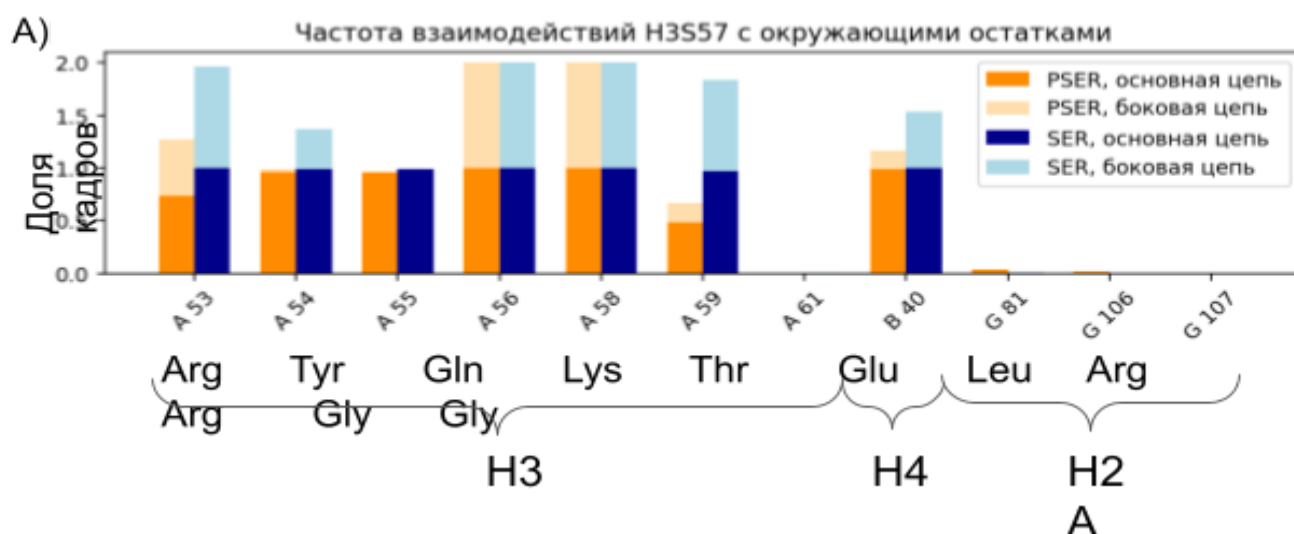


Рисунок 21. Частота взаимодействий H3S57 с окружающими остатками гистонов, рассчитанная для основной и боковой цепи серина 57 нуклеосомы с ПТМ (PSER) и без ПТМ (SER). За контакт принималось расположение двух тяжелых атомов на расстоянии $\leq 4 \text{ \AA}$.

Был произведен анализ взаимодействий основных и боковых цепей H3S57 с соседними аминокислотными остатками для нуклеосомы с ПТМ (траектория длиной 4000 кадров, 40 нс) и без ПТМ (траектория длиной 4000 кадров, 4000 нс), и построена сравнительная гистограмма, представленная на рис. 21(А). Из нее видно, что самые большие изменения происходят во взаимодействиях с H3R53 и H3E59 остатками: наблюдается снижение частоты контактов и основной, и боковой цепей фосфосерина по сравнению с обычным серином. Также наблюдается небольшое увеличение взаимодействий между гистоном H2A (81 и 106 остатками) и модифицированным остатком гистона H3.

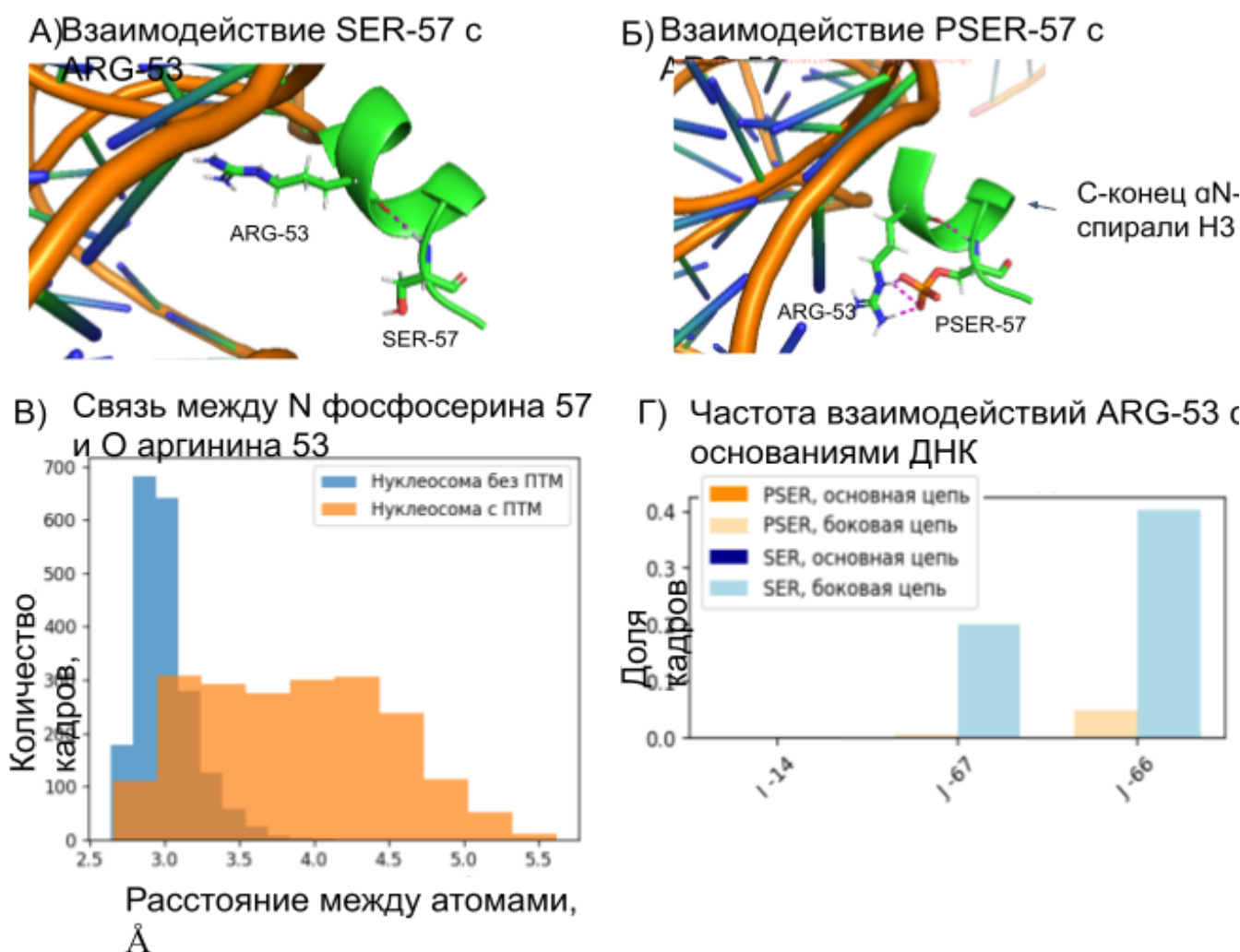


Рисунок 22. А,Б) Визуализация контактов между H3R53 и H3S57 (А), между H3S57_{ph} и H3R53 (Б), В) Гистограмма расстояний между N PSER-57 и O ARG-53 для нуклеосомы с ПТМ и без ПТМ, Г) Гистограмма взаимодействий между тяжелыми атомами 57 аминокислотного остатка и основаниями ДНК для нуклеосомы с ПТМ и без ПТМ.

Интересным оказалось изменение взаимодействия фосфосерина с ARG-53, т.к. эти два остатка без ПТМ формируют водородную связь в составе α N спирали H3, а также боковая цепь ARG-53 участвует во взаимодействии с ДНК. При более детальном анализе взаимодействий между ARG-53 и PSER-57 можно заметить, что PSER-57 формирует несколько дополнительных связей между кислородами фосфатной группы и боковой цепью ARG-53 (рис. 22(А,Б)). Данные взаимодействия, как видно из рис. 22(В), дестабилизируют водородную связь между азотом основной цепи

PSER-57 и кислородом основной цепи ARG-53, что приводит к изменению структуры С-конца α N-спирали гистона H3. Помимо этого, взаимодействие боковых цепей фосфосерина и аргинина приводит к уменьшению количества взаимодействий между ARG-53 и ДНК (рис. 22(Г)), что также видно из рис.22(А,Б). Таким образом, мы показали, что путем электростатического взаимодействия боковых цепей фосфосерина 57 и аргинина 53 происходит дестабилизация α N-спирали гистона H3 и нарушение локальных контактов с ДНК. Мы предполагаем, что на бОльших временах моделирования это приведет к дестабилизации нуклеосомы и увеличению динамики откручивания ДНК, что может быть механизмом, объясняющим роль данной ПТМ в хроматине.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе проводилось исследование механизмов влияния ПТМ на динамику нуклеосом методом молекулярного моделирования. Так как большая часть ПТМ приходится на неупорядоченные гистоновые хвосты, то важным этапом был подбор условий моделирования МД. В рамках работы был проведен подбор модели воды, в окружении которой лучше воспроизводится динамика неупорядоченных гистоновых хвостов. Проводилось сравнение моделирования в моделях воды TIP3P и OPC, для этого был проведен расчет ряда динамических параметров. Была выбрана модель OPC, которая использовалась в дальнейшей работе. В ходе данной работы были рассчитаны динамические характеристики для нуклеосомы при моделировании с моделями воды TIP3P и OPC. При исследовании влияния ПТМ были применены 3 подхода к моделированию ПТМ: 1) были оценены энергетические эффекты теоретических сайтов фосфорилирования гистонов на стабильность нуклеосомы с помощью программы FoldX; 2) было исследовано влияние ПТМ на динамику гистоновых хвостов методом МД с использованием заряд-экранирующих замен; 3) был параметризован фосфорилированный серин, интегрирован в силовое поле и проведена МД нуклеосомы со внесенной ПТМ (H3S57ph). Было показано изменение локальной динамики окружения модифицированного остатка, на основе которого была предложена гипотеза о механизме влияния смоделированной ПТМ на стабильность нуклеосом.

ВЫВОДЫ

1. Такие динамические характеристики, как время жизни связанного состояния, коэффициент диффузии, SASA и параметр порядка показали, что при моделировании нуклеосомы в воде модели ОРС, гистоновые хвосты более свободно перемещаются в пространстве, то есть меньше “залипают” на нуклеосоме, чем при моделировании нуклеосомы в воде TIP3P.

2. Были рассчитаны энергетические эффекты фосфорилирования сайтов при последовательном фосфорилировании серинов, тирозинов и треонинов кора нуклеосомы, как увеличивающие, так и уменьшающие стабильность нуклеосомы. Также был создан сайт для интерактивной визуализации этих сайтов в структуре нуклеосомы.

3. Внесение заряд-экранирующих мимиков ПТМ в хвосты гистонов H3 привело к увеличению их конформационной лабильности.

4. Была реализована параметризация аминокислотных остатков с ПТМ на примере фосфосерина, он был внедрен в силовое поле AMBER14SB и была произведена его валидация по карте Рамачандрана для трипептида Ala-Pser-Ala.

5. Молекулярное моделирование со внесенной ПТМ H3S57ph выявило влияние данной ПТМ на изменение структуры α N-спирали H3 и нарушение локальных контактов с ДНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Armeev G. A. [и др.]. Histone dynamics mediate DNA unwrapping and sliding in nucleosomes // *Nature Communications*. 2021. (12).
2. Gowers R. [и др.]. MDAnalysis: A Python Package for the Rapid Analysis of Molecular Dynamics Simulations Austin, Texas., 2016.C. 98–105.
3. Morrison E. A. [и др.]. The conformation of the histone H3 tail inhibits association of the BPTF PHD finger with the nucleosome // *eLife*. 2018. (7).
4. Peng Y. [и др.]. Histone tails as signaling antennas of chromatin // *Current Opinion in Structural Biology*. 2021. (67). С. 153–160.
5. Rabdano S. O. [и др.]. Histone H4 Tails in Nucleosomes: a Fuzzy Interaction with DNA // *Angewandte Chemie International Edition*. 2021. № 12 (60). С. 6480–6487.
6. Schymkowitz J. [и др.]. The FoldX web server: an online force field // *Nucleic Acids Research*. 2005. № suppl_2 (33). С. W382–W388.
7. Bowman G. D., Poirier M. G. Post-translational modifications of histones that influence nucleosome dynamics // *Chemical Reviews*. 2015. № 6 (115). С. 2274–2295.
8. Davey C. A. [и др.]. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 a resolution // *Journal of Molecular Biology*. 2002. № 5 (319). С. 1097–1113.
9. Vasudevan D., Chua E. Y. D., Davey C. A. Crystal Structures of Nucleosome Core Particles Containing the ‘601’ Strong Positioning Sequence // *Journal of Molecular Biology*. 2010. № 1 (403). С. 1–10.
10. Cosgrove M. S., Boeke J. D., Wolberger C. Regulated nucleosome mobility and the histone code // *Nature Structural & Molecular Biology*. 2004. № 11 (11). С. 1037–1043.
11. Emmerik C. L. van, Ingen H. van Unspinning chromatin: Revealing the dynamic nucleosome landscape by NMR // *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 2019. (110). С. 1–19.
12. Furukawa A. [и др.]. Characteristic H3 N-tail dynamics in the nucleosome core particle, nucleosome, and chromatosome // *iScience*. 2022. № 3 (25). С. 103937.
13. Gao M. [и др.]. Histone H3 and H4 N-terminal tails in nucleosome arrays at cellular concentrations probed by magic angle spinning NMR spectroscopy // *J Am Chem Soc*. 2013. № 41 (135). С. 15278–81.
14. Günther H. NMR-Spektroskopie: Grundlagen, Konzepte und Anwendungen der Protonen-und Kohlenstoff-13-Kernresonanz-Spektroskopie in der Chemie / Günther H., 49 Tabellen. – Thieme:, 1992.
15. Martin Chaplin Water structure and science [Электронный ресурс]. URL: https://water.lsbu.ac.uk/water/water_structure_science.html

(дата обращения: 04.01.2022).

16. Michaud-Agrawal N. [и др.]. MDAnalysis: A toolkit for the analysis of molecular dynamics simulations // *Journal of Computational Chemistry*. 2011. № 10 (32). С. 2319–2327.

17. Mitternacht S. FreeSASA: An open source C library for solvent accessible surface area calculations // *F1000Research*. 2016. (5). С. 189.

18. Mutskov V. [и др.]. Persistent Interactions of Core Histone Tails with Nucleosomal DNA following Acetylation and Transcription Factor Binding // *Molecular and Cellular Biology*. 1998. № 11 (18). С. 6293–6304.

19. Peng Y. [и др.]. Binding of regulatory proteins to nucleosomes is modulated by dynamic histone tails // *Nature Communications*. 2021. № 1 (12). С. 5280.

20. Piana S. [и др.]. Water Dispersion Interactions Strongly Influence Simulated Structural Properties of Disordered Protein States // *The Journal of Physical Chemistry B*. 2015. № 16 (119). С. 5113–5123.

21. Portillo-Ledesma S., Li Z., Schlick T. Genome modeling: From chromatin fibers to genes // *Current Opinion in Structural Biology*. 2023. (78). С. 102506.

22. Rabdano S. O. [и др.]. Histone H4 Tails in Nucleosomes: a Fuzzy Interaction with DNA // *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*. 2021. № 12 (60). С. 6480–6487.

23. Schrodinger The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 // 2015.

24. Schwämmle V. [и др.]. Systems Level Analysis of Histone H3 Post-translational Modifications (PTMs) Reveals Features of PTM Crosstalk in Chromatin Regulation // *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*. 2016. № 8 (15). С. 2715–2729.

25. Sousa da Silva A. W., Vranken W. F. ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interface // *BMC Research Notes*. 2012. № 1 (5). С. 367.

26. Warnecke A. [и др.]. PyTMs: a useful PyMOL plugin for modeling common post-translational modifications // *BMC Bioinformatics*. 2014. № 1 (15). С. 370.

27. Widom J. Role of DNA sequence in nucleosome stability and dynamics // *Q Rev Biophys*. 2001. № 3 (34). С. 269–324.

28. Xiong Y., Shabane P. S., Onufriev A. V. Melting Points of OPC and OPC3 Water Models // *ACS Omega*. 2020. № 39 (5). С. 25087–25094.