

Моделирование влияния ремоделлера Snf2 на конформационную подвижность нуклеосомы

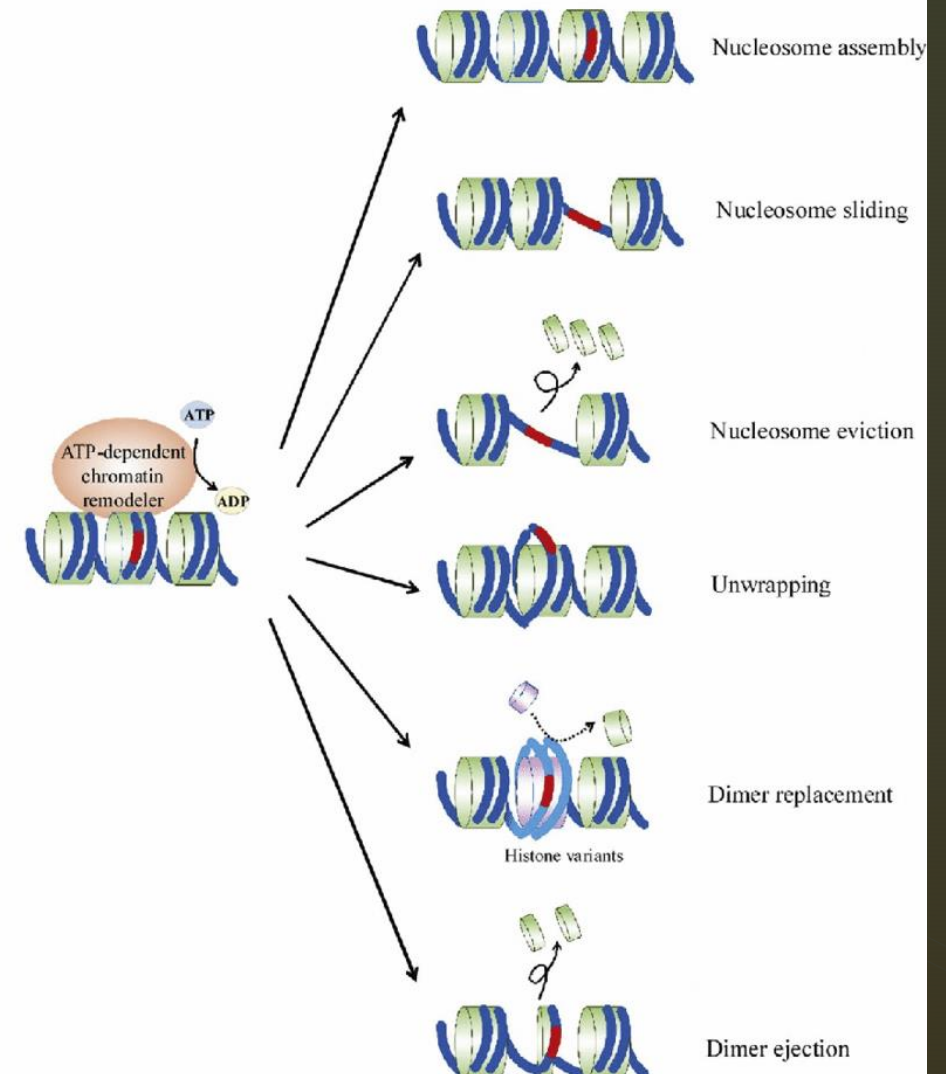
Выходцев Григорий

Ремоделлеры хроматина

- АТФ-зависимые белковые комплексы относящиеся к семейству хеликаз SF2
- Связываются с нуклеосомой
- Регулируют состояние хроматина, ответственны за состав нуклеосом и их положение на ДНК
- Основные подсемейства: SWI/SNF, ISWI, CHD, INO80.

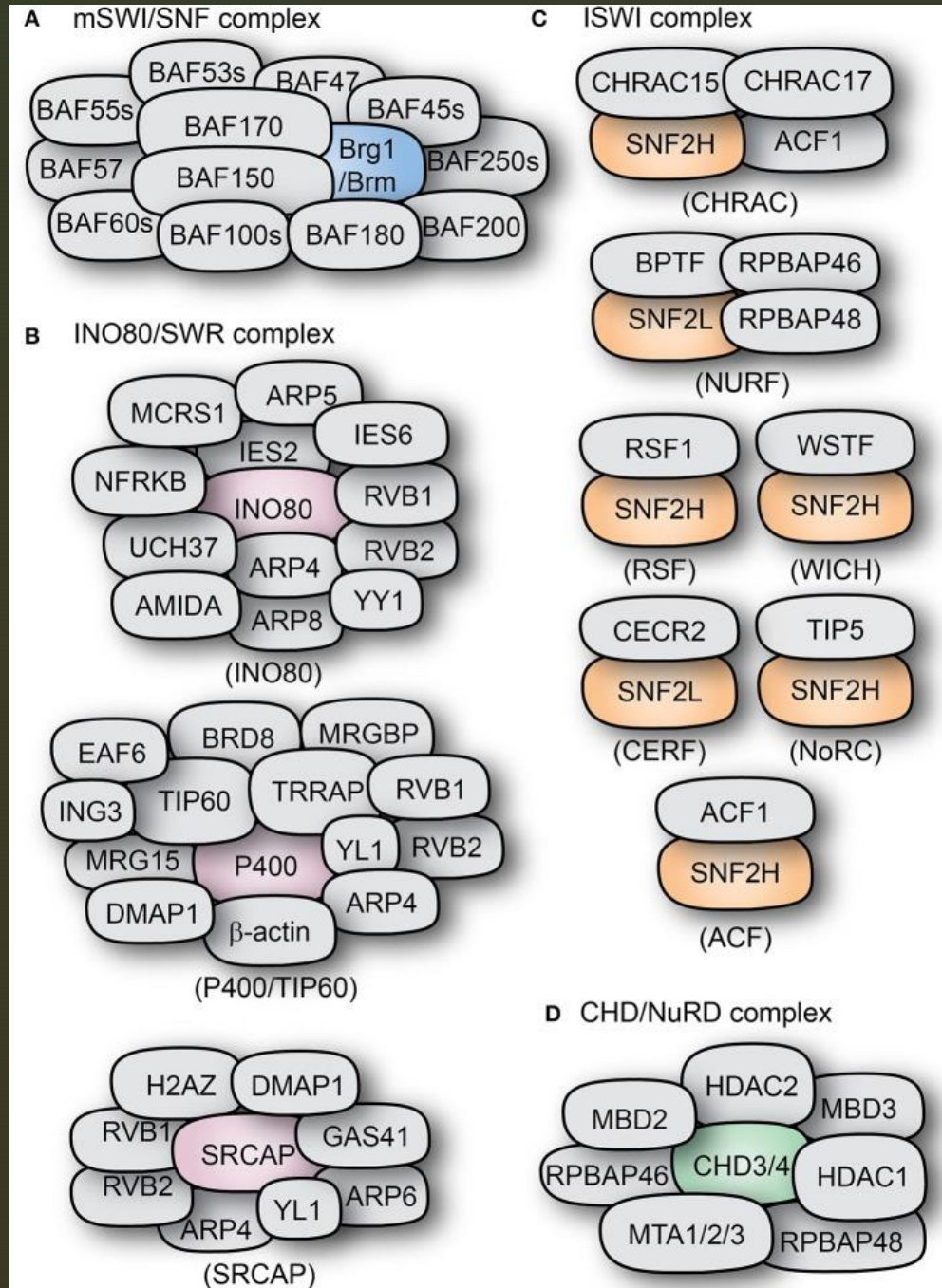
[10.1016/bs.apcsb.2016.08.006](https://bs.apcsb.2016.08.006)

Consequences of ATP-dependent chromatin remodeling



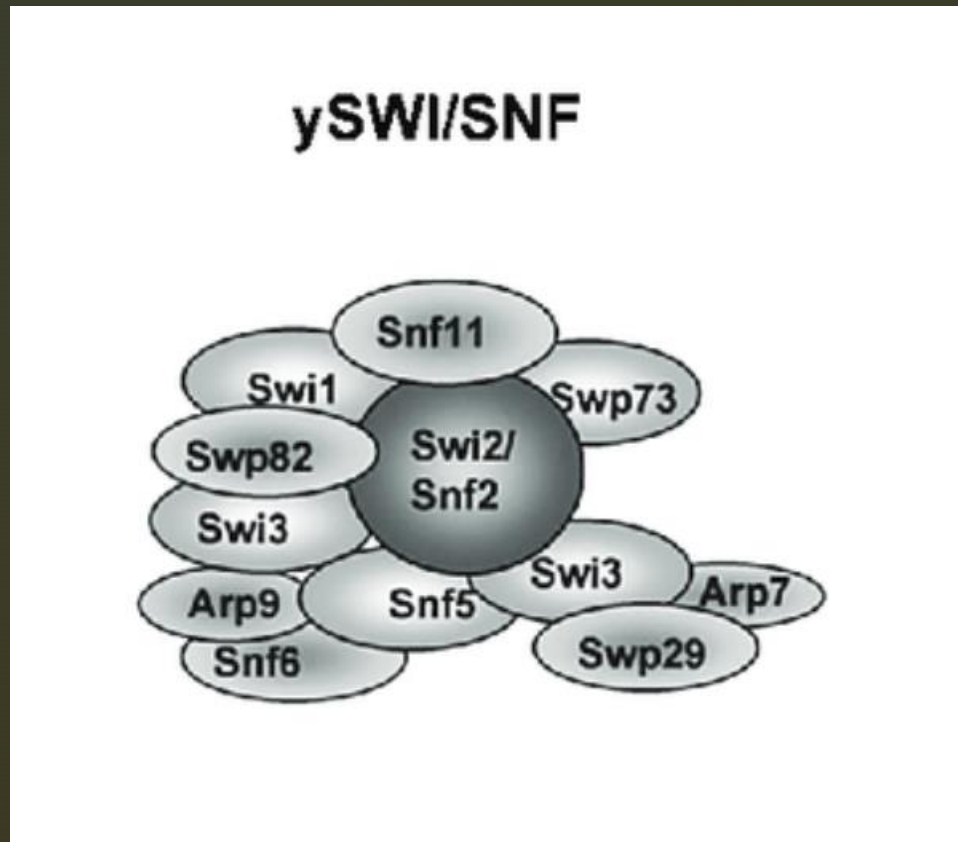
- Ремоделлеры крупные многосубъединичные комплексы. Их состав варьируется

<https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00226>

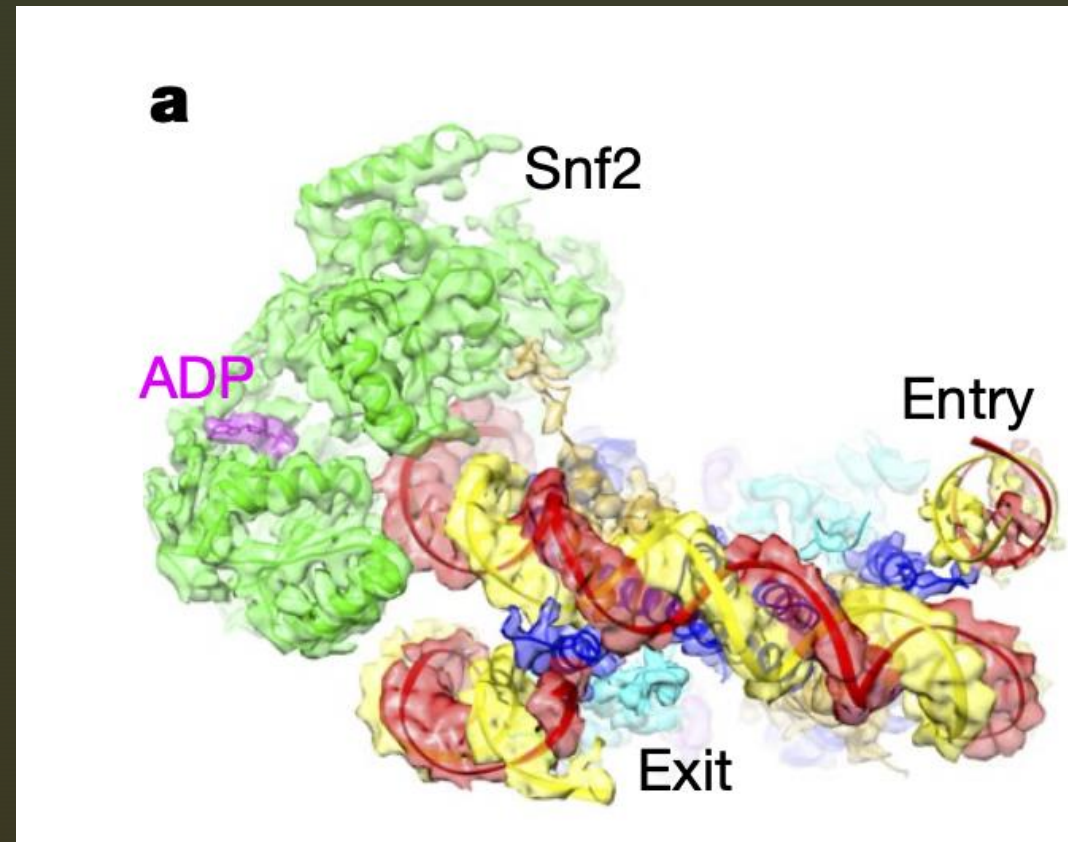


Snf2

- Snf2 – моторная субъединица комплекса SWI/SNF



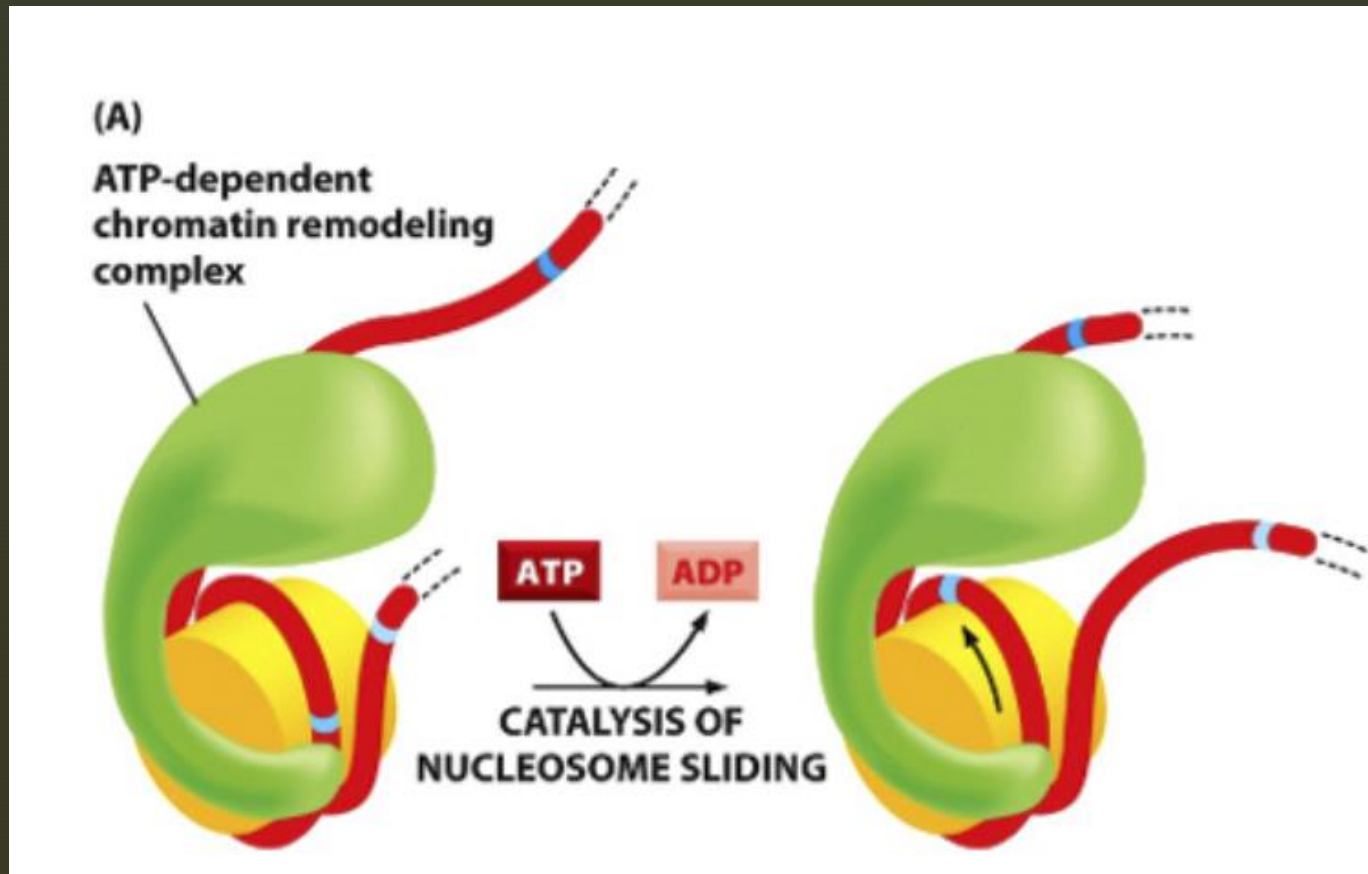
[10.1101/sqb.2004.69.183](https://doi.org/10.1101/sqb.2004.69.183)



<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1029-2>

Функции Snf2

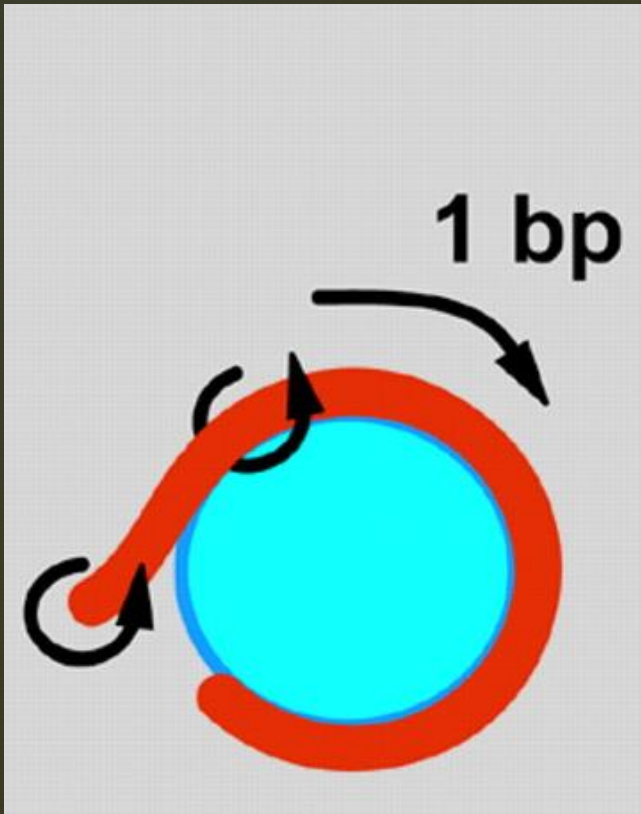
- Связываясь с нуклеосомой, смещает нуклеосому вдоль ДНК (Nucleosome sliding)



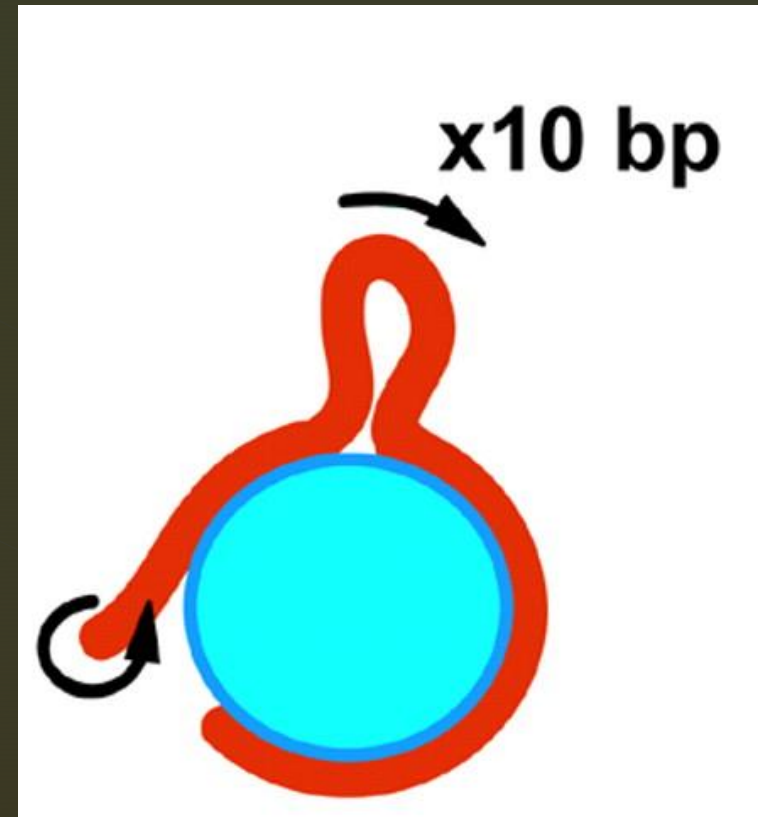
Общая схема процесса

Nucleosome sliding. Основные теории механизма.

- Twist defect diffusion

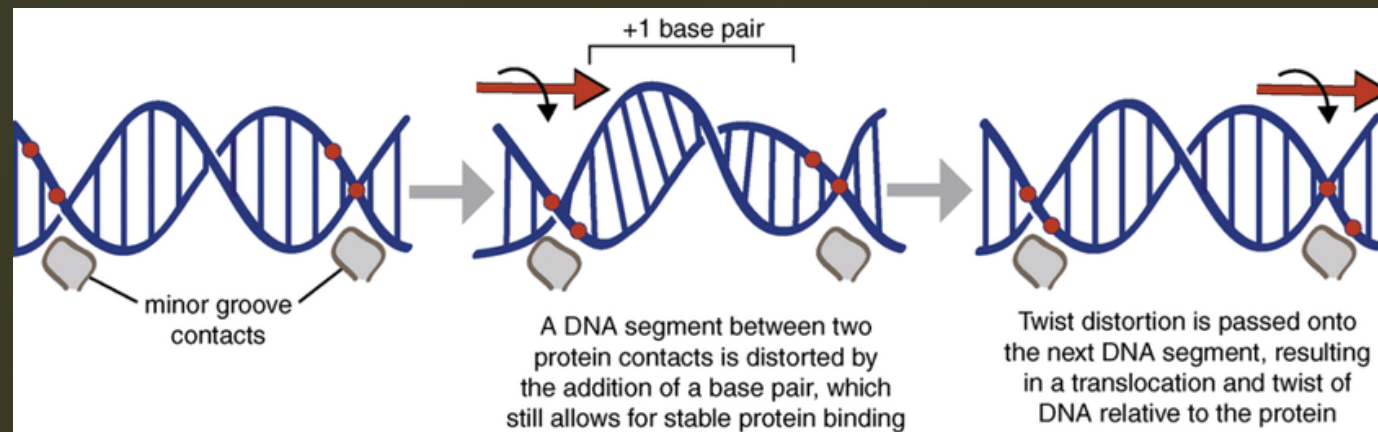
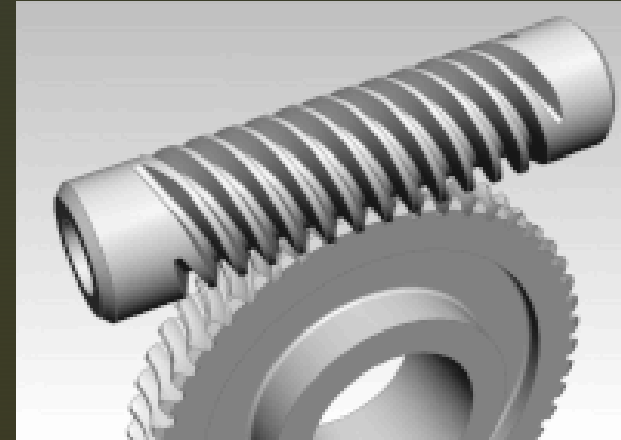


- Bulge propagation



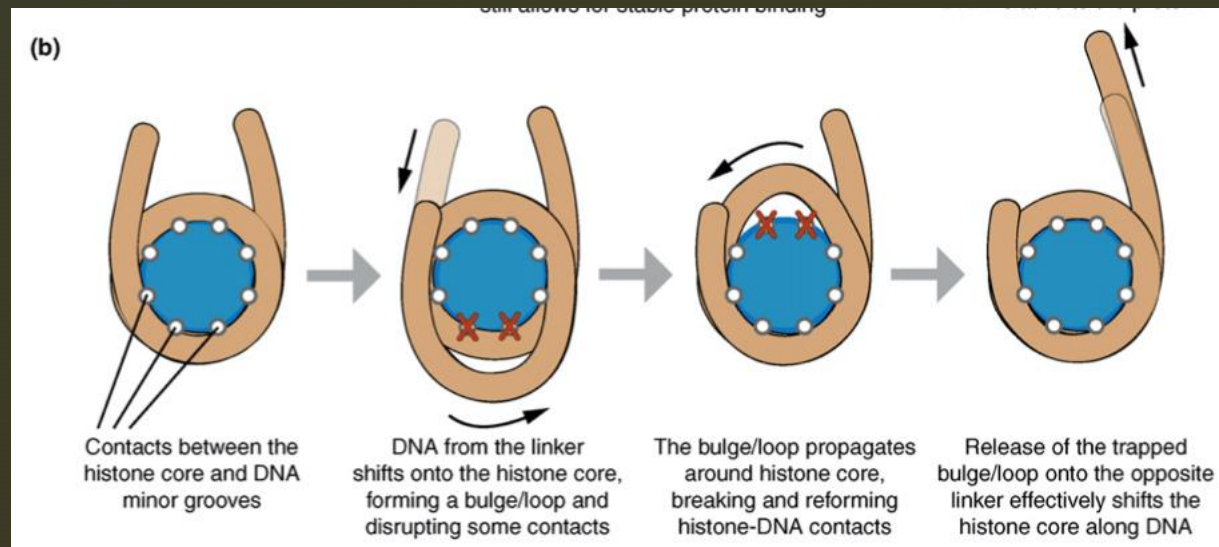
Twist diffusion model

- В месте связывания с ремоделлером в ДНК образуется «скручивание», которое продвигает ДНК вперед
- Работает по аналогии с червячной передачей



Bulge/loop propagation model

- Часть ДНК, отщепляясь от нуклеосомы, образует «петлю», которая, продвигаясь по нуклеосоме, двигает ДНК вперед

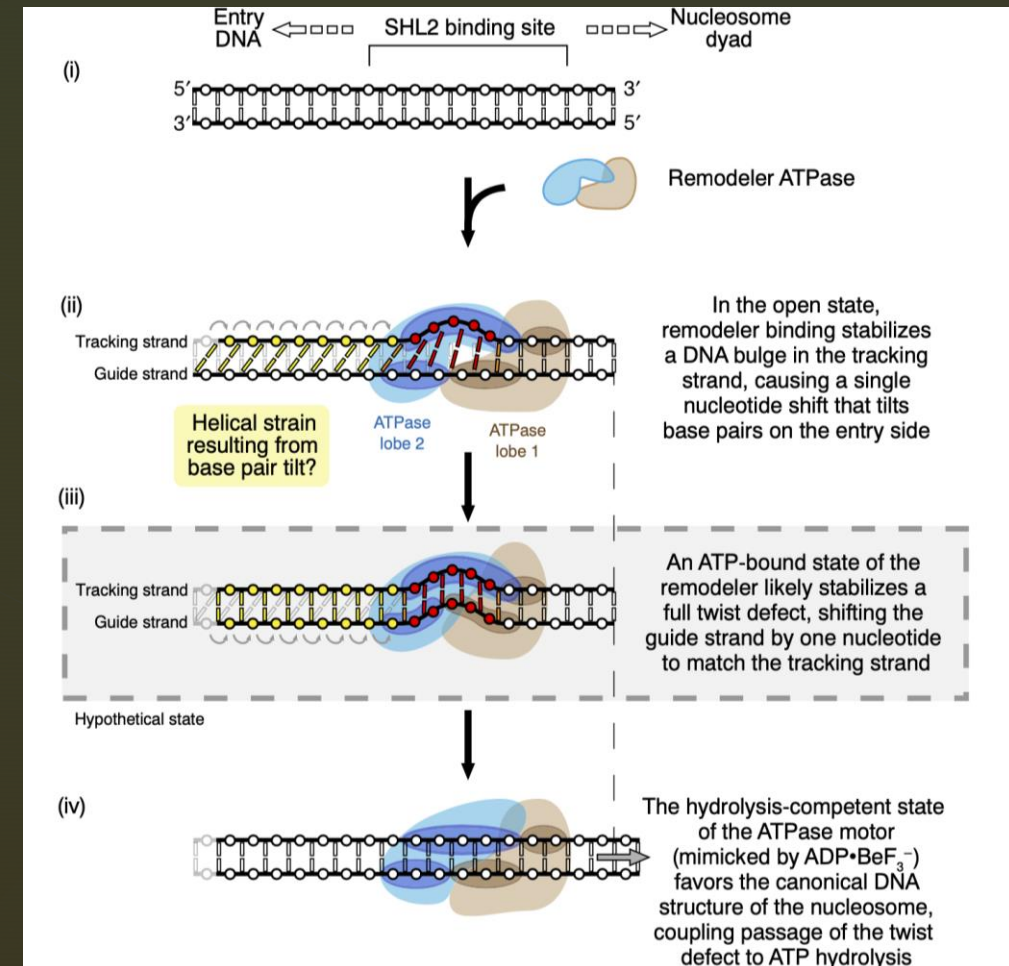


<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.12.002>

Механизм скольжения нуклеосом, осуществляемый Snf2

Общая схема механизма

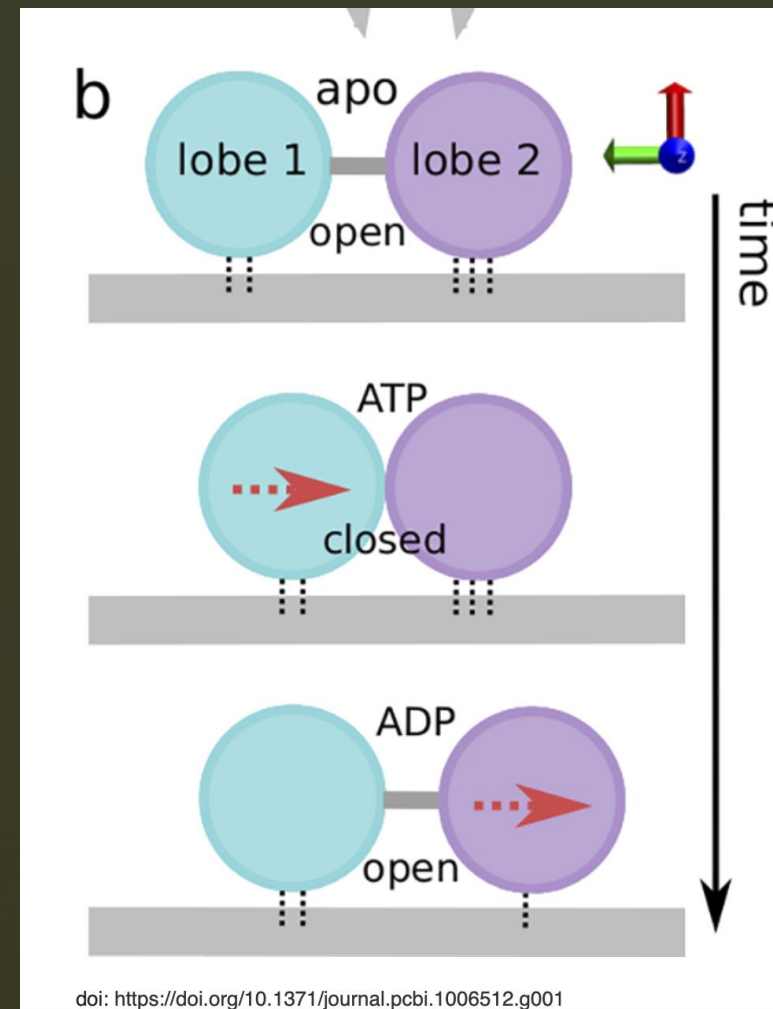
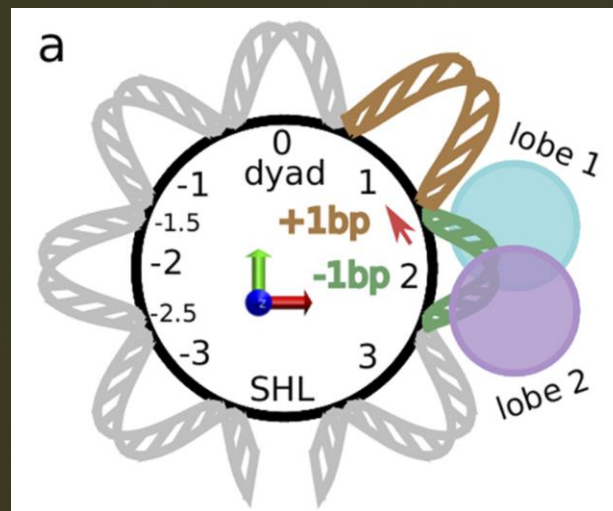
- Последние исследования показывают, что механизм скольжения нуклеосом, осуществляемый Snf2, не относится к вышеперечисленным моделям
- Данный механизм является чем-то средним между двумя предыдущими моделями



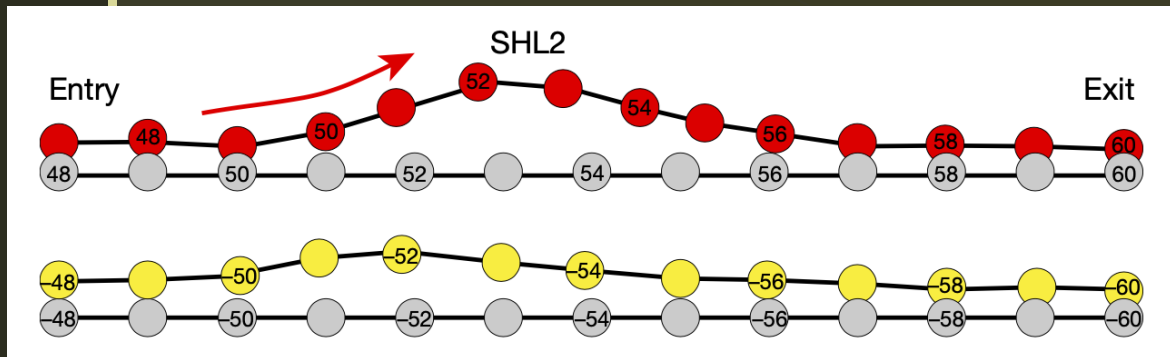
Механизм скольжения нуклеосом, осуществляемый Snf2

- Snf2 имеет две подвижные доли (lobe) и может существовать в открытой и закрытой форме, в зависимости от того, что с ним связано (ATP, ADP, apo)
- Snf2 связывается с нуклеосомой в SHL2 ДНК

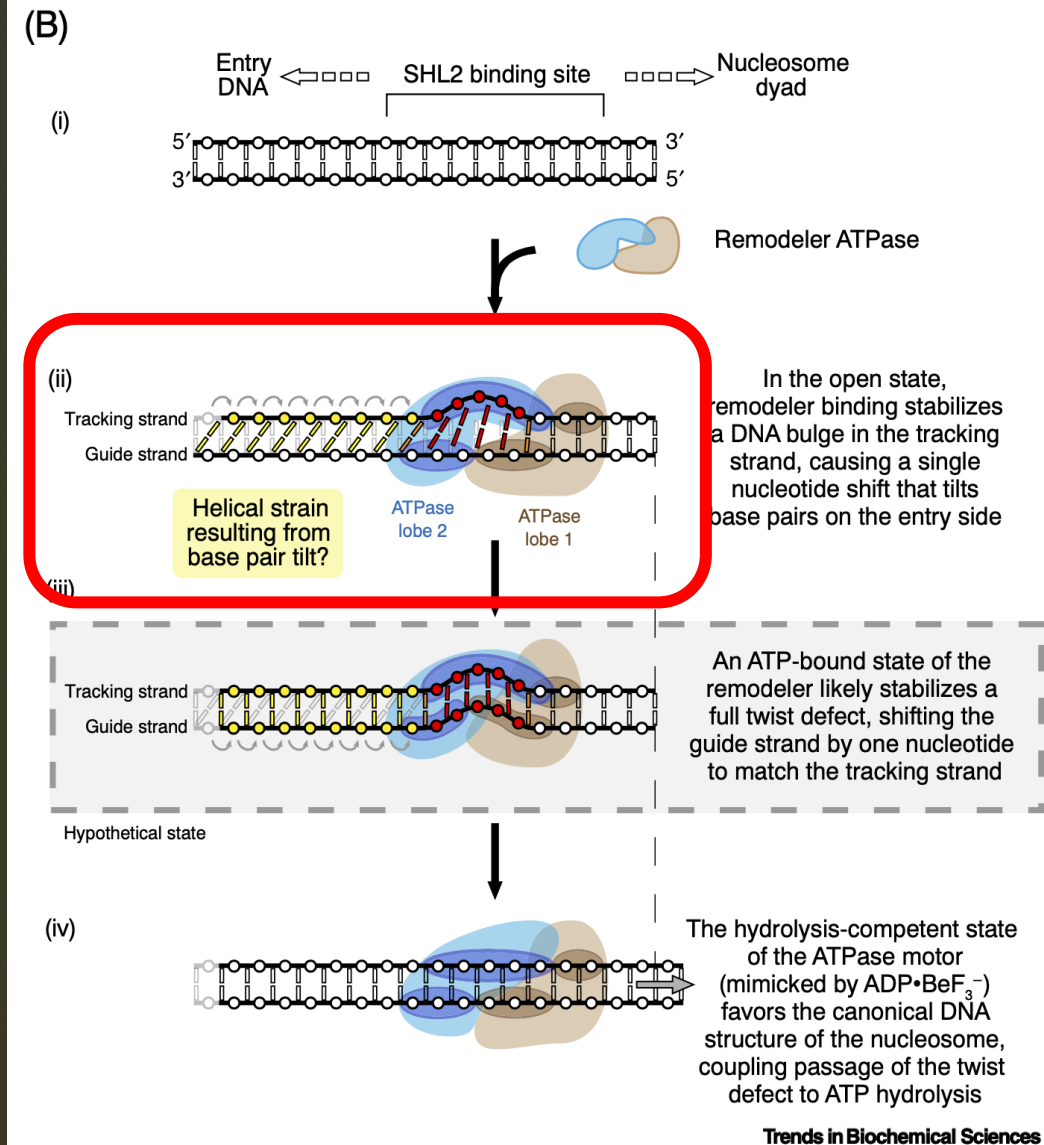
SHL – superhelix location



- Snf2 связывается с нуклеосомой в SHL2, вызывая впячивание одной из цепей ДНК, называемой «ведущей» (Tracking strand).
- Комплементарная ей цепь называется «ведомой» (Guide strand).

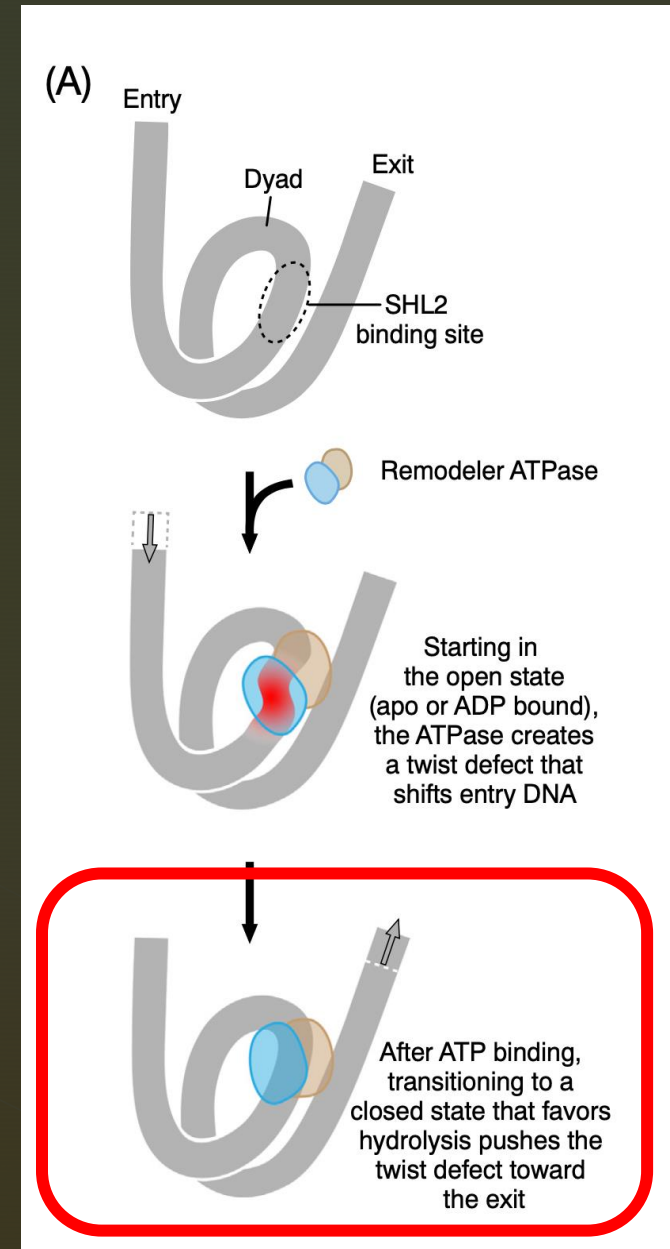
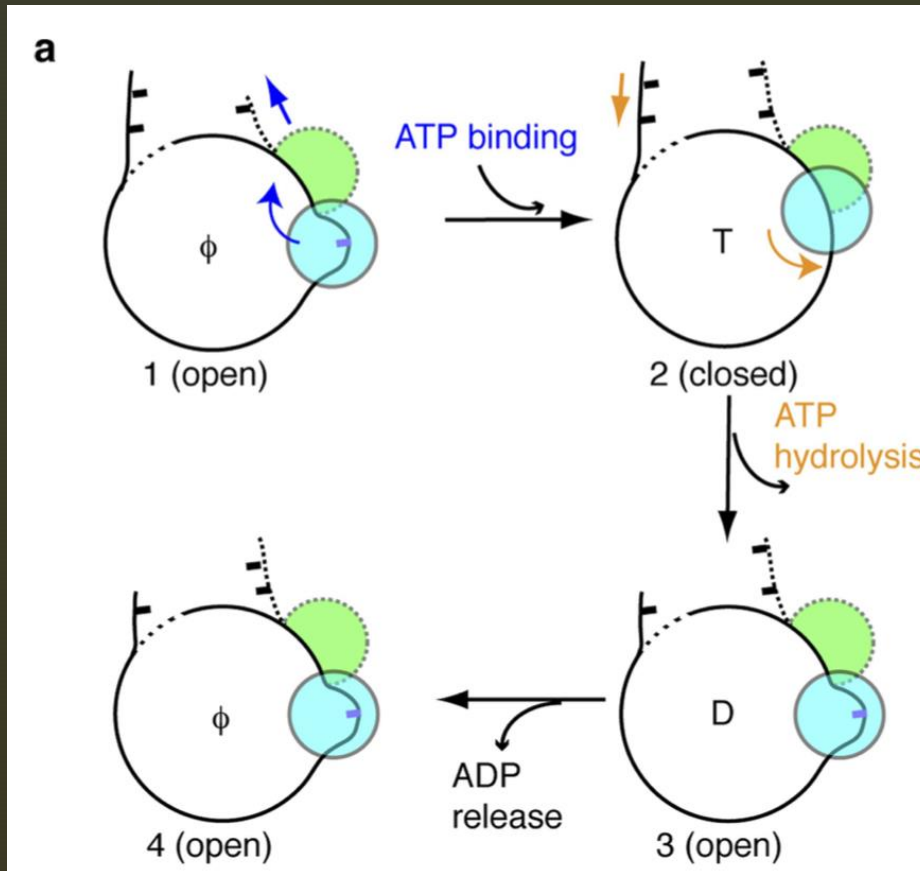


<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1029-2>



<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.05.001>

- При связывании с АТФ Snf2 переходит в закрытую форму, избавляясь от впячивания и продвигая ДНК к выходу из нулеосомы.
- Дальнейшее фосфорилирование и отщепление ADP возвращают Snf2 в открытую форму, готовую к следующему циклу.



Болезни ассоциированные с Snf2

- Синдром Коффина–Сириса
- Синдром Ретта
- Шизофрения
- Микроцефалия
- Расстройство аутистического спектра



15-летняя девочка с синдромом Ретта

Болезни ассоциированные с Snf2

Subfamily	Gene	Protein	Associated Disease
ISWI	<i>SMARCA1</i> ,	SNF2L,	Microcephaly, Rett
	<i>SMARCA5</i>	SNF2H	syndrome, Schizophrenia and Autism spectrum disorder (ASD)

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114200>

Coffin-Siris syndrome; MRD12; MRD14; MRD15; MRD16	SMARCB1 (BAF47, SNF5L1); SMARCA4 (BRG1, BAF190A, SNF2B); SMARCA2 (BRM, BAF190B, SNF2A); ARID1A (BAF250A); ARID1B (BAF250B)	De-regulated chromatin state via mutations in SWI/SNF remodelers	Developmental delay, intellectual disability, speech impairment, absent or hypoplastic fifth fingernails or toenails, hypotonia, hirsutism	135900 614562 614607 614608	Tsurusaki et al. (2012)
---	---	--	--	--------------------------------------	----------------------------

<https://doi.org/10.1007/s00412-015-0530-0>

Цели и задачи работы

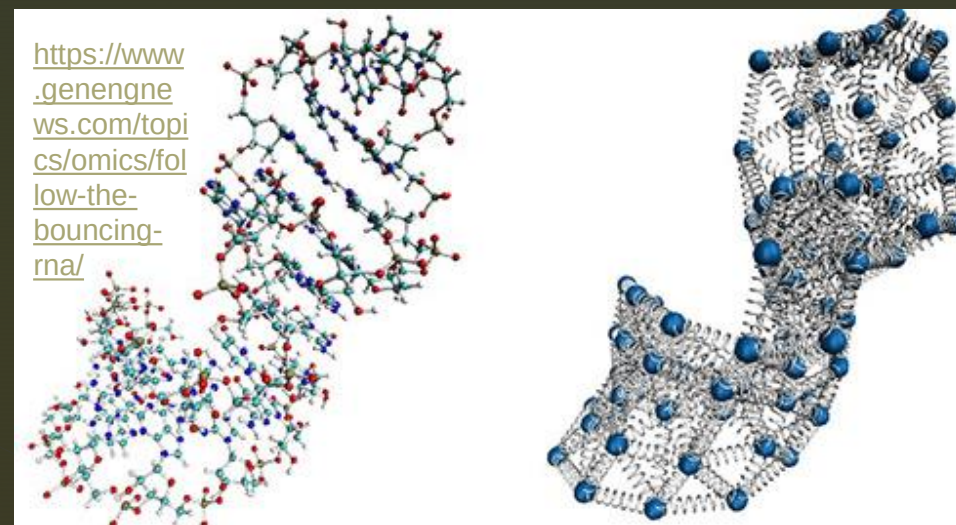
- Цель: Исследовать взаимодействие Snf2 с нуклеосомой, уточнить механизм взаимодействия с нуклеосомой
- Задача: Запустить молекулярную динамику комплекса Snf2-нуклеосома, Snf2 в свободной форме, не связан с АТФ (apo state)

Методы. Молекулярная динамика.

- Для изучения взаимодействия комплекса Snf2-белок использовался метод молекулярной динамики (MD)
- Метод основан на представлении молекул в качестве совокупности твердых тел (атомов), взаимодействующих друг с другом на основе различных потенциалов.
- Для расчета траекторий молекул используется классическая механика (уравнения Ньютона и Лагранжа)

$$\vec{F} = m * \vec{a}$$

Второй закон Ньютона



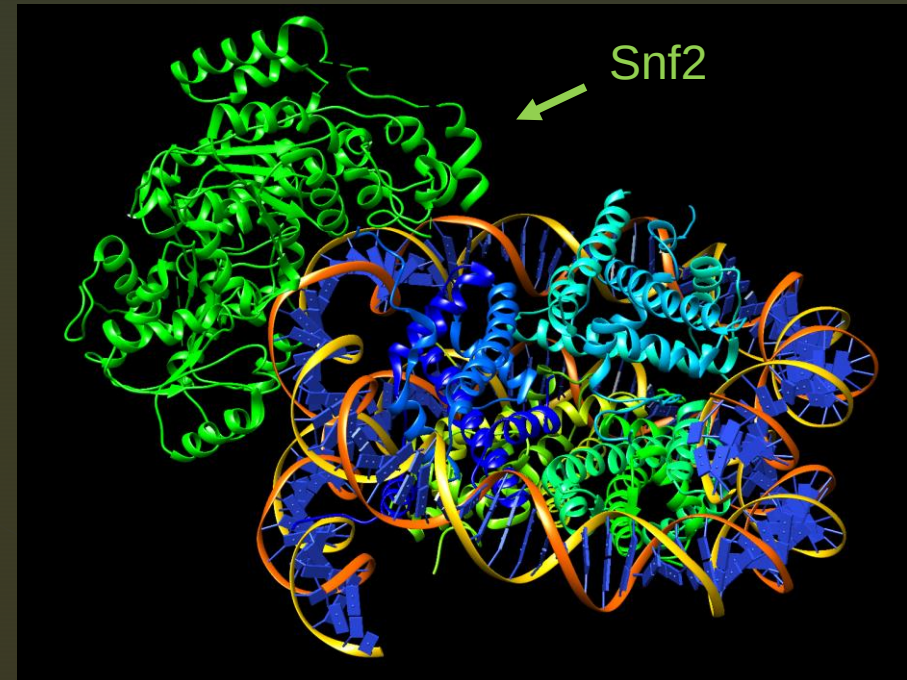
Различные потенциалы между атомами

$$E_{tot} = \underbrace{\sum_{bonds} K_r (r - r_{eq})^2 + \sum_{angles} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 + \sum_{dihedrals} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)]}_{\text{Bonded}} + \underbrace{\sum_{i < j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right]}_{\text{Non-bonded}}$$

A) B) C) D) E)

Моделируемая структура

- Использовалась структура комплекса Snf2-нуклеосома 5Z3L (PDB ID)
- Разрешение 4.31 Å, Крио-ЭМ
- Гистоновые хвосты укорочены
- Данная структура имеет промежутки в структуре Snf2 и неполные АК остатки из-за низкого локального разрешения карты эл. плотности
- Для достройки АК остатков использовалась программа FoldX, функция PDBRepair
- Промежутки достраивались Григорием Армеевым при помощи программы Phenix

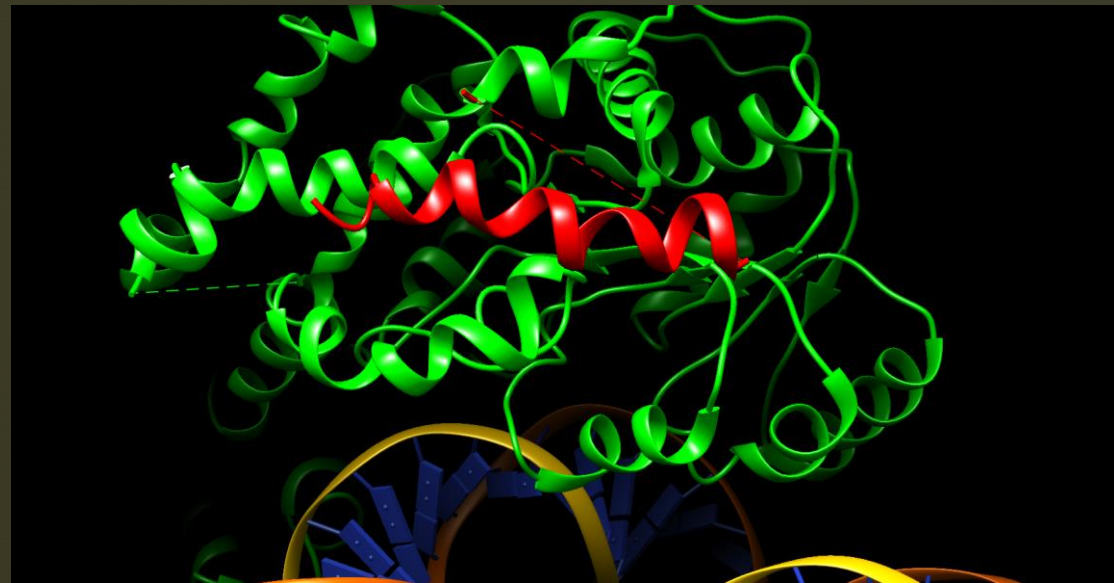


Моделируемая структура

- Для моделирования белок Snf2 обрезался с N-конца из-за большого невосстанавливаемого промежутка в структуре
- Обрезанная часть не контактирует ДНК

Большой промежуток

chain O	666	AYIKLLDQTKDTRITHLLRQTNAFLDSLTRAVKDQQKYTKEMIDSHIKEA
chain O	716	SEEVDDLSPVPMKDEEYDDDDNSNVYYNVAHRTKEDTKKQPSILVGG
chain O	766	TLKDYQIKGLQWMVSLFNNHNLGILADEMGLGKTIQTISLLTYLYEMKNI
chain O	816	RGPYLVIVPLSTLSNWSSEFAKWAPTLRTISFKGSPNERKAKQAKIRAGE
chain O	866	FDVVLTTFEYTIKERALLSKVKWVHMTIDEGHRMKNAQSKLSLTINTHYH



Красным отмечена обрезанная часть

Используемое программное обеспечение

- Для запуска MD использовался пакет программ GROMACS версии 2020.1
- Для записи и запуска скриптов использовались «ноутбуки» с расширением .ipynb с помощью JupyterLab
- Все вычисления проводились на общем сервере кафедры

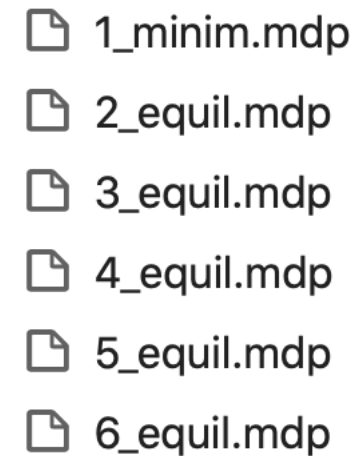


<http://manual.gromacs.org/documentation/>



Этапы подготовки к запуску MD

- Перед запуском MD структура прошла подготовку через 6 этапов (1 этап минимизации и 5 эквilibрации)
- На этапе минимизации мы получаем минимальную по энергии конформацию
- На этапе эквilibрации производим релаксацию молекул растворителя и ионов вокруг макромолекулы
- Данные этапы нужны, чтобы в структуре не было излишне сильных взаимодействий, которые приведут к дестабилизации системы



A list of six files, each preceded by a document icon, representing the stages of MD simulation preparation: 1_minim.mdp, 2_equil.mdp, 3_equil.mdp, 4_equil.mdp, 5_equil.mdp, and 6_equil.mdp.

- 1_minim.mdp
- 2_equil.mdp
- 3_equil.mdp
- 4_equil.mdp
- 5_equil.mdp
- 6_equil.mdp

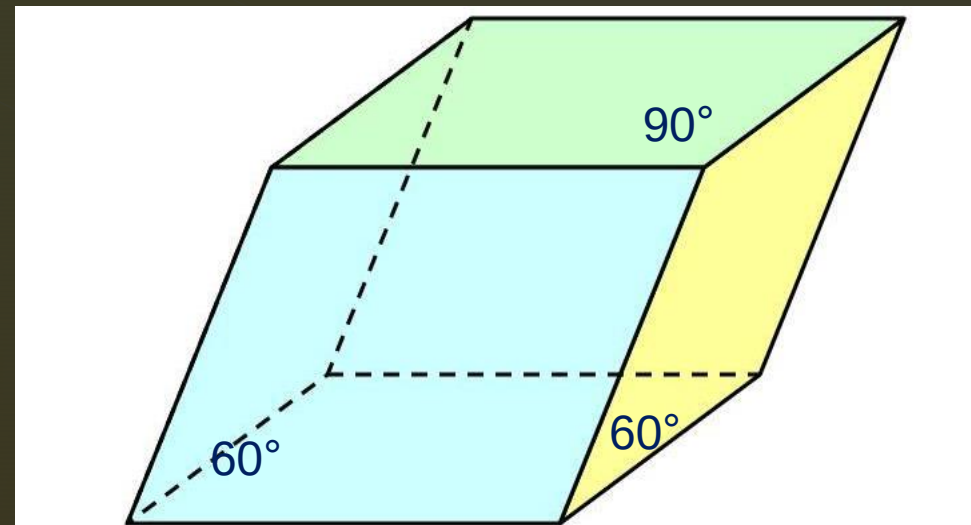
Протоколы подготовки структуры

Параметры MD

- Силовое поле: Amber14SB
- Интегратор: MD (алгоритм Leap-frog)
- Шаг интегрирования: 0.002 пс
- Термостат: V-rescale
- Баростат: Паринелло-Рахмана
- Температура: 300K (27 C)
- Частота записи траектории: 500 000 шагов в 1нс
- Periodic Boundary Conditions: Rhombic Dodecahedron 2 нм

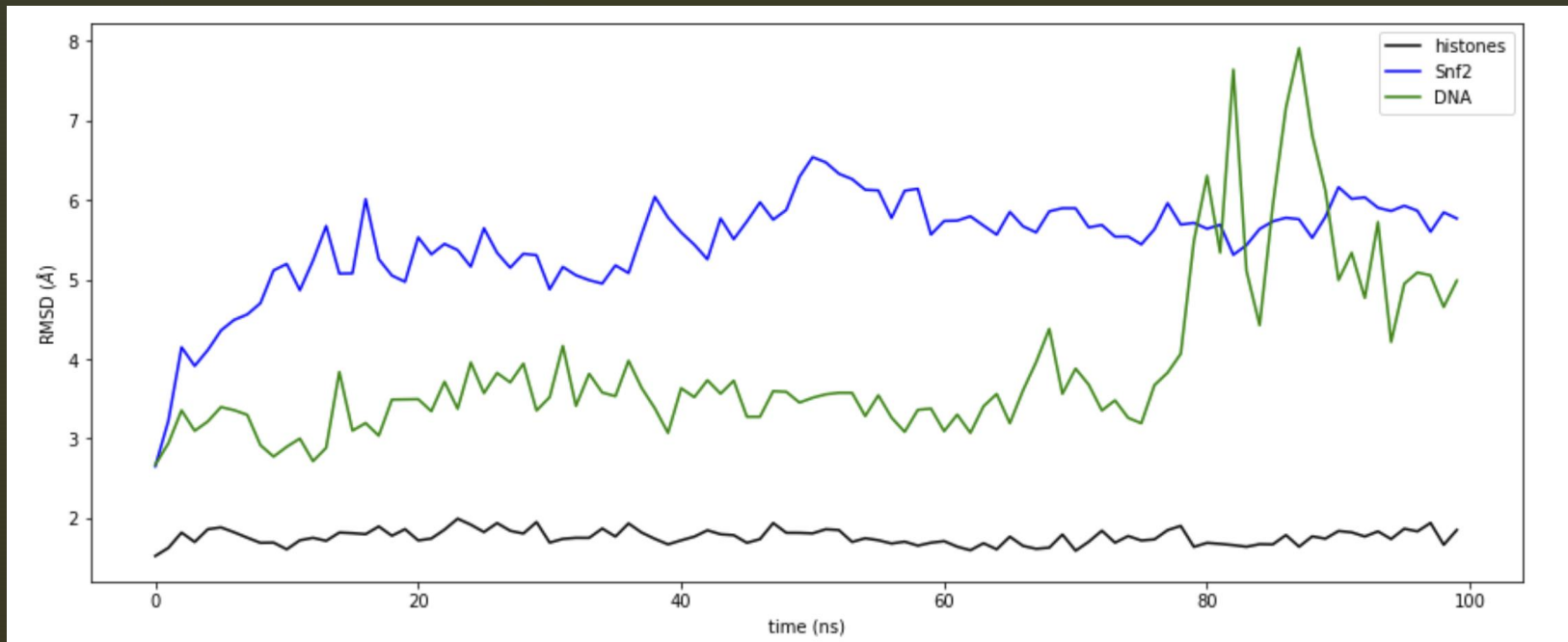
```
ff_name='amber14sb_parmbsc1_cufix'
```

- Время моделирования: 100 нс
- Кол-во молекул растворителя: 138 138
- Кол-во ионов: 967
- Всего атомов: 447 206



Результаты MD

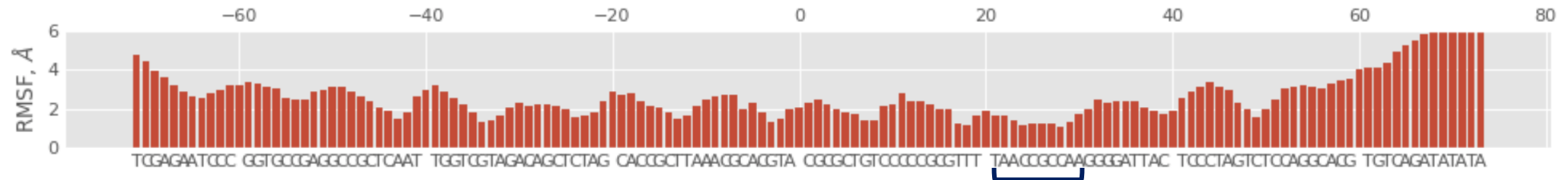
- Среднеквадратическое отклонение (подвижность) гистонов, ДНК и Snf2 на протяжении всей динамики



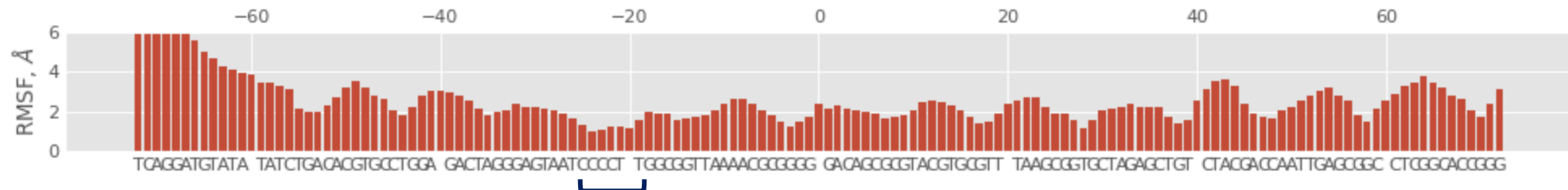
Результаты MD

- Среднеквадратичные флуктуации (подвижность) отдельных нуклеотидов ДНК

Chain I P RMSF



Chain J P RMSF

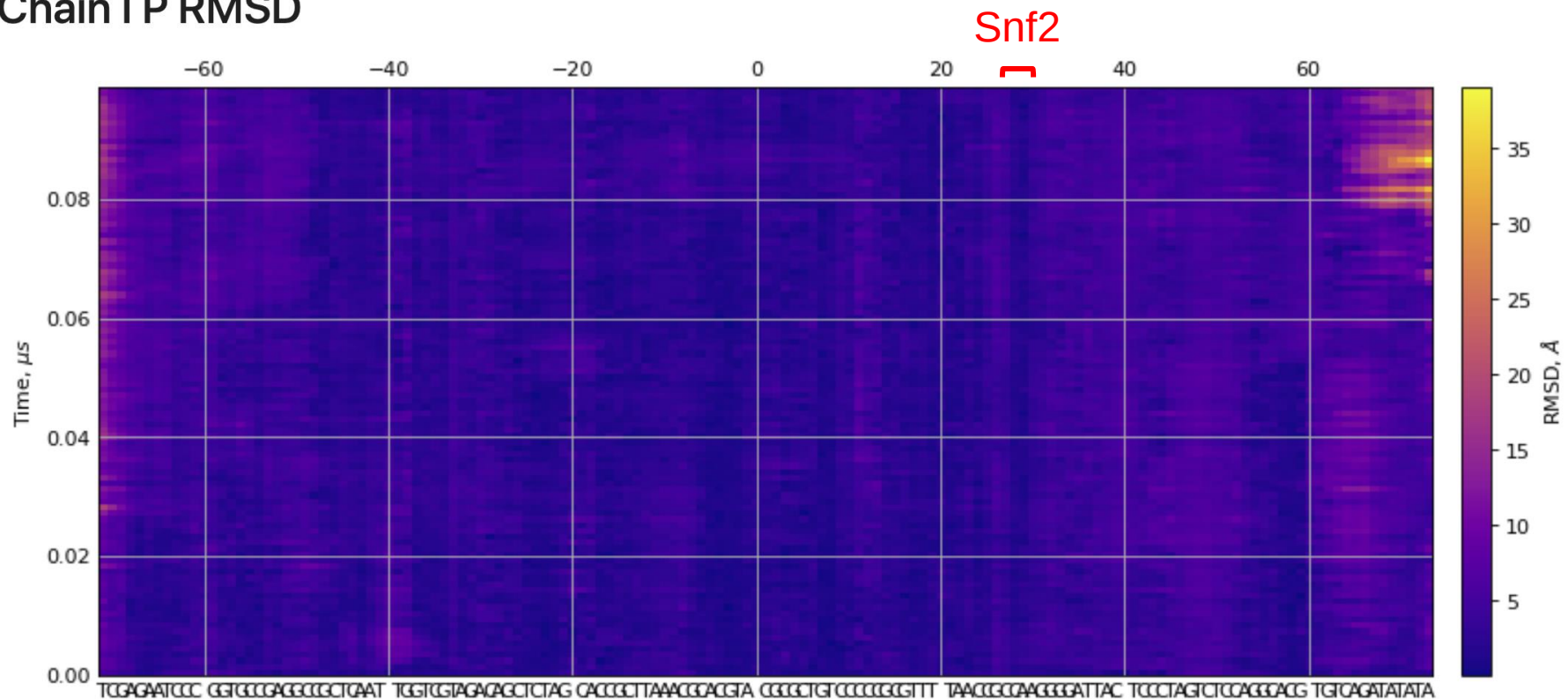


Синим выделена область связывания Snf2 с ДНК

Результаты MD

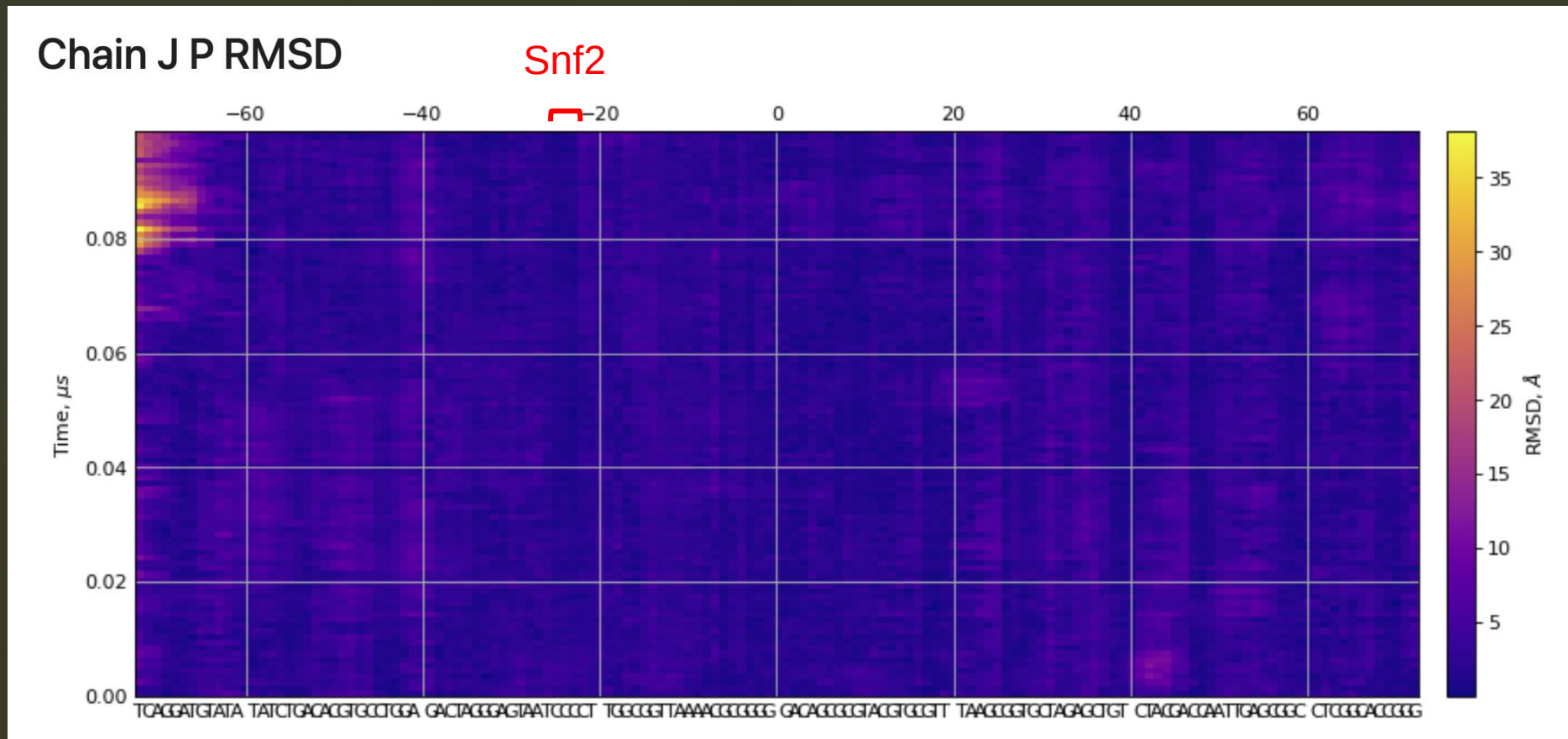
- Среднеквадратичные флуктуации (подвижность) отдельных нуклеотидов ДНК на протяжении всей динамики

Chain I P RMSD



Результаты MD

- То же самое для комплементарной цепи ДНК

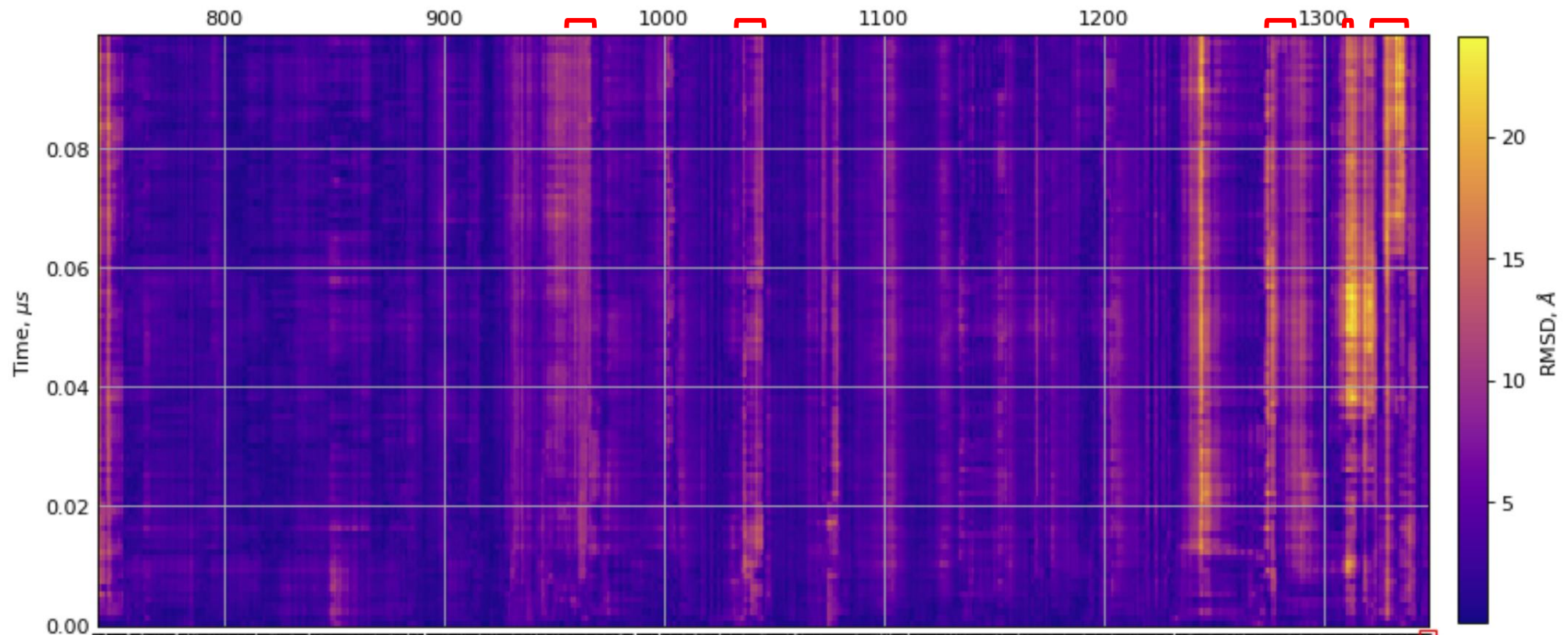


Результаты MD

- Среднеквадратичные флуктуации (подвижность) отдельных АК Snf2

Chain O CA RMSD

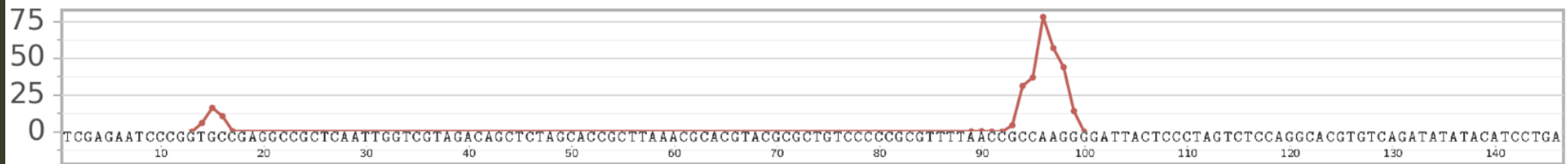
Достроенные участки



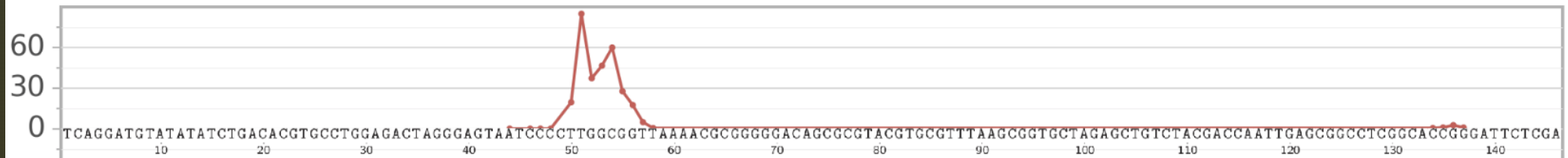
Результаты MD

- Контакты Snf2 с цепями ДНК

Segid: I, Type: DNAtop



Segid: J, Type: DNAbot



Результаты летней практики

- Подготовлена к моделированию структура комплекса Snf2-нуклеосома
- Произведено моделирование комплекса длительностью 100 наносекунд
- Произведен первичный анализ траекторий