

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 539.26

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА БУФЕРА НА КОНФОРМАЦИОННУЮ ПОДВИЖНОСТЬ N-КОНЦЕВЫХ ФРАГМЕНТОВ Dps И ХАРАКТЕР ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ДНК. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ

© 2020 г. Е. Ю. Сошинская¹, Л. А. Дадинова¹, А. А. Можаяв^{1,2}, Э. В. Штыкова^{1,*}

¹ Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия

² Институт биоорганической химии РАН им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

*E-mail: shtykova@crys.ras.ru

Поступила в редакцию 27.04.2020 г.

После доработки 27.04.2020 г.

Принята к публикации 20.05.2020 г.

ДНК-связывающий белок Dps играет ключевую роль в формировании в живых бактериальных клетках кристаллических комплексов Dps–ДНК, что позволяет бактериям выживать в условиях стресса, при воздействии различных неблагоприятных факторов. Такие геномзащитные механизмы способны приводить к возникновению резистентности бактерий к антибиотикам и другим лекарственным препаратам. Выяснение фундаментальных биохимических, генетических и структурных основ резистентности имеет первостепенное значение для разработки стратегий, направленных на ограничение возникновения и распространения устойчивости бактерий, а также разработки инновационных терапевтических подходов. С помощью метода малоуглового рентгеновского рассеяния исследованы конформационные характеристики Dps и его N-концевых фрагментов, определяющие характер взаимодействия этого белка с ДНК в растворе.

DOI: 10.31857/S0023476120060338

ВВЕДЕНИЕ

Способность адаптироваться к различным видам стресса у живых организмов проявляется прежде всего на молекулярном уровне. Хорошо известно, что в процессе голодания или при других неблагоприятных условиях бактерии продуцируют большое количество белка Dps (DNA-binding Protein of Starvation), который, связываясь с ДНК, эффективно защищает ее от повреждения как *in vitro*, так и *in vivo* [1, 2]. При этом образуется устойчивый кристаллический комплекс Dps–ДНК [3]. Важным следствием такой защитной реакции является возникновение бактериальной резистентности к антибиотикам и другим лекарственным средствам. Преодоление устойчивости различных патогенов к соответствующим медицинским препаратам чрезвычайно важно для современной медицины, поэтому исследованию структуры и условиям формирования биокристаллов Dps–ДНК уделяется большое внимание [4–7].

Поскольку Dps играет ключевую роль в процессе биокристаллизации, его структура, в том числе на атомном уровне, хорошо изучена [8–11]. Известно, что Dps представляет собой сфериче-

ский додекамер, гомологичный по структуре ферритину. Существует гипотеза, что защитная функция Dps связана с его способностью связывать ионы железа [8], но молекулярные и структурные механизмы таких биохимических реакций все еще полностью не выяснены.

Первичная структура мономера Dps представляет собой полипептидную цепь из 167 аминокислотных остатков с молекулярной массой 18.7 кДа и содержит высококонсервативную последовательность, состоящую из четырех α -спиралей [8]. Нативная молекула Dps собрана из 12 идентичных субъединиц с суммарной молекулярной массой 224.4 кДа, обладает симметрией типа 23, может накапливать до 450 ионов железа во внутренней полости и выполняет ряд важных биологических функций в бактериальной клетке [9]. Было показано, что *in vitro* Dps также может существовать в виде стабильного тримера [10, 11], который, однако, трансформируется в додекамер в процессе инкубации в течение 12 ч при 37°C. Эти две олигомерные формы Dps различаются по своим свойствам взаимодействия с ДНК. Dps в виде додекамера способен связывать ДНК и образовать

вать с ней большие кристаллические массивы, тогда как тример не может этого сделать [11].

Додекамер Dps, экспрессированный из *Mycobacterium smegmatis*, обладает способностью обратимо диссоциировать на димеры при pH выше 7.5 и ниже 6.0 [12]. На основании структурного анализа этого белка был сделан вывод о том, что различные стадии диссоциации резко изменяют способность Dps к связыванию с ДНК: димеры имеют низкую эффективность формирования защитного комплекса из-за разрушения внутренней полости додекамера, где железо осаждается и минерализуется после окисления [12].

Помимо олигомерного состояния важное значение для взаимодействия Dps с ДНК имеют его N- или C-концевые последовательности. Так, у Dps из *Mycobacterium smegmatis* разупорядоченные C-терминалы содержат 26 аминокислотных остатков с тремя положительно заряженными остатками лизина (Lys₁₇₂, Lys₁₇₇ и Lys₁₈₁), которые, предположительно, участвуют в связывании с ДНК [13]. Два типа Dps из *Lactococcus lactis* имеют спиральные N-концевые последовательности, состоящие из 26 аминокислотных остатков, удаление которых ухудшает способность образования кристаллического комплекса Dps–ДНК [14].

Экспрессированные из бактерии *Deinococcus radiodurans* два вида Dps (DrDps1 и DrDps2) имеют более длинные N-концевые домены по сравнению с любыми другими членами семейства Dps, изученными до сих пор. Они содержат 54 и 41 остаток соответственно. Отсечение первых 50 аминокислотных остатков N-концевой области DrDps1 практически полностью подавляет способность этого белка взаимодействовать с ДНК, указывая на то, что эти области играют решающую роль в образовании со-кристаллов Dps–ДНК [15–17]. При этом N-терминал DrDps1 можно условно разделить на два региона: положительно заряженную область (остатки 1–29), которая содержит шесть остатков лизина (Lys₃, Lys₄, Lys₇, Lys₁₃, Lys₁₅ и Lys₁₆) и один аргинин (Arg₂₈), и область (остатки 30–55), в которой находится сайт связывания с металлами с мотивом Asp₃₆x₂His₃₉x₁₀His₅₀x₄Glu₅₅, расположенным на внешней поверхности додекамера. Разрушение этого сайта влияет на самосборку додекамера, а также снижает способность связывания белка с ДНК [17].

Исследование методом атомно-силовой микроскопии структуры Dps из *Escherichia coli* также показало важность N-концевых областей при взаимодействии белка с ДНК. N-терминал Dps из этой бактерии содержит 20 аминокислотных остатков, четыре из которых имеют положительный заряд: три лизина (Lys₅, Lys₈ и Lys₁₀) и один ар-

гинин (Arg₁₈), и усечение первых 18 аминокислот предотвращает комплексообразование с ДНК [18].

Малоизученным аспектом формирования кристаллических комплексов Dps–ДНК остается влияние металлических бивалентных ионов. В [5] было сделано предположение, что додекамеры Dps не могут связываться с ДНК напрямую и комплексообразование с ДНК происходит опосредованно через ионные мостики, образованные Mg²⁺ в определенном диапазоне концентраций этих катионов, и их присутствие имеет решающее значение для образования со-кристаллов Dps–ДНК. В работе также показано влияние ЭДТА (этилендиаминтетрауксусной кислоты) на комплексообразование. Аналогичные выводы сделаны в [18], где представлены доказательства, указывающие на зависимость формирования со-кристаллов Dps–ДНК от наличия в растворе Mg²⁺, Fe²⁺, хелатирующих агентов, а также от pH и ионной силы раствора [18].

В настоящее время основной гипотезой является предположение, что главную роль в формировании комплекса играют именно N-концевые области, богатые лизином. В соответствии с этой гипотезой члены семейства Dps, которые не обладают положительно заряженным N-терминалом, не могут связываться с ДНК. Это относится, например, к так называемым *Listeria innocua ferritin* [9], Dlp-1 и Dlp-2 из *Bacillus anthracis* [19] и HP-NAP из *Helicobacter pylori* [20].

Несмотря на интенсивные исследования Dps из разных организмов, кристаллическая структура была определена только для додекамерного ядра этого белка. Структура атомного разрешения N-концевых областей остается неизвестной, предположительно, из-за гибкости и разупорядочения этих фрагментов и, следовательно, невозможности их кристаллизации. Исследования в растворе методом малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) проводились только для Dps, выделенного из *Porphyrromonas gingivalis*, с целью изучения формы сферического додекамера [18] и для двух видов Dps из *Deinococcus radiodurans* [15], где были подробно изучены конформации N-концевых областей белка и показано их разупорядочение и роль во взаимодействии с ДНК.

В [6, 7] с помощью МУРР и крио-электронной микроскопии были определены типы кристаллической упаковки со-кристаллов Dps–ДНК в растворе в зависимости от состава буфера.

В данной работе поставлена задача с помощью МУРР рассмотреть взаимосвязь основных факторов, определяющих формирование со-кристаллов Dps–ДНК в растворе. Таким образом, исследование посвящено изучению влияния конформационной подвижности N-концевых областей

Dps из *Escherichia coli* на характер взаимодействия белка с ДНК в присутствии бивалентных ионов металлов при различных значениях pH и ионной силы раствора, а также воздействия ЭДТА в качестве хелатирующего агента. Выбор ЭДТА связан со способностью этого вещества образовывать растворимые комплексы с широким спектром металлов, предотвращая их взаимодействие с металлсвязывающими сайтами белка [21]. Полученные данные будут полезны при дальнейшем изучении структуры и свойств защитного комплекса Dps–ДНК как *in vitro*, так и в живых клетках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подготовка образца ДНК. В качестве образца ДНК использовали кольцевой вектор pсDNA-hIRR-GFP 9900 пар оснований [7, 22]. Выделение вектора проводили с использованием диоксида кремния S5631 (Sigma-Aldrich, США) в соответствии с протоколом, описанным в [23]. После выделения вектор осаждали изопропанолом, промывали 70%-ным этанолом, сушили на воздухе и растворяли в воде milliQ (Merck Millipore, Франция). Концентрацию ДНК определяли с использованием спектрофотометра ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc., США).

Подготовка образца DPS. Экспрессию и очистку Dps проводили по ранее разработанной методике [6]. Фрагмент ДНК, кодирующий ген Dps MSTAKLVKSKATNLLYTRNDVSDSEKKATVEL LNRQVIQFIDLITKQAHWNMRGANFIAVHEMLDGFRTALIDHLDTMAERAVQLGGVALGTTQVINSKTPLKSYPLDIHNVDHLKELADRYAIVANDVRKAIGEAKDDDDTADILTAASRDLDKFLWFIESNIE (UniProtKB – P0ABT2 (DPS_ECOLI)), был получен с помощью ПЦР (полимеразной цепной реакции) амплификации ДНК штамма *E. coli* K12 MG1655 с использованием 5'-GATATGAACATATGAGTACCGCTAAATTAG-3' и 5'-TATAAGCTTATTTCGATGTTAGACTCGATAAAC-3'-олигонуклеотидов. Ген Dps *E. coli* был клонирован в вектор pET-22b(+) по сайтам рестрикции NdeI и HindIII. Экспрессию проводили в клетках *E. coli* BL21-Gold (DE3) при выращивании на среде LB (Lysogeny Broth – культуральная жидкость) в присутствии ампициллина (150 мкг/мл) при 37°C. Транскрипцию рекомбинантного гена индуцировали 0.5 mM IPTG (изопропил-β-D-1-тио-галактопиранозид) при OD₆₀₀ 0.8, наработку белка проводили в течение четырех часов после индукции.

Затем белок чистили с использованием ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-сефарозой FF (GE Healthcare, США), уравновешенной 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7.5. Фракции в пикоскопе с колонки, не связавшиеся с

сорбентом, собирали, так как они содержат большую часть белка Dps, свободного от связанной ДНК [24]. Собранные фракции тестировали на наличие примесей ДНК с помощью измерения соотношения OD₂₆₀/OD₂₈₀, оно обычно составляло около 0.7. Далее белок концентрировали на центрифужной пробирке Amicon с порогом отсеивания молекулярной массы 10 кДа и диализовали в буфере для хранения, содержащем 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.5 mM ЭДТА (буфер I). Чистоту белка контролировали электрофорезом в полиакриламидном геле. Очищенный Dps разделяли на аликвоты и хранили при –20°C. Непосредственно перед измерениями белок размораживали и использовали для дальнейшего изучения либо в исходном буфере (буфер I), либо диализовали в двух разных буферах: 50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, pH 8.0 (буфер II) и 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7.5 (буфер III).

Эксперимент и анализ данных МУРР. Исследования структуры белка с помощью МУРР проводили на синхротроне PetraIII (DESY, Гамбург) на линии P12, оснащенной оборудованием для автоматической смены образцов и двумерным детектором Pilatus2M (фирма DECTRIS, Швейцария). Интенсивность рассеяния $I(s)$ измеряли в области значений волновых векторов $0.08 < s < 7 \text{ nm}^{-1}$, где $s = (4\pi \sin \theta)/\lambda$ – вектор рассеяния, 2θ – угол рассеяния, $\lambda = 0.124 \text{ nm}$ – длина волны рассеяния [25]. Для анализа и модельных расчетов использовали наиболее информативный интервал волновых векторов $0.08 < s < 2.4 \text{ nm}^{-1}$.

Для каждого образца было снято по 50 экспериментальных кривых рассеяния для контроля возможных радиационных повреждений. Радиационного повреждения обнаружено не было.

Растворы белка Dps и смесей белка с ДНК в разных буферах измеряли при температуре 10°C.

Обработку полученных данных проводили с использованием стандартных процедур и программного пакета ATSAS [26]. Первичная обработка кривых была проведена с использованием программы PRIMUS [27]. С ее помощью проводили усреднение экспериментальных кривых рассеяния от образцов и соответствующего буфера с последующим вычитанием рассеяния буфера из кривых МУРР образцов.

Радиусы инерции (R_g) определяли по начальному участку кривой рассеяния в области самых малых значений s с помощью формулы

$$I_{\text{exp}}(s) = I(0)\exp(-s^2 R_g^2/3), \quad (1)$$

справедливой в области $(sR_g) < 1.3$. Из наклона прямолинейного участка графика Гинье – $\ln I(s)$ от s^2 – определяли интенсивность рассеяния в нулевой угол $I(0)$, которая пропорциональна квад-

рату молекулярной массы рассеивающей частицы, и радиусы инерции.

Молекулярные массы (**ММ**) рассчитывали по данным МУРР двумя методами: с помощью подхода Байеса (**ММ**_{Bayesian}) [28] и из значения объема Порода V_p (**ММ**_p) [28], используя эмпирическое соотношение между V_p и **ММ**_p, которое для белков равно в среднем 1.65 [26].

Для построения функций парных расстояний $p(r)$, которые необходимы для восстановления формы белка в растворе по данным МУРР, использовали компьютерную программу GNOM [30]. Функции парных расстояний определяли с помощью косвенного фурье-преобразования интенсивности рассеяния в соответствии с интегральным уравнением

$$p(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty sr I(s) \sin(sr) ds, \quad (2)$$

где $I(s)$ — интенсивность рассеяния. При этом максимальный размер частицы ($D_{\max}$) находим из условия $p(r) = 0$ при $r > D_{\max}$.

Ab initio-метод восстановления формы низкого разрешения белка Dps был реализован с помощью программы DAMMIN [31], которая использует алгоритм имитации отжига путем минимизации невязки χ^2 с экспериментальными данными

$$\chi^2 = \frac{1}{N-1} \sum_j \left[\frac{I_{\text{exp}}(s_j) - c I_{\text{calc}}(s_j)}{\sigma(s_j)} \right]^2, \quad (3)$$

где N — число экспериментальных точек, $I_{\text{exp}}(s_j)$ и $\sigma(s_j)$ — экспериментальные интенсивности и их ошибки, $I_{\text{calc}}(s_j)$ — интенсивность, вычисленная от модели, c — шкалирующий множитель.

Для восстановления структуры белка и его гибких N-терминалов, которые отсутствуют в кристаллографической структуре, применяли гибридный метод (программа CORAL [32]), сочетающий в себе *ab initio*-алгоритм и моделирование жесткими телами. Программа использует имеющиеся в Protein Data Bank структуры высокого разрешения, теоретическая интенсивность которых рассчитывается программой CRY SOL [33], и достраивает недостающие фрагменты макромолекул, используя *ab initio*-процедуру. При этом недостающие аминокислоты моделируются с помощью виртуальных остатков, свернутых в белковоподобную цепь так, чтобы рассеяние от цельной структуры соответствовало экспериментальному рассеянию, минимизируя невязку χ^2 (уравнение (3)). Для гибридного моделирования использовали структуру атомного разрешения белка Dps PDB ID: 1DPS.

Неоднозначность полученных моделей была проанализирована с помощью программы AMBIMETER [34].

Вспомогательная программа GEN_DAM_body [V.V. Volkov, не опубликовано] программного комплекса ATSAS [26] позволяет строить простые тела (шар, сфера, цилиндр) различных размеров и плотностей, состоящие из сферических элементов — так называемые “шариковые модели”.

Для анализа объемной доли свободных Dps и ДНК в растворе использовали программу OLIGOMER [27]. Для определения объемных фракций v_k каждой компоненты смеси программа находит линейную комбинацию интенсивностей рассеяния от каждой компоненты $I_k(s)$. В этом случае интенсивность рассеяния $I(s)$ описывается уравнением

$$I(s) = \sum_{k=1}^K (v_k I_k(s)). \quad (4)$$

OLIGOMER использует алгоритм неотрицательных линейных коэффициентов для минимизации расхождения χ^2 между предсказанной кривой рассеяния от смеси и экспериментальными данными МУРР.

Модели белков, полученные различными способами, проанализированы с помощью программы SUPCOMB [35], чтобы определить разницу в их пространственной организации и указать нормализованное пространственное отклонение (NSD). Как правило, значение NSD, близкое к 1.0, показывает, что модели схожи.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние состава буфера и pH на тип кристаллической упаковки комплекса Dps–ДНК показано в [6, 7]. Как исходный буфер, используемый при получении белка Dps (здесь буфер I), так и буфер с более щелочным pH (здесь буфер II) имели в своем составе ЭДТА в качестве хелатирующего агента. В результате в растворе сформировались со-кристаллы Dps–ДНК, что отразилось в появлении на кривых малоуглового рассеяния серии Брэгговских пиков (рис. 1а, кривые 1 и 2). Расчеты показали, что при использовании буфера I с pH 7.5 образовалась триклинная решетка (рис. 1а, кривая 1), а в буфере II с pH 8.0 и более высокой ионной силой (рис. 1а, кривая 2) — кубическая. Несмотря на обнаруженный полиморфизм комплекса, основным элементом, определяющим структуру со-кристаллов, являлся белок Dps. Именно он формировал 3D-матрицу, в которой ДНК благодаря своей гибкости располагалась в свободном пространстве между молекулами белка. Роль ЭДТА состояла в создании прочных комплексов с двухвалентными катионами

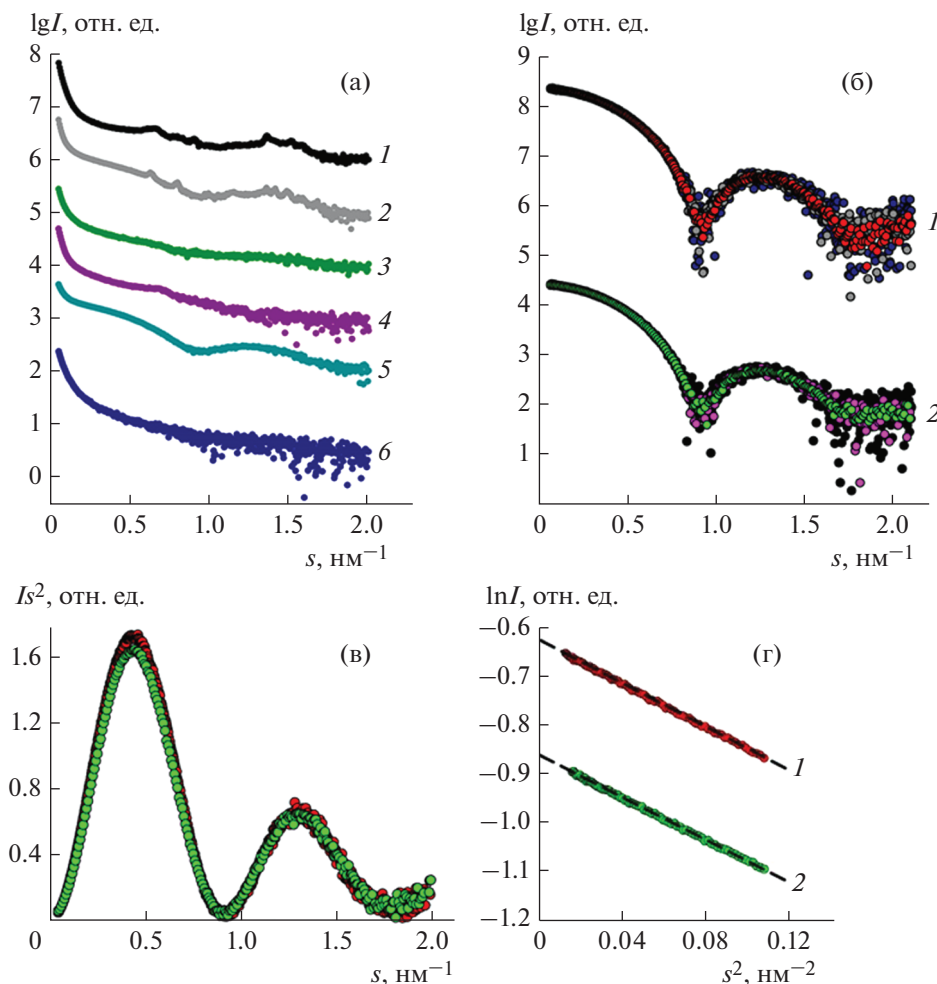


Рис. 1. Экспериментальные кривые рассеяния от смеси Dps с ДНК в исходных буферах I (1), II (2), III (3), буфере II + FeSO_4 (4) и буфере II + MgCl_2 (5), кривая рассеяния от раствора Dps в буфере II с добавлением FeSO_4 (6) (а). Сравнение экспериментальных кривых рассеяния от белка Dps при трех концентрациях в буферах II (1) и III (2) (б). Графики Кратки для растворов белка в буферах II (красные точки) и III (зеленые точки) соответственно (в). Графики Гинье для растворов белка в буферах II (1, красные точки) и III (2, зеленые точки) (г). Цветные рисунки представлены в электронной версии журнала.

металлов, т.е. в свободном состоянии эти катионы в растворе отсутствовали. Поэтому в настоящей работе исследована возможность формирования кристаллического комплекса Dps–ДНК без ЭДТА, а также влияние на стабильность и существование этого комплекса при наличии в растворе свободных катионов Fe^{2+} и Mg^{2+} . Выбор именно этих катионов обусловлен предположением, что, во-первых, защитная активность Dps связана с его способностью связывать ионы железа [8], а во-вторых, тем, что, вероятно, в процессе формирования комплекса додекамеры Dps связываются с ДНК не напрямую, а опосредованно через ионные мостики, образованные Mg^{2+} [5]. Отметим, что исходные растворы Dps и ДНК не содержали эти металлы, как не содержали их и использованные в данной работе буферы I и II.

Тем не менее анализ кривых МУРР объективно демонстрирует формирование кристаллических структур (рис. 1а, кривые 1, 2), что противоречит упомянутым выше литературным данным.

Как видно из рис. 1а (кривая 3), при использовании буфера III (20 мМ Tris-HCl, 100 мМ NaCl, pH 7.5), в составе которого отсутствует ЭДТА, кристаллический комплекс Dps–ДНК не образуется: на кривой рассеяния отсутствуют Брэгговские пики. Однако это не означает, что не образуется некристаллический комплекс. В отсутствие ЭДТА при сливании растворов белка и ДНК в соотношении одна молекула белка на 60 пар оснований ДНК, найденном в [6], происходит помутнение раствора, что явно свидетельствует о взаимодействии этих двух компонентов. Кривая рассеяния в данном случае (рис. 1а, кривая 3) ха-

Таблица 1. Макромолекулярные характеристики белка Dps во II и III буферах

Образец	R_g , нм	V_p , нм ³	D_{max} , нм	ММ _{Porod} , кДа	ММ _{Bayesian} , кДа
Dps в буфере II	3.89 ± 0.1	317 ± 31	14	224 ± 20	208
Dps в буфере III	3.81 ± 0.1	292 ± 30	12	192 ± 20	186

рактерна для неупорядоченных соединений с высокой степенью полидисперсности. То есть без ЭДТА возможно формирование некристаллического (неупорядоченного) комплекса Dps–ДНК и/или агрегация компонентов.

Поскольку предполагается, что катионы Fe^{2+} и Mg^{2+} играют существенную роль при формировании со-кристаллов Dps–ДНК, следующим шагом работы было изучение их влияния на уже сформированные кристаллические комплексы. На рис. 1а (кривые 4, 5) представлены кривые МУРР после добавления к кристаллическим комплексам Dps–ДНК в растворе (как в буфере I, так и в буфере II) бивалентных Fe^{2+} - и Mg^{2+} -катионов в виде 10 мМ солей $FeSO_4$ или $MgCl_2$ соответственно. Как видно из рисунка, вне зависимости от исходной упаковки кристаллических комплексов характеристические Брэгговские пики исчезают, т.е. наличие в растворе свободных бивалентных ионов металлов приводит к разрушению кристаллических решеток. Однако разрушение со-кристаллов происходит по-разному. В случае с Fe^{2+} на кривой рассеяния наблюдается единственный широкий максимум на $s = 9.3\text{--}9.6 \text{ нм}^{-1}$, что примерно соответствует первому максимуму от триклинной упаковки и размеру Dps, т.е. кристаллическая решетка практически полностью разрушается и имеется небольшое количество упорядоченных молекул Dps в сочетании с неупорядоченными агрегатами. Хотя свободные катионы Mg^{2+} также практически полностью разрушают кристаллический комплекс Dps–ДНК, в растворе отчетливо прослеживается форм-фактор белка, существующего независимо от ДНК. В этом случае логично предположить, что кривая 5 на рис. 1а может представлять собой сумму рассеяния невзаимодействующих друг с другом Dps и ДНК. С помощью программы OLIGOMER [27] показано, что это предположение верно: в растворе, содержащем свободные катионы Mg^{2+} , присутствуют около 47 об. % ДНК, 52 об. % Dps и незначительное количество их комплексов.

Таким образом, исследование показывает, что со-кристаллизация Dps–ДНК не только не требует присутствия в растворе Fe^{2+} - и Mg^{2+} -катионов, но и образование кристаллических комплексов

может происходить исключительно в их отсутствие, гарантией чего является наличие в растворе ЭДТА в нужной концентрации, которая прочно связывает положительно заряженные ионы металлов. Избыток катионов приводит к разрушению комплексов.

Поскольку белок Dps играет ключевую роль в формировании в живых бактериальных клетках кристаллических комплексов Dps–ДНК, необходимо выяснить особенности его структуры, при которых возможно формирование таких со-кристаллов.

Кривые МУРР белка Dps были измерены в растворе в присутствии ЭДТА (буферы I и II) и в отсутствие этого компонента (в буфере III). Для исключения влияния межчастичной интерференции на интерпретацию данных МУРР измерения были проведены при трех разных концентрациях белка в каждом буфере в диапазоне от 0.9 до 3.5 мг/мл (рис. 1б). Поскольку в указанном интервале не наблюдалось концентрационной зависимости, то для дальнейшей обработки и интерпретации данных МУРР были выбраны кривые с наибольшей концентрацией, т.е. 3.5 мг/мл в буферах с ЭДТА и 3.4 мг/мл в буфере без него, так как эти кривые являются наименее шумящими. Профили МУРР для Dps в разных буферах очень похожи (рис. 2а, 2г). Графики Кратки, показанные на рис. 1в, также демонстрируют почти полное совпадение. Они имеют характерный колоколообразный вид, что указывает на компактность и структурированность белка с небольшим количеством разупорядоченных, гибких областей. Поскольку предполагаемое дополнительное разупорядочение поверхностных областей Dps при добавлении в раствор ЭДТА может относиться только к N-концевым фрагментам белка, электронная плотность такого разупорядоченного поверхностного слоя будет незначительна и чувствительность графиков Кратки недостаточна для обнаружения этого явления.

Однако анализ графиков в координатах Гинье показывает небольшое, но детектируемое увеличение R_g при добавлении в буфер ЭДТА (рис. 1г, табл. 1). То есть общий объем макромолекулы несколько увеличивается и вероятнее всего за счет

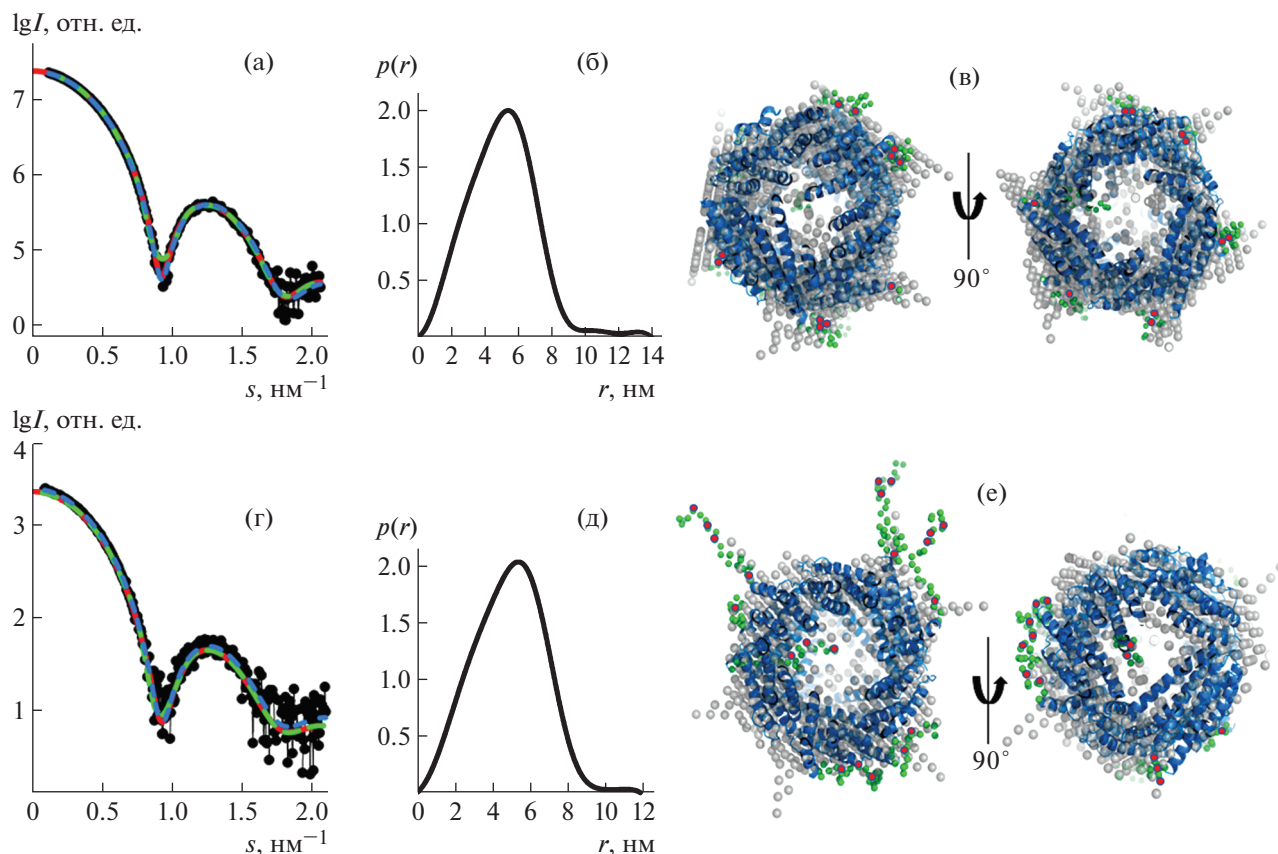


Рис. 2. Сравнение экспериментальных кривых рассеяния от белка Dps в буферах II (а) и III (г) (черные точки) и теоретических кривых, рассчитанных по функции парных расстояний (сплошные красные линии), DAMMIN-модели (сплошные зеленые линии), CORAL-модели (пунктирные голубые линии). Функции парных расстояний для белка Dps в буферах II и III (б, д). Наложение моделей DAMMIN (серые шарики) и CORAL (голубые спирали и зеленые шарики) белка в буфере II и III (в, е) в двух ориентациях. Красными шариками на моделях CORAL отмечены Lys₅, Lys₈, Lys₁₀ и Arg₁₈.

развертывания находящихся на поверхности белка N-концевых доменов.

Значения ММ, определенные по экспериментальным кривым рассеяния, исходя из значения Породовского объема [29] и обобщенного Байесовского подхода [28], совпадают для двух растворов в пределах погрешности. Их среднее значение составляет 203 кДа. Это соответствует ММ додекамера (табл. 1) и в пределах погрешности совпадает с теоретическим значением ММ для Dps, рассчитанной по аминокислотной последовательности мономера, умноженной на 12, т.е. равной 224 кДа.

Для анализа различий в структуре белка в разных буферах были построены функции парных расстояний с помощью программы GNOM [30]. Как видно из рис. 2б, 2д, максимальные размеры белка $D_{\max}$, которые определяются из условия $p(r) = 0$ при $r > D_{\max}$, различны и составляют 14 нм в буфере I или II и 12 нм в буфере III в отсутствие

ЭДТА. Причем функция парных расстояний в области, близкой к максимальному размеру, демонстрирует низкую интенсивность, что соответствует низкой электронной плотности на периферии белка и объясняет невозможность с помощью графика Кратки выявить различия в структуре Dps с предположительно более развернутыми N-концевыми доменами.

Для восстановления формы низкого разрешения образца была использована программа DAMMIN [31], основанная на алгоритме имитации отжига, в пределах сферы, диаметр которой равен $D_{\max}$, найденному по функции парных расстояний. Поскольку образец в растворе существует в виде додекамера, то для *ab initio*-восстановления формы была применена симметрия $P23$. Результаты восстановления представлены на рис. 2в, 2е серыми шариками. Коэффициенты невязки χ^2 с экспериментальными данными, равные 1.9 для белка в буфере I или II и 2.4 для белка в буфере III, свидетельствуют о хорошем соответствии экспе-

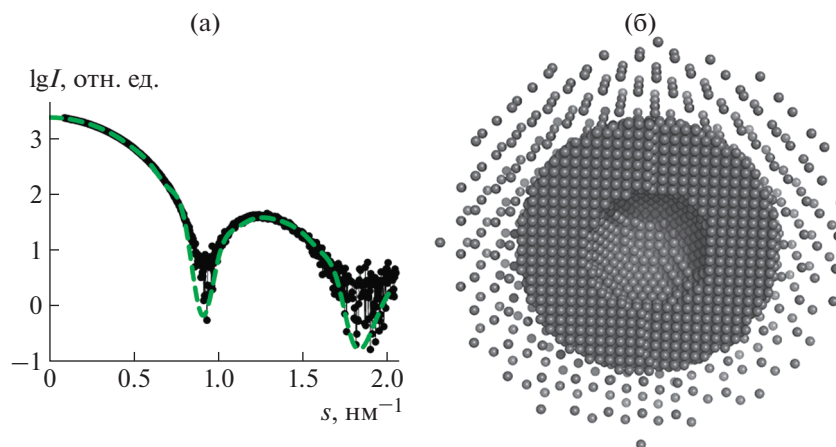


Рис. 3. Сравнение экспериментальной кривой рассеяния от белка Dps в буфере II (черные точки) и теоретической кривой, рассчитанной от GEN_DAM_body модели (пунктирная зеленая кривая) (а). Модель белка, построенная с помощью программы GEN_DAM_body (б).

риментальных кривых и кривых рассеяния от полученных форм низкого разрешения (рис. 2а, 2г).

Как видно из рис. 2в, 2е, образцы содержат полость в центре додекамера, что соответствует известной кристаллической структуре Dps, а также выступающие части, которые, предположительно, относятся к N-концевым областям белка. В буфере без ЭДТА эти выступающие части заметно меньшей длины, чем в присутствии хелатирующего агента.

Поскольку решение обратной задачи по восстановлению трехмерных форм по одномерной кривой рассеяния является неоднозначным, был проведен анализ неоднозначности полученных моделей с помощью программы AMBIMETER [34]. Анализ показал, что найденные модели имеют индекс неоднозначности меньше единицы. Данный результат указывает на практически единственное решение задачи восстановления.

Для определения структуры N-концевых фрагментов Dps в зависимости от наличия в растворе хелатирующего агента использовали гибридный подход, реализованный в программе CORAL [16]. Поскольку предполагается, что взаимодействие с отрицательно заряженными основаниями ДНК происходит через расположенные в N-концевых областях положительно заряженные лизины (Lys₅, Lys₈ и Lys₁₀) и аргинин (Arg₁₈), пространственная локализация и доступность этих аминокислот для контакта с ДНК очень важна. Для моделирования структуры полноразмерного белка использовали известные атомные координаты аминокислот додекамера Dps (PDB ID: 1DPS), а отсутствующие в кристалле первые 22 аминокислотных остатка, относящиеся к N-терминалам белка, были достроены с помощью *ab initio*-алго-

ритма. На рис. 2в, 2е представлены полученные модели, которые показывают, что в буфере II, т.е. в присутствии ЭДТА, N-терминалы белка свободно простираются в растворе и Lys₅, Lys₈, Lys₁₀ и Arg₁₈, отмеченные красными шариками, являются доступными для взаимодействия с ДНК. В то же время в буфере III, не содержащем хелатирующего агента, эти аминокислоты плотно прилегают к поверхности белка. Невязка χ^2 для полученных решений равна 1.1 для Dps в буфере II и 1.6 в буфере III без ЭДТА, что свидетельствует о хорошем соответствии рассеяния от моделей с экспериментальными данными.

Таким образом, два независимых подхода к моделированию структуры Dps демонстрируют схожие результаты: наличие хелатирующего агента в растворе приводит к разворачиванию N-концевых терминалов и доступности ключевых положительно заряженных аминокислот, трех лизинов и аргинина, необходимых для контакта с ДНК, которая несет множество отрицательных зарядов, так как каждый фосфатный остаток этой макромолекулы содержит ионизированную гидроксильную группу. Количественно взаимное соответствие результатов моделирования структуры двумя методами было определено с помощью программы SUPCOMB [35]. Нормализованное пространственное отклонение NSD составило 1.6 для моделей белка в буфере II и 1.8 в буфере III. То есть полученные разными способами модели хорошо совпадают, что видно из рис. 2в, 2е.

Еще один метод, который может подтвердить наличие разупорядоченных N-концов Dps, включает в себя использование программы GEN_DAM_body, позволяющей моделировать объекты различной формы и плотности с помощью простых геомет-

рических тел. Для этого были построены два полых, вложенных друг в друга шара различных радиусов, соответствующих реальным размерам Dps и условные электронные плотности которых различаются в 10 раз (рис. 3б). Предполагается, что менее плотный полый шар моделирует поверхностный слой белка с разупорядоченными и редко расположенными в пространстве N-концевыми доменами. От данной геометрической модели с помощью программы CRY SOL [26] была рассчитана теоретическая кривая рассеяния и сравнена с экспериментальной кривой на рис. 3а. Как видно из рисунка, геометрическая модель хорошо описывает экспериментальные данные для раствора Dps, содержащего ЭДТА. Таким образом, еще один независимый метод моделирования структуры подтвердил вывод о разупорядочении N-концевых фрагментов Dps в присутствии ЭДТА.

Однако природа этого явления ясна не полностью. Известно, что очищенный Dps содержит только несколько атомов железа, предположительно связанных с отрицательно заряженными аминокислотами Asp и Glu в N-концевой области белка. Кроме того, железо относится к переходным металлам и образует прочные комплексы, например, с азотом (N), входящим в состав аминогрупп аминокислот. Так, в гемоглобине Fe^{2+} связывается с шестью лигандами, четыре из которых представлены атомами азота порфиринового кольца гема. Таким же образом в Dps двухвалентные атомы железа могут образовывать связи с соседними белковыми цепями, притягивая их друг к другу и стабилизируя поверхностные участки додекамера. ЭДТА, будучи сильным хелатирующим агентом, может разрушить эти связи железа с аминокислотами и тем самым способствовать разворачиванию N-концевой области белка и взаимодействию с ДНК.

Свойством железа образовывать комплексы и стягивать соседние белковые цепи можно также объяснить разрушение уже сформированных со-кристаллов Dps–ДНК и наблюдаемую тотальную агрегацию (рис. 1а, кривая 4). В то же время Mg^{2+} в отличие от железа действует только как противоион и просто нейтрализует отрицательные заряды ДНК: со-кристаллы Dps–ДНК при этом распадаются, но не агрегируют (рис. 1а, кривая 4).

Для проверки предположения о воздействии свободных катионов железа на агрегационное состояние белка в раствор Dps в буфере II была добавлена соль железа FeSO_4 в концентрации 10 мМ. Кривая рассеяния б на рис. 1а характерна для неупорядоченных полидисперсных образцов. То есть катионы железа, взаимодействуя одновременно с аминокислотными группами соседних молекул белка, действительно способствуют его агрегации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе была поставлена задача с помощью малоуглового рентгеновского рассеяния рассмотреть взаимосвязь основных факторов, определяющих формирование со-кристаллов Dps–ДНК в растворе. При решении задачи получена новая информация о структуре белка Dps и особенностях его взаимодействия с ДНК при формировании защитного кристаллического комплекса. Полученные данные необходимы для дальнейших исследований этого интересного и важного феномена, поскольку вопросов осталось довольно много.

Авторы выражают благодарность В.В. Волкову (ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН) за полезную дискуссию и ценные советы.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 18-74-0071).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Almiron M., Link A.J., Furlong D. et al. // *Genes Dev.* 1992. V. 6. P. 2646.
2. Martinez A., Kolter R. // *J. Bacteriol.* 1997. V. 179. P. 5188.
3. Wolf S.G., Frenkiel D., Arad T. et al. // *Nature* 1999. V. 400. P. 83.
4. Frenkiel-Krispin D., Ben-Avraham I., Englander J. et al. // *Mol. Microbiol.* 2004. V. 51. P. 395.
5. Frenkiel-Krispin D., Levin-Zaidman S., Shimoni E. et al. // *EMBO J.* 2001. V. 20. P. 1184.
6. Dadinova L.A., Chesnokov Yu.M., Kamyshinsky R.A. et al. // *FEBS Lett.* 2019. V. 593. P. 1360.
7. Kamyshinsky R., Chesnokov Yu., Dadinova L. et al. // *Biomolecules.* 2020. V. 10. P. 39.
8. Grant R.A., Filman D.J., Finkel S.E. et al. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 1998. V. 5. P. 294.
9. Bozzi M., Mignogna G., Stefanini S. et al. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 3259.
10. Chowdhury R.P., Vijayabaskar M.S., Vishveshwara S. et al. // *Biochem.* 2008. V. 47. P. 11110.
11. Gupta S., Chatterji D. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 5235.
12. Ceci P., Ilari A., Falvo E. et al. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 34776.
13. Roy S., Saraswathi R., Gupta S. et al. // *J. Mol. Biol.* 2007. V. 370. P. 752.
14. Stillman T.J., Upadhyay M., Norte V.A. et al. // *Mol. Microbiol.* 2005. V. 57. P. 1101.
15. Santos S.P., Cuypers M.G., Round A. et al. // *J. Mol. Biol.* 2017. V. 429. P. 667.
16. Bhattacharyya G., Grove A. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 921.
17. Nguyen K.H., Grove A. // *Biochem.* 2012. V. 51. P. 6679.
18. Ceci P., Cellai S., Falvo E. et al. // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. P. 5935.

19. *Papinutto E., Dundon W.G., Pitulis N. et al.* // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 15093.
20. *Zanotti G., Papinutto E., Dundon W.G. et al.* // J. Mol. Biol. 2002. V. 323. P. 125.
21. *Vintiloiu A., Boxriker M., Lemmer A. et al.* // Chem. Eng. J. 2013. V. 223. P. 436.
22. *Mozhaev A.A., Serova O.V., Orsa A.N. et al.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. № 2. P. 179.
23. *Marko M.A., Chipperfield R., Birnboim H.C.* // Anal. Biochem. 1982. V. 121. P. 382.
24. *Karas V.O., Westerlaken I., Meyer A.S.* // J. Visualized Experiments. 2013. V. 75. P. e50390.
25. *Blanchet C.E., Spilotros A., Schwemmer F. et al.* // J. Appl. Cryst. 2015. V. 48. P. 431.
26. *Franke D., Petoukhov M.V., Konarev P.V. et al.* // J. Appl. Cryst. 2017. V. 50. P. 1212.
27. *Konarev P.V., Volkov V.V., Sokolova A.V. et al.* // J. Appl. Cryst. 2003. V. 36. P. 1277.
28. *Hajizadeh N.R., Franke D., Jeffries C.M. et al.* // Sci. Rep. 2018. V. 8. P. 7204.
29. *Porod G., Glatter O., Kratky O. et al.* Small angle X-ray Scattering. L.: Academic Press, 1982. 51.
30. *Svergun D.I.* // J. Appl. Cryst. 1992. V. 25. P. 495.
31. *Svergun D.I.* // Biophys. J. 1999. V. 76. P. 2879.
32. *Petoukhov M.V., Franke D., Shkumatov A.V. et al.* // J. Appl. Cryst. 2012. V. 45. P. 342.
33. *Svergun D.I., Barberato C., Koch M.H.J.* // J. Appl. Cryst. 1995. V. 28. P. 768.
34. *Petoukhov M.V., Svergun D.I.* // Acta Cryst. D. 2015. V. 71. P. 1051.
35. *Kozin M., Svergun D.* // J. Appl. Cryst. 2001. V. 34. P. 33.