

## СТРУКТУРА КОМПЛЕКСОВ БЕЛКА DPS С ДНК

© 2019 г. Э. В. Терешкин<sup>1\*</sup>, К. Б. Терешкина<sup>1</sup>, В. В. Коваленко<sup>1</sup>,  
Н. Г. Лойко<sup>1,2</sup>, Ю. Ф. Крупянский<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт химической физики им. Н.Н. Семёнова Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup>Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”  
Российской академии наук, Москва, Россия

\*E-mail: ramm@mail.ru

Поступила в редакцию 01.04.2019;

после доработки 01.04.2019;

принята в печать 22.04.2019

Рассмотрены механизмы взаимодействия молекул белка DPS (DNA-binding Protein from Starved cells) с ДНК, важные для понимания защиты генетического материала бактерий в условиях стресса. Результаты молекулярно-динамического исследования комплексов белков DPS *E. coli* с ДНК показали, что основную роль в связывании молекул ДНК с молекулами DPS играют аминокислотные остатки Lys8, Lys10, расположенные в неупорядоченной части N-концов DPS, и Lys27 – в его упорядоченной части. Координирующее действие оказывает пара остатков Asp23–Ser24. Обнаружены сильное перераспределение ионов Na<sup>+</sup> из внешней части расчетной ячейки внутрь молекул DPS и их преимущественное связывание с аминокислотными остатками His63 и Glu82, координирующими сайт связывания ферроксидазного центра, что может уменьшить эффективность связывания ионов железа этим центром. Изучение полученной недавно авторами трехмерной структуры кристаллов белка DPS *E. coli* (PDB ID: 6GCM) показывает наличие трех типов взаимно ортогональных каналов: широкого и двух узких. Присутствие ДНК в широких каналах, в отличие от узких, не разрушает, а стабилизирует кристалл. Стабилизация кристалла происходит за счет формирования дополнительных взаимодействий между N-концевыми участками одной молекулы DPS с ДНК и с другой молекулой DPS.

**Ключевые слова:** внутриклеточная нанокристаллизация, белок DPS, ДНК, молекулярная динамика, взаимодействие DPS с ДНК, кристаллы DPS.

**DOI:** 10.1134/S0207401X19100091

### 1. ВВЕДЕНИЕ

Защита и воспроизведение генетической информации в бактериальной клетке происходит при участии ДНК-ассоциированных белков, которые вместе в самой молекулой ДНК составляют особый компартмент – нуклеоид. Многие белки нуклеоида участвуют как активаторы и ингибиторы в процессах транскрипции, т.е. воспроизведения генетического материала. Большинство из них способно изменять конформацию ДНК, обеспечивая эффективное протекание биохимических процессов или стабилизируя ее структуру. При этом почти все из нуклеоид-ассоциированных белков функционируют в димеризованном состоянии и распознают “нужный” участок ДНК, исходя либо из ее нуклеотидной последовательности, либо из ее конформации (например, изгиба). В 1992 г. у бактерий *Escherichia coli* (*E. coli*) был обнаружен уникальный по структуре и функциям олигомерный нуклеоид-ассоциированный белок, названный DPS (DNA-binding Protein from Starved

cells) [1]. Этот белок защищает клетку от окислительного стресса путем инактивации потенциально опасных ионов Fe<sup>2+</sup> и обеспечивает внутриклеточную кристаллизацию нуклеоида.

Так как этот белок был впервые выделен и описан при исследовании белков, синтезированных клетками трехдневных культур бактерий *E. coli* при стрессе голодания, он был назван ДНК-связывающим белком голодающих клеток. Было показано, что во время экспоненциальной фазы роста бактерий *E. coli* DPS является второстепенным компонентом нуклеоида, однако во время стационарной фазы его концентрация резко (до 300 раз) возрастает до тех пор, пока он не станет преобладающим нуклеоид-ассоциированным белком [2]. При этом его концентрация достигает 180000 молекул на бактериальную клетку. Такое количество белка необходимо клетке для обеспечения биокристаллизации – особого механизма стабилизации нуклеоида, при котором нуклеоид с помощью белков упаковывается в компактную,

чрезвычайно стабильную структуру. Находясь в кристаллизованном состоянии, нуклеоид бактерий практически не подвержен никаким воздействиям и не может быть поврежден. Бактериальная клетка при этом не погибает и способна существовать в таком состоянии долгое время. До тех пор, пока условия окружающей среды не сменяются на благоприятные, что позволит бактерии выйти из кристаллизованного состояния и образовать новую колонию. Именно механизм биокристаллизации, по-видимому, создает серьезные трудности при борьбе с бактериальными инфекциями, значительно увеличивая устойчивость бактерий к антибиотикам во время стационарной фазы роста.

## 2. СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ БЕЛКОВ DPS

### 2.1. Структура

Белок DPS представляет собой додекамер, состоящий из идентичных субъединиц. Исследования бактерий и архей выявили широкое распространение белков семейства DPS и гомологичных им белков среди представителей этих доменов. Кристаллическая структура DPS *E. coli* была впервые расшифрована в 1998 году методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 1.6 Å [3]. Было показано, что белок DPS формирует шарообразные гомододекамеры с полостью внутри, похожие на ферритин. Расположение субъединиц таково, что белок относится к тритетраэдрической точечной группе симметрии (23-й класс по международной классификации).

На рис. 1 показаны структура и относительные размеры 24-мера бактериоферритина *E. coli* (рис. 1а) и 12-мера DPS *E. coli* (рис. 1б). Каждая субъединица белка DPS (рис. 1в) состоит из четырех длинных  $\alpha$ -спиралей, расположенных параллельно друг другу, и одной малой  $\alpha$ -спирали, перпендикулярной им [4]. Буквами N и C на рис. 1 обозначены N-концевой и C-концевой участки молекулы, первые из которых состоят из упорядоченной и неупорядоченной частей. Упорядоченная часть каждого N-конца (с 14-го по 25-й аминокислотные остатки) легко поддается расшифровке методом рентгеноструктурного анализа [3]. Определить трехмерную структуру неупорядоченной части (с 1-го по 13-й аминокислотные остатки) не удастся ни для одной структуры белка DPS. Как было показано в нашей работе [5], это связано с чрезвычайной подвижностью этих областей молекулы. На приведенных рисунках белка DPS (рис. 1а–е) N-концевые фрагменты были достроены вручную в молекулярном редакторе. Есть данные, что N-концевые и C-концевые участки обеспечивают соединение мономеров в додекамер, связывание додекамеров между собой и ДНК.

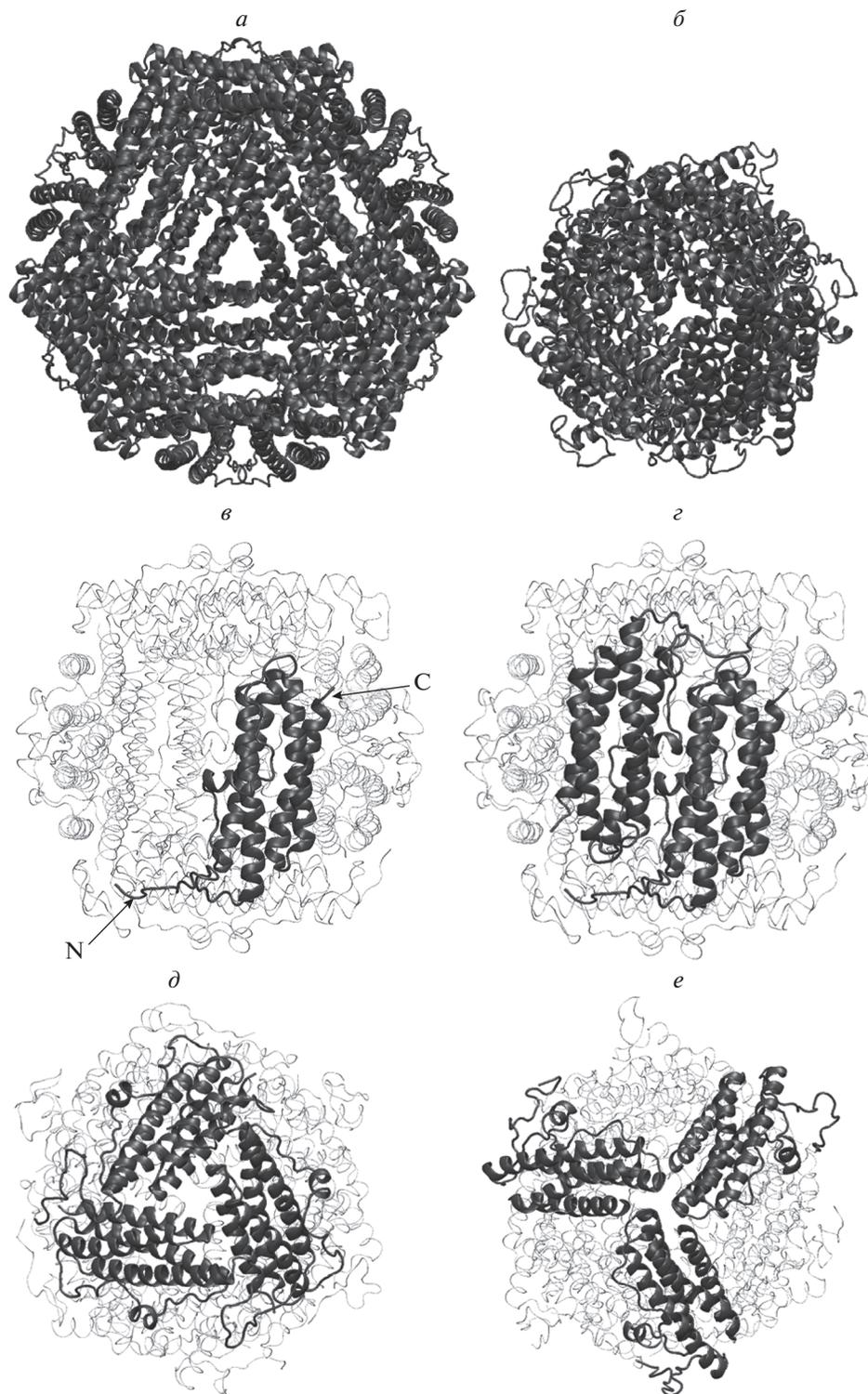
Додекамер белка DPS может быть рассмотрен как куб, “грани” которого сформированы двумя субъединицами (рис. 1з), между которыми находится по два ферроксидазных центра (они расположены на рис. 1з выше и ниже малых  $\alpha$ -спиралей). Каждый из центров разделяется на два сайта связывания  $Fe^{2+}$ . Первый сайт связывания координируется аминокислотными остатками His51, Glu82 и Asp78 и обеспечивает более сильное связывание ионов. Обладающий меньшей эффективностью второй сайт связывания координируется остатками His63 и Glu82. Часто второй сайт оказывается малоэффективным даже при насыщении клетки ионами  $Fe^{2+}$  [2].

Из-за того, что структуры N-концевых и C-концевых частей молекулы несимметричны относительно друг друга, по “углам” куба образуется два типа пор: ферритинового типа (рис. 1д) и DPS-типа (рис. 1е). Ближайшие к N-концам  $\alpha$ -спирали трех мономеров формируют пору ферритинового типа (сравните рис. 1а и 1д), внутрь которой со стороны каждого мономера экспонированы остатки аспарагиновой кислоты Asp121, Asp126, Asp130. Функция этой поры – аккумуляция ионов железа. Функция DPS-поры непонятна. Есть предположение, что она может служить для “нанизывания” молекул DPS на нить ДНК.

### 2.2. Ферроксидазная активность

Из-за способности связывать ионы железа, инактивировать их и накапливать во внутрибелковой полости семейства белков DPS относится к суперсемейству ферритина [6]. Также в это суперсемейство входят: белки, гомологичные белку DPS; ферритины; бактериальные ферритины и бактериоферритины [7]. На рис. 2 представлены результаты выравнивания первичных последовательностей различных бактериальных белков, относящихся к суперсемейству ферритинов. Выравнивание проводилось на основе алгоритма HAlign модулем Clustal Omega, встроенным в базу UniProt [8]. Несмотря на относительно малый процент сходства первичных последовательностей представленных белков, часто не превышающий 25%, аминокислотные остатки, отвечающие за связывание  $Fe^{2+}$ , у всех белков DPS совпадают (обозначены стрелками). Находящимися под последовательностями звездочками обозначены позиции, которые имеют один полностью консервативный остаток. Двоеточие указывает на сохранение между группами сильно схожих свойств (оценка  $>0.5$  в матрице PAM250). Точка указывает на сохранение между группами слабо схожих свойств (оценка  $\leq 0.5$  в матрице PAM250).

Основные работы с момента открытия белка DPS были посвящены изучению его функций, связанных с защитой бактериальной клетки от



**Рис. 1.** Структура белков: *a* – 24-мера бактериоферритина, PDB ID: 1BFR; *b–e* – 12-мера белка DPS, PDB ID: 1DPS, достроены N-концевые остатки 1–13 (см. пояснение в тексте); *b* – общий вид додекамера белка DPS; *c* – выделен мономер белка DPS, буквами N и C обозначены N-концевой и C-концевой участки молекулы; *d* – димер белка DPS, формирующий одну из шести “граней” белка; *d* – пора ферритинового типа, формируемая N-концевыми  $\alpha$ -спиралями трех субъединиц; *e* – пора DPS-типа, формируемая C-концевыми  $\alpha$ -спиралями трех субъединиц.

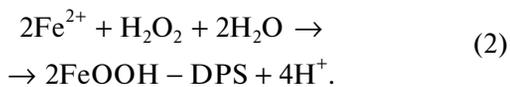
DPS_ECOLI	1	▼▼▼	MSTAKLVKSKA---TNLLYTRNDVSDSEKKATVELLNROVIQ---FIDLS-LITKQAHW	52
BFR_ECOLI	1		-----MKGDTKVINIYNLKLGNELVAINQYFLHARMFKNW	35
FTNA_ECOLI	1		-----MLK-----PEMIEKLNQMNLELYSSL-LY---QQMSAW	30
DPS_HALSA	1		MSTQKNARATAGEVEGSDALRMDAD--RAEQVDALNADLAN---VYVLY-HQLKHHW	53
NAPÄ_BORBU	1		-----MEKYLSEYIKKDDL---DAIQKLQELLAS---LHIFY-SNLRGIHW	39
MRGA_BACCE	1		-----MKTENAKTNTQTLVENSMTQLSN---WFLLY-SKLRHFHW	36
DPS_MYCSM	1		-----MTSFTIPGLSDKKASDVADLLQKQLST---YNDLH-LTLKHHW	40
				*
DPS_ECOLI	53	↓	NM----RG-ANFIAVHEMLDGFRTALIDHLDTMAERAVQLGGVALGTTQVINSKTPKSY	107
BFR_ECOLI	36		GL---KR-LNDVEYHESIDEM-----KHADRYIERILFLEGLPNLQDLG-----	75
FTNA_ECOLI	31		CSYHTFEGAAAFRRRA-QEE-----MTHMQRLFYLDLDTGNLPRINTV-----ESPFAEY	80
DPS_HALSA	54		NV----EG-AEFRDLHLFLGEAAETAEEVADELAEVRQALGGVPHASPETLQAEASVDVE	108
NAPÄ_BORBU	40		NI----KD-TNEFFVIHKKTQKLYEYIEKIIDIVAERSRMLGYDSEFRYSEFMKKSFIKEL	94
MRGA_BACCE	37		YV----KG-PHEFTLHKEFEELYDHAETVDTIAERLLAIGGQPVATLKEYTEHASITDG	91
DPS_MYCSM	41		NV----VG-PNFIGVHEMIDPQVELVRGYADEVAERLAIATLGKSPKGTGPAIIRKDRTWDDY	95
			*	:
DPS_ECOLI	108		PLDI--HNVQDHLKELADRYAIVANDVRKAIGEAKDD-D--TADILTAASRDLE-----	155
BFR_ECOLI	76		-KLNIGEDVEEMLRSDLALELDGAKNLREAIQYADSVHDYVSRDMMIEILRDE-----	127
FTNA_ECOLI	81		SSLD--ELFQETYKHE---QLITQKINELAHAAMTNDQYPTFNFLQWYVSEQHSEKELF	134
DPS_HALSA	109		DEDV--YDIRTSLANDMAIYGDITREATREHTELAENLGDHATAHMLREGLIEL-----	159
NAPÄ_BORBU	95		DIEST-SNFLPMSIESIVCSLSTEILKNIFGMRKLIIDTAGDYGTANIMDDIMSDLE-----	146
MRGA_BACCE	92		GNETSASEMVQALVND---YKQISSESKFVIGLAEENQDNATADLFVGLIDEV-----	141
DPS_MYCSM	96		SVER--DTVQAHLAALDLVYNGVIEDTRKRSIEKLEDL-DLVSQDLLIAHAGEL-----	145
			*	:
DPS_ECOLI	156		-----DKFLWFIESNIE-----	167
BFR_ECOLI	128		-----EGHIDWLETELDLIQKMGLONYLQAQIREEG-----	158
FTNA_ECOLI	135		KSIIDKLSLAGKSGEGLYFIDKELSTL---DTQN-----	165
DPS_HALSA	160		-----EDDAHIEHYLEDD---TLVT--QGALE-----	182
NAPÄ_BORBU	147		-----EKHLWMHKALLENC---DCFCHDENESKCCCECDAK-----	178
MRGA_BACCE	142		-----EKQVWMLSAYLG-----	153
DPS_MYCSM	146		-----EKQVWVRAHLESA---GGQLTHEGQSTERGAADKARRKSA	183

**Рис. 2.** Выравнивание последовательностей бактериальных белков суперсемейства ферритина: DPS\_ECOLI – белок DPS бактерии *E. coli*; BFR\_ECOLI – бактериоферритин бактерии *E. coli*; FTNA\_ECOLI – не содержащий гема ферритин бактерии *E. coli*; DPS\_HALSA – белок DPS археи *Halobacterium salinarium*; NAPÄ\_BORBU – белок napA (гомолог DPS) бактерии *Borrelia burgdorferi*; MRGA\_BACCE – белок mrgA (гомолог DPS) бактерии *Bacillus cereus*; DPS\_MYCSM – белок DPS бактерии *Mycobacterium smegmatis*. Стрелками обозначены аминокислотные остатки, входящие в сайты связывания Fe<sup>2+</sup> в белках DPS. Треугольники – положительно заряженные N-концевые остатки белка DPS *E. coli*.

окислительного стресса и чрезмерного содержания в ней ионов железа. Окисление железа в клетке бактерии может происходить в результате реакции Фентона с образованием гидроксил-радикала, вызывающего перекисное окисление липидов, разрывы в молекуле ДНК, деградацию различных биомолекул:



Белок DPS обладает способностью окислять железо в своем ферроксидазном центре белка без образования гидроксильных радикалов, защищая таким образом структуры клеток [9]:



Ионы Fe<sup>3+</sup> остаются связанными с белком, формируя тем самым ионное ядро внутри молекулы DPS, вмещающее в себя до 400–500 ионов. Это свойство белка представляет несомненный нанобиотехнологический интерес, что характерно и для других ферритиноподобных белков [10].

### 2.3. Кристаллизация нуклеотида

При первом же исследовании белка DPS бактерий *E. coli* [1] группа Колтера (Kolter) обнару-

жила несколько удивительных эффектов. Было показано, что голодающие клетки, которые помещали на 40 мин в 40 мМ раствор перекиси водорода, оставались жизнеспособными. В то время как мутантные клетки, не вырабатывающие белок DPS, полностью теряли жизнеспособность уже при помещении в 15 мМ раствор H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Исследования белка DPS, проведенные *in vitro*, когда очищенный DPS добавляли к суперскрученной плазмидной или линейной ДНК в буфере, содержащем 10 мМ Трис (рН 8.0) и 1 мМ ЭДТА, позволили обнаружить стабильные комплексы DPS–ДНК. Комплексы начинали очень быстро образовываться при концентрации NaCl не выше 0.2 М. Они могли быть диссоциированы 30%-ным формамидом или 2%-ным SDS, но не подвергались диссоциации 5%-ным Triton X-100 или 5%-ным Brij-58. Исследователи отметили также чрезвычайную стабильность комплексов, в том числе сильную их связь с ДНК даже после 16 ч инкубации при 65°C. При этом связывание с ДНК резко стабилизировало структуру DPS. Если белок DPS подвергался нагреванию до 65°C до образования комплекса, он необратимо терял свою ДНК-связывающую способность. Но оставался связанным с ДНК даже после инкубации при 100°C. Не было обнаружено какой-либо специфичности в связывании ДНК. Стехиометрия ком-

плексов была одинакова с кольцевой ДНК (от 2500 до 100000 пар нуклеотидов) и с линейной ДНК (от 70 до 1300 пар нуклеотидов). Электронно-микроскопические исследования полученных комплексов показали, что DPS без ДНК располагался в виде одиночных колец, выстраивающихся небольшими цепочками или образующих кластеры. Масса кольца по данным сканирующей просвечивающей электронной микроскопии составляла 205 кДа, т.е. это были додекамеры DPS.

Эти данные навели на мысль, что внутри клеточек белок DPS также образует упорядоченные структуры, стабилизируя нуклеоид. Это явление было названо биокристаллизацией (*in vivo* кристаллизацией), так как оно происходило непосредственно в живой клетке [11]. Однако, несмотря на огромный интерес ученых к этой теме [1–5, 9–12] проблема биокристаллизации до сих пор мало изучена. Показано, что в процессах связывания важную роль играют N-концевые фрагменты DPS [5, 10], а также определенные концентрации ионов [12]. Хотя общепринятой является точка зрения, что DPS связывает различные участки ДНК неспецифично, т.е. без предпочтения каких-либо нуклеотидных мотивов, однако последние исследования выявили некоторую специфичность этой связи [13].

До сих пор не выяснена точная структура комплексов DPS внутри клетки. Зависит ли их структура от внешних факторов? Кристаллы, полученные *in vitro*, обладают разной симметрией. Что лежит за этими изменениями – условия кристаллизации, присутствие ДНК, ее длина и последовательность? Трехмерная структура и положение ДНК пока не расшифрованы ни одной группой исследователей ни для одного кристалла DPS или гомологичного белка. Еще предстоит выяснить, какие молекулярные механизмы лежат за процессами связывания, компактизации ДНК, образования кристаллов нуклеоида.

### 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучение комплексов белков DPS с ДНК и ионами требует различных подходов к их моделированию.

1. Моделирование белка с ионами железа не может быть проведено достаточно корректно без участия квантовомеханических подходов, так как взаимодействие ионов железа с атомами белка приводит к значительному изменению электронной плотности, которое невозможно достаточно правдоподобно моделировать исключительно классическими методами.

2. Молекулярные механизмы взаимодействия белков DPS между собой и с ДНК, происходящие, вероятно, при участии ионов, в точках их соприкосновения, т.е. в спонтанно образующихся

“активных центрах”, могут быть изучены классическими методами с использованием полноатомных моделей систем.

3. Изучение участков кристаллов DPS с ДНК трудоемко в полноатомном представлении, так как основные перестройки (с вовлечением коллективных степеней свободы) происходят на временах порядка десятков и сотен наносекунд. Для их изучения требуется перейти к крупнозернистым (coarse grained) моделям.

4. Процессы образования кристаллов и других компактных структур ДНК с DPS требуют еще большего укрупнения и рассмотрения крупнозернистых моделей систем в неявно заданном растворителе.

В данной работе рассматриваются системы 2-го и 3-го типов. Изучены термостабильность комплекса из двух додекамеров белка DPS с ДНК и молекулярная динамика участка кристалла DPS с ДНК.

Трехмерная структура кристаллов белка DPS бактерии *E. coli* была определена нами в результате экспериментов на станции ID23-1 синхротрона ESRF (Гренобль, Франция) в 2017 г. Методика исследований подробно описана в работах [14, 15]. Полученный кристалл имеет симметрию  $P_2$ , согласно символике Германа–Могена. Элементарная ячейка кристалла состоит из четырех додекамеров DPS (включает две пары симметрично расположенных относительно друг друга додекамеров). Идентификационный номер изучаемой структуры в базе данных PDB–6GCM.

#### 3.1. Моделирование комплексов DPS–ДНК

Для моделирования устойчивости комплексов белка DPS с ДНК к повышению температуры была взята половина элементарной ячейки расшифрованного нами кристалла 6GCM. В каждой из 12 цепей обоих додекамеров были вручную достроены N-концевые аминокислотные остатки (с 1-го по 13-й). Был выбран участок молекулы ДНК длиной в 74 пары нуклеотидов. Последовательность ДНК состояла из повторов ATCG. Предварительно ДНК была немного изогнута с помощью модуля Life Explorer программного комплекса Graphite [16]. Добавление N-концевых остатков и сборка системы из двух додекамеров DPS и ДНК проводилась в программном комплексе Chimera [17]. После этого система подготавливалась к расчету в программе Gromacs 2018 [18]. Комплекс DPS–ДНК был помещен в кубическую элементарную ячейку с ребром длиной 24.23973 нм. Для нейтрализации заряда системы в ячейку были добавлены 242 иона  $\text{Na}^+$ . Для сольватации систем использовалась модель воды SPC/E.

Расчеты проводились в силовом поле AMBER99-PARMBSC1 [19]. Минимизация энергии

систем, содержащих белок DPS (из-за его сложной структуры с внутренней полостью), не может быть проведена с достаточной точностью методом сопряженных градиентов. Поэтому во всех системах применялся алгоритм наискорейшего спуска. Затем проводилась последовательная релаксация систем в условиях постоянного объема, а также давления длительностью по 50 пс. После завершения релаксации проводили расчет динамики систем. Вычисления проводились в NPT-ансамбле. Постоянная температура поддерживалась с помощью стохастического термостата, постоянное давление – с помощью термостата Парринелло–Рамана с постоянной времени, равной 2 пс. Быстрые степени свободы ограничивались с помощью алгоритма LINCS. Радиусы обрезания для кулоновских и ван-дер-ваальсовых взаимодействий брались равными 1.5 нм. Температура системы составляла 373 К. Шаг интегрирования – 2 фс, время расчета траектории – 20 нс.

### 3.2. Моделирование кристаллов DPS–ДНК

Моделирование кристаллов белка DPS (PDB ID: 6GCM) было проведено с использованием такого же протокола, который был использован нами ранее при расчетах кристаллов белка DPS (PDB ID: 1DPS) [5]. Все расчеты структуры кристаллов были проведены с использованием крупнозернистого представления молекул в программном комплексе Gromacs 2018 [18]. Был построен участок кристалла, содержащий восемь элементарных ячеек (32 молекулы) DPS. Система была помещена в периодическую ячейку в форме прямоугольного параллелепипеда со сторонами длиной 37.1, 27 и 37.5 нм. Далее в кристалл были помещены четыре двуцепочечных олигонуклеотида (24 пары оснований): 5'-AAGTCGACCCTAGAG-GATCTTTGT-3'. В контрольную систему молекулы ДНК не добавлялись. К системе DPS–ДНК было добавлено 1904 противоиона  $\text{Na}^+$  и 276000 неполяризуемых молекул воды, несущих нулевой заряд. Было использовано стандартное силовое поле MARTINI 2.1\_DNA [20].

Для описания ван-дер-ваальсовых взаимодействий между несвязанными атомами в этом силовом поле используется потенциал Леннарда–Джонса

$$U_{LJ}(r) = 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^6 \right]. \quad (3)$$

Здесь  $\sigma_{ij}$  – расстояние, на котором энергия взаимодействия становится равной нулю;  $\epsilon_{ij}$  – глубина потенциальной ямы. Диаметр большинства частиц в силовом поле MARTINI составляет 0.47 нм, а сила взаимодействия соответствует свободным энергиям испарения, гидратации и диссоциации. Для всех атомов системы такое представление

корректно. Однако из-за использования крупных частиц при описании молекул воды (одна молекула воды в MARTINI соответствует четырем полноатомным молекулам воды) в силовом поле MARTINI даже при правильно выбранных протоколах молекулярной динамики возможно артефактное замерзание воды в системе [21]. Во избежание этого эффекта 10% молекул воды в системах заменялось нами на частицы “воды-антифриза”. При взаимодействии со всеми атомами системы и частицами своего типа молекулы “воды-антифриза” ведут себя как молекулы обычной воды: например,  $\sigma(\text{вода–вода}) = 0.47$  нм,  $\sigma(\text{антифриз–антифриз}) = 0.47$  нм, однако расстояние обычных молекул воды и “воды-антифриза” увеличено и составляет  $\sigma(\text{вода–антифриз}) = 0.57$  нм, что позволяет избежать замерзания.

Энергия систем минимизировалась методом наискорейшего спуска. Затем проводилась релаксация систем при постоянном объеме (в течение 50 пс) и постоянном давлении (в течение 100 пс). После чего была рассчитана молекулярная динамика систем в периодических граничных условиях в NPT-ансамбле. Шаг интегрирования составлял 10 фс, время расчета траекторий – 0.1 мкс. Из-за особенностей силового поля параметры баростата и термостата выбирались из рекомендованных для расчетов с использованием силового поля MARTINI. Температура в 300 К поддерживалась с помощью термостата V-rescale (постоянная времени – 0.5 пс). Радиусы обрезания для кулоновских и ван-дер-ваальсовых взаимодействий брались равными 1.2 нм. Давление поддерживалось с помощью баростата Берендсена (постоянная времени – 3 пс, давление – 1 бар, изотермическая сжимаемость воды –  $3.0 \cdot 10^4 \text{ бар}^{-1}$ ). Диэлектрическая проницаемость среды была равна 15 для обеспечения явного экранирования.

## 4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Методом молекулярной динамики были рассчитаны два типа систем DPS–ДНК. В полноатомном приближении изучен комплекс, состоящий из двух молекул DPS и короткого изогнутого фрагмента ДНК длиной 74 п.н. В крупнозернистом приближении изучен участок кристалла из 32 молекул DPS (восемь элементарных ячеек кристалла PDB ID: 6GCM) с короткими двуцепочечными олигонуклеотидами длиной 24 п.н. и без ДНК.

Ранее [5] нами было установлено, что ионы оказывают большое влияние на процессы связывания ДНК и DPS. Обе эти молекулы несут отрицательные заряды на своей поверхности, за исключением трех остатков лизина на N-концах каждого из мономеров DPS. На рис. 3а показано распределение атомов белка DPS и ДНК в системе 2DPS–ДНК, усредненное по траектории, соответствующей времени расчета в 20 нс. Положения, соот-

ветствующие концам молекулы ДНК, обозначены стрелками. Видно, что молекулы DPS почти не смещаются по ходу расчета, поэтому на этом рисунке они четко видны. Нить ДНК в начальный момент времени находилась в невыгодной изогнутой конформации и стремилась распрямиться в ходе расчета траектории, поэтому на рисунке атомы ДНК гораздо менее выражены. На рис. 3б приведена плотность распределения ионов натрия в системе. Ионы  $\text{Na}^+$  помещались в ячейку случайным образом, чтобы обеспечить равномерное их распределение во всех частях системы. Однако по ходу расчета выяснилось, что ионы натрия начали притягиваться к поверхностям ДНК и DPS. При этом связывание ионов с поверхностью молекул не было достаточно сильным, что позволяло ионам мигрировать в раствор. До тех пор, пока ион не достигал одной из шести пор ферритинового типа в молекуле DPS (см. рис. 1д). На рис. 3в показана характерная траектория движения иона  $\text{Na}^+$  в системе. Для удобства восприятия показан только один додекамер DPS. Ион хаотически движется в растворе и у поверхности молекул, пока не проходит сквозь пору внутрь молекулы DPS. Основные аминокислотные остатки, координирующие движение ионов натрия: Asp20, Glu25, His63, Glu64, Asp75, Asp78, Glu82, Asp142, Asp146, Asp154. Наиболее длительно ион  $\text{Na}^+$  связывается остатками His63 и Glu82, координирующими второй сайт связывания ферроксидазного центра. Этим может объясняться его гораздо меньшая эффективность по сравнению с первым сайтом.

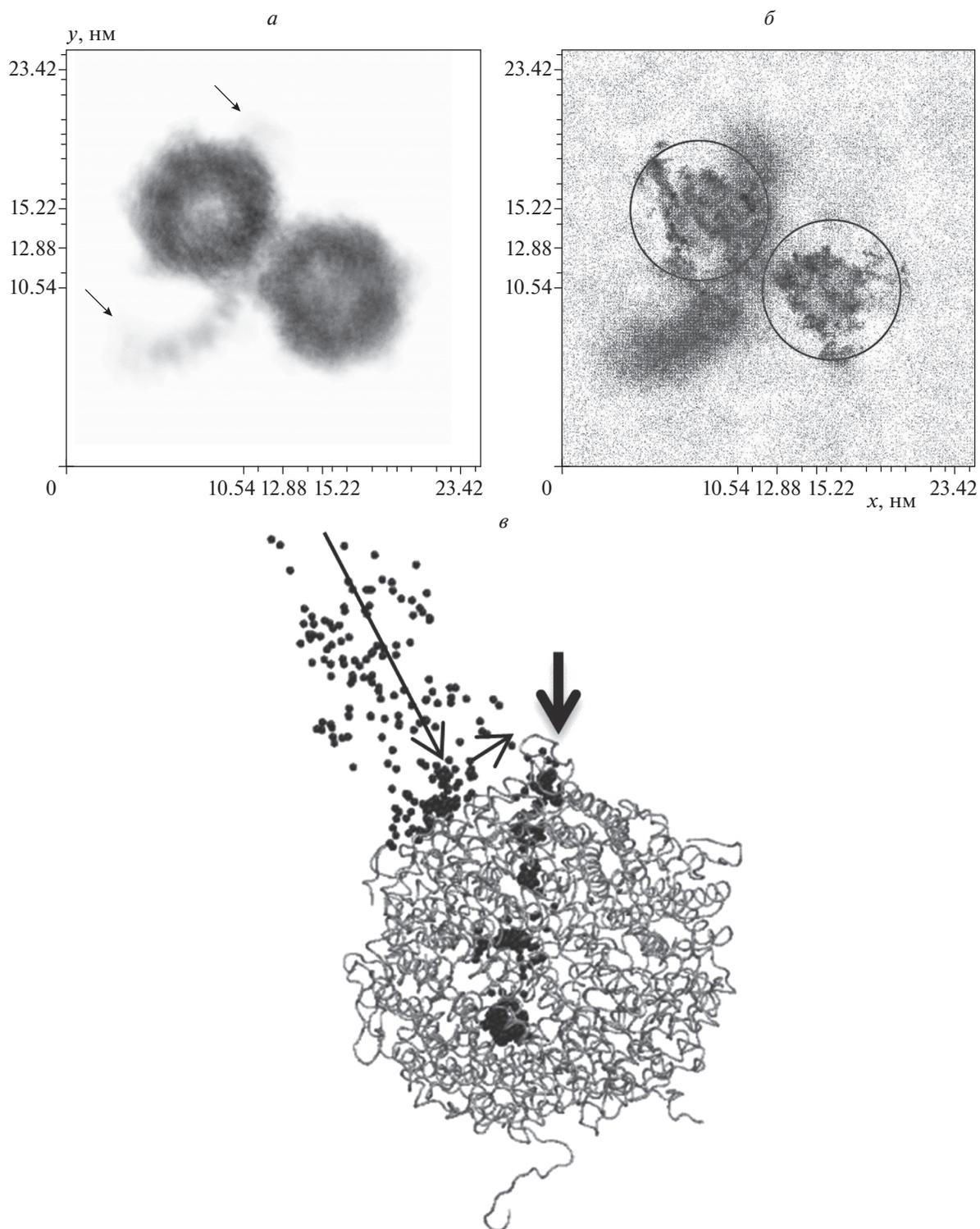
Из рис. 3а видно, что додекамеры DPS практически не движутся относительно друг друга и молекула ДНК также остается связанной с DPS на протяжении расчета всей траектории. Анализ матриц контактов нуклеотидных остатков ДНК с аминокислотными остатками DPS показывает, что связывание молекулы ДНК координируется тремя N-концами (одним – первой молекулы DPS и двумя – второй). Анализ карт контактов 1–29 N-концевых аминокислотных остатков показывает, что связывание ДНК происходит при помощи остатков Lys8, Lys10 и Lys27, также к цепи ДНК во всех случаях приближается пара остатков Asp23–Ser24. Остатки Lys8 и Lys10 входят в неупорядоченную часть N-конца, в то время как остаток Lys27 (находящийся сразу за Lys26 в цепи) относится уже к первой  $\alpha$ -спирали. Остаток Lys5 не участвует в связывании ДНК в сформированном комплексе. Это полностью соответствует экспериментальным данным, показывающим различия в связывании ДНК мутантных форм DPS: Lys5Ala, Lys8Ala, Lys10Ala [2]. Важность остатка Lys27 ранее не исследовалась. Специфичности в связывании какого-либо вида нуклеотидов пробной цепи ДНК, состоящей из ATCG-повторов, обнаружено не было. Вполне возможно, что белок DPS *E. coli*

связывает специфически особые участки ДНК нуклеоида этой бактерии [15], так как именно на ее защиту он направлен. Отсутствие же специфичности, на которую указывают многие исследователи [1, 11], может говорить лишь о том, что фрагменты чужеродных или плазмидных молекул ДНК действительно связываются белком DPS *E. coli* неспецифически.

Особой задачей исследований является поиск возможных положений молекул ДНК внутри кристаллов. До сих пор ни микроскопическими, ни кристаллографическими методами не удается получить трехмерную структуру комплексов DPS–ДНК, позволившую бы однозначно определить положение ДНК внутри кристаллов DPS. Причин этому может быть несколько: 1) ДНК вымывается из комплексов *in vitro*; 2) ДНК лежит в комплексах неупорядоченно; 3) ДНК частично или полностью лежит внутри додекамеров DPS, проходя через специфические DPS-поры; 4) кристаллы, образованные с участием молекул ДНК, не являются идеальными и не могут быть расшифрованы в дифракционных экспериментах даже на современных синхротронах. В пользу присутствия ДНК внутри комплексов DPS говорят электрофоретические исследования в полиакриламидном геле [1, 22], явно показывающие присутствие неразделимых комплексов DPS–ДНК.

Неупорядоченность ДНК может появляться по той причине, что длинная цепь ДНК не может быть уложена в кристалл с необходимой скоростью, если укладка будет происходить параллельными тяжами. Скорее всего, ДНК окружается молекулами DPS [5] в отдельных местах, затем комплексы подходят друг к другу, в итоге образуя кристалл. Внутри кристалла DPS 6GCM обнаружены три типа взаимно ортогональных каналов: достаточно широкие каналы первого типа и узкие каналы второго и третьего типов. В данной работе изучен кристалл, ДНК в котором уложена в каналы первого типа. Каналы второго и третьего типа, по-видимому, должны быть расширены, чтобы вместить ДНК. То есть неупорядоченность ДНК и нарушение идеальной структуры кристалла в местах связывания ДНК вместе создают препятствия расшифровки ее трехмерной структуры внутри кристалла.

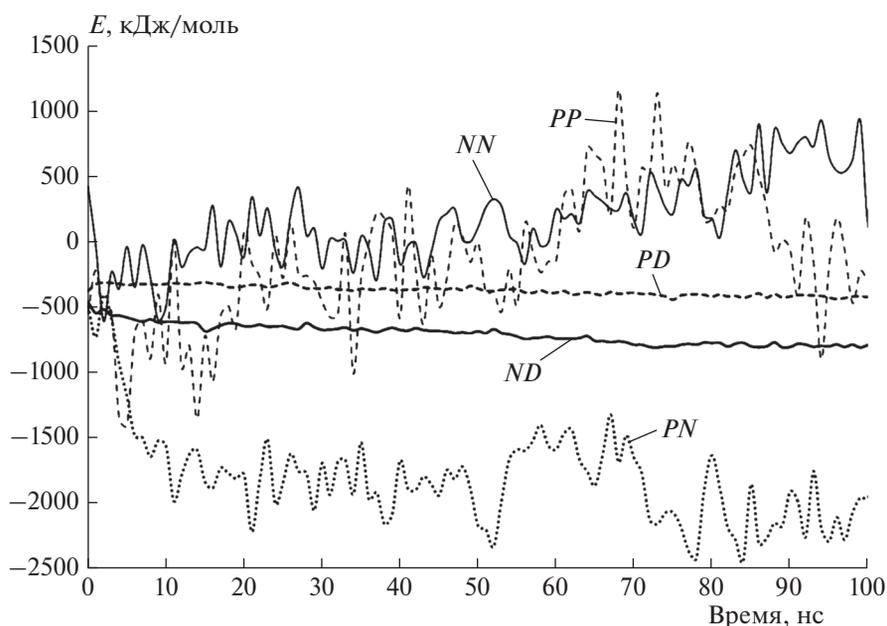
Для изучения молекулярной динамики кристалла DPS–ДНК молекулы ДНК в В-форме длиной в 24 пары нуклеотидов помещались в уже существующий кристалл, в каналы первого типа. Для контроля рассчитывался такой же кристалл без добавления ДНК. Проведенные расчеты показали высокую степень связывания между молекулами ДНК и DPS, а также высокую степень стабильности В-формы ДНК внутри кристалла (среднеквадратичное отклонение RMSD (ДНК 24 пар нуклеотидов)  $\leq 0.15$ ). Миграция и выход из кри-



**Рис. 3.** Плотность распределения атомов белка и ДНК (*a*), ионов натрия (*b*), усредненная по траектории, соответствующей времени расчета в 20 нс; *c* – характерная траектория движения иона натрия в системе. Шкала яркости: *a* – от 0 (белый цвет) до 42.2 (максимальная плотность – самый темный цвет), *b* – 0 до 0.985.

сталлов цепей ДНК обнаружены не были. На рис. 4 приведены данные по перераспределению потенциальной энергии взаимодействия участков мо-

лекул DPS в кристаллах без ДНК относительно тех же участков в кристаллах с ДНК (кривые *PP*, *PN*, *NN*), а также данные по потенциальной энер-



**Рис. 4.** Перераспределение потенциальной энергии в ячейке из четырех молекул DPS при присоединении молекул ДНК (пояснение см. в тексте).

гии взаимодействия участков молекул DPS с молекулами ДНК в кристаллах с ДНК (кривые *PD*, *ND*). Значения приведены для элементарной кристаллографической ячейки (для четырех молекул DPS), в которой расположен один олигонуклеотид (24 пары нуклеотидов). Для определения характеристик связывания N-концов и основной части молекулы DPS эти части молекул были рассмотрены отдельно. На рисунке N-концевые участки (с 1 по 25 аминокислотный остаток) обозначены литерой N. Остальная часть молекулы DPS (с 26 по 167 аминокислотный остаток) — литерой P. Молекулы ДНК обозначены литерой D. При связывании молекул ДНК в кристалле потенциальная энергия взаимодействия ДНК с N-концами молекул DPS (кривая *ND*) оказывается по модулю в два раза выше, чем энергия взаимодействия ДНК с основной частью молекулы DPS (кривая *PD*). То есть N-концевые участки молекул DPS оказываются чрезвычайно важными не только при формировании кристалла [5], но и при удержании ДНК в уже существующем кристалле. При этом связывание основных частей молекул DPS между собой (кривая *PP*) и N-концевых участков молекул DPS между собой (кривая *NN*) в среднем не изменяется. Основное же перераспределение энергии связано с тем, что N-концевые участки молекул DPS при появлении ДНК в кристалле экспонируются внутрь каналов и образуют систему (N-конец одной молекулы DPS)—ДНК—(другая молекула DPS), обеспечивая при этом связывание молекул ДНК (кривая *ND*) и в то же время сильнее взаимодей-

ствуя с другими молекулами DPS (кривая *PN*), тем самым стабилизируя кристалл.

## 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе рассмотрены молекулярные механизмы взаимодействия молекул DPS с ДНК, важные для понимания механизма защиты генетического материала бактерий в условиях стресса. Результаты молекулярно-динамического исследования комплексов белков DPS *E. coli* с ДНК показали, что основную роль в связывании молекул ДНК с молекулами DPS играют остатки Lys8, Lys10, расположенные в неупорядоченной части N-концов DPS, и остатки Lys27, расположенные в его упорядоченной части. Координирующее действие оказывает пара остатков Asp23—Ser24. Обнаружены сильное перераспределение ионов  $\text{Na}^+$  из внешней части расчетной ячейки внутрь молекул DPS и их преимущественное связывание с аминокислотными остатками His63 и Glu82, координирующими второй сайт связывания ферроксидного центра, что может уменьшать эффективность связывания ионов железа этим центром.

Изучение кристаллов белка DPS *E. coli*, структура которых была нами получена в результате экспериментов на станции ID23-1 синхротрона ESRF (Гренобль, Франция) в 2017 г., PDB ID: 6GCM, показывает наличие в них трех типов взаимно ортогональных каналов: широких каналов первого типа и узких каналов второго и третьего типов. Показано, что присутствие ДНК в широких каналах не влечет за собой нарушение структуры

кристалла и стабилизирует кристалл. При этом основную роль в удержании ДНК внутри кристалла играют N-концевые участки молекул DPS. Стабилизация кристалла происходит за счет формирования дополнительных взаимодействий в системе (N-конец одной молекулы DPS)—ДНК—(другая молекула DPS).

Расчеты проводились на высокопроизводительной вычислительной системе МВС-10П в Межведомственном суперкомпьютерном центре Российской академии наук (проект СРН2). Авторы благодарят Европейский центр синхротронного излучения (European Synchrotron Radiation Facility) за предоставление возможности проведения экспериментов.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России (тема 0082-2014-0001, № АААА-А17-117040610310-6, 0104-2019-0005).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Almirón M., Link A.J., Furlong D., Kolter R.* // *Genes Dev.* 1992. V. 6. № 12B. P. 2646.
2. *Karas V.O., Westerlaken I., Meyer A.S.* // *J. Bacteriol.* 2015. V. 197. № 19. P. 3206.
3. *Grant R.A., Filman D.J., Finkel S.E. et al.* // *Nat. Struct. Biol.* 1998. № 5. P. 294.
4. *Chiancone E., Ceci P.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2010. V. 1800. № 8. P. 798.
5. *Tereshkin E., Tereshkina K., Loiko N. et al.* // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2019. V. 37. № 10. P. 2600.
6. *Yévenes A.* // *Subcell. Biochem.* 2017. V. 83. P. 75.
7. *Smith J.L.* // *Crit. Rev. Microbiol.* 2004. V. 30. № 3. P. 173.
8. *Söding J.* // *Bioinformatics.* 2005. V. 21. P. 951.
9. *Calhoun L.N., Kwon Y.M.* // *J. Appl. Microbiol.* 2011. V. 110. № 2. P. 375.
10. *Haikarainen T., Thanassoulas A., Stavros P. et al.* // *J. Mol. Biol.* 2011. V. 405. № 2. P. 448.
11. *Minsky A., Shimoni E., Frenkiel-Krispin D.* // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biology.* 2002. V. 3. № 1. P. 50.
12. *Frenkiel-Krispin D., Levin-Zaidman S., Shimoni E. et al.* // *EMBO J.* 2001. V. 20. № 5. P. 1184.
13. *Antipov S.S., Tutukina M.N., Preobrazhenskaya E.V. et al.* // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 8. P. e0182800.
14. *Синицын Д.О., Лойко Н.Г., Гуларян С.К. и др.* // *Хим. физика.* 2017. Т. 36. № 9. С. 59.
15. *Крупянский Ю.Ф., Лойко Н.Г., Синицын Д.О. и др.* // *Кристаллография.* 2018. Т. 63. № 4. С. 572.
16. *Hornus S., Lévy B., Larivière D., Fourmentin E.* // *Ibid.* 2013. V. 8. № 1. P. e53609.
17. *Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C. et al.* // *J. Comput. Chem.* 2004. V. 25. № 13. P. 1605.
18. *Hess B., Kutzner C., van der Spoel D., Lindahl E.* // *J. Chem. Theory Comput.* 2008. V. 4. P. 435.
19. *Ivani I., Dans P.D., Noy A. et al.* // *Nat. Methods.* 2015. V. 13. № 1. P. 55.
20. *Marrink S.J., Tieleman D.P.* // *Chem. Soc. Rev.* 2013. V. 42. P. 6801.
21. *Hadley K.R., McCabe C.* // *Mol. Simul.* 2012. V. 38. P. 671.
22. *Castruita M., Saito M., Schottel P.C. et al.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. № 4. P. 2918.