

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«Институт биологического приборостроения с опытным производством
Российской академии наук»

На правах рукописи

Мелехов Владислав Викторович

Исследование механизмов взаимодействия мультифункционального белка
Dps Escherichia coli с ДНК

03.01.02 – Биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Антипов Сергей Сергеевич

Пушино – 2018

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1 Общая характеристика функциональных свойств белка Dps	10
1.2 Dps в суперсемействе белков-ферритинов.....	12
1.3 Структура белка Dps и его олигомеров.....	13
1.3.1 Структура мономера Dps.....	13
1.3.2 Способность мономеров Dps к олигомеризации	15
1.4 Особенности строения ферроксидазного центра Dps.....	18
1.5 Модели взаимодействия Dps с ДНК.....	20
1.6 Прикладные аспекты исследования нуклеопротеидных комплексов	26
1.6.1 Нанореакторы для получения гомогенных материалов.....	27
1.6.2 Полупроводниковые приборы	29
1.6.3 Нанобатареи	31
1.6.4 Применение в медицине	33
1.7 Проектирование и создание молекулярных конструкций с применением методики «ДНК-оригами»	34
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	39
2.1 Бактериальные штаммы	39
2.2 Суперпродукция, выделение и очистка рекомбинантного белка Dps ...	39
2.3 Электрофорез белков в ПААГ в денатурирующих условиях	41
2.4 Определение нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК по Максаму-Джилберту.....	42
2.5 Локализация сайтов взаимодействия белка Dps с ДНК.....	43
2.6 Амплификация фрагментов ДНК.....	44
2.7 Экстракция фрагментов ДНК из ПААГ	45
2.8 Оценка эффективности взаимодействия Dps с ДНК	46
2.9 Окрашивание гелей нитратом серебра	46

2.10 Приготовление никированной ДНК	47
2.11 Проектирование искусственных ДНК-структур	48
2.12 Исследование морфологии белка Dps, фрагментов ДНК и их комплексов методом атомно-силовой микроскопии	50
2.13 Исследование собственной флуоресценции белка Dps и его нуклеопротеидных комплексов.....	53
2.14 Оценка гидродинамического радиуса частиц Dps и его комплексов ..	54
2.15 Изучение кинетики формирования нуклеопротеидных комплексов белка Dps с фрагментами ДНК.....	55
2.16 Моделирование исследуемых фрагментов ДНК.....	58
2.17 Исследование белка Dps при помощи XANES-спектроскопии.....	59
ГЛАВА 3. ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	63
3.1 Выбор участков ДНК для оценки эффективности их взаимодействия с белком Dps.....	63
3.2 Исследование физико-химических свойств белка Dps.....	66
3.3 Изучение особенностей неорганического ядра белка Dps E.coli	71
3.4 Оценка сродства Dps к различным областям регуляторной области собственного гена	75
3.5 Особенности морфологии комплексов Dps с линейными фрагментами ДНК	82
3.6 Искусственные разветвлённые структуры ДНК как мишень для Dps... ..	83
3.7 Исследование комплексов Dps с плазмидной ДНК	90
3.8 Оценка физико-химических характеристик нуклеопротеидных комплексов белка Dps с различными фрагментами ДНК	92
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	107
ВЫВОДЫ.....	111
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	112

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АСМ – атомно-силовая микроскопия
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ПААГ – полиакриламидный гель
- п.н. – пара нуклеотидов
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- ТХУ – трихлоруксусная кислота
- BSA – бычий сывороточный альбумин
- DTT – дитиотреитол
- DMS – диметилсульфат
- EDAC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид
- EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота
- EMSA – метод оценки электрофоретической подвижности
(Electrophoretic Mobility Shift Assay)
- EtOH – этиловый спирт
- EXAFS – протяжённая тонкая структура рентгеновского спектра поглощения (Extended X-ray Absorbtion Fine Structure)
- IPTG – изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид
- PMSF – фенилметилсульфонилфлуорид
- Sulfo-NHS – N-гидроксисукцинимид
- TEY – методика регистрации полного выхода электронов (Total Electron Yield)
- TRIS – трис(гидроксиметил)аминометан
- Tween20 – Полисорбат 20
- XANES – околопороговая тонкая структура рентгеновского спектра поглощения (X-ray Absorbtion Near Edge Structure)

ВВЕДЕНИЕ

Все живые организмы используют специальные структурные белки для сохранения своего генома в функционально активном состоянии и для его защиты от различных внешних физических и химических факторов. В эукариотических клетках такими структурными белками являются гистоны, имеющие положительный заряд своей поверхности. Они конденсируют или релаксируют определённые геномные локусы посредством взаимодействия с ДНК без всякой специфичности к её нуклеотидной последовательности. В прокариотических клетках эту функцию выполняют 10–12 белков [19, 20, 49], которые способны формировать нуклеопротеидные комплексы с ДНК за счёт распознавания структурных особенностей двойной спирали или специфических нуклеотидных последовательностей бактериальной хромосомы.

Примерно 170000 молекул различных белков поддерживают структуру нуклеоида *E.coli* на экспоненциальной фазе роста, в то время как переход в стационарное состояние сопровождается их увеличением примерно до 290000. В быстрорастущих клетках наиболее распространённым белком нуклеоида является Fis, тогда как в голодающих клетках внутриклеточный уровень Fis падает, и главным белком становится Dps [19, 20]. Однако информации о способах и особенностях взаимодействия Dps с ДНК на сегодняшний день недостаточно для полного понимания механизмов, лежащих в основе его функций. Считается, что он формирует нуклеопротеидные комплексы с отрицательно заряженным сахаро-фосфатным остовом ДНК и не содержит в своей структуре каких-либо модулей, способных распознавать конкретные нуклеотидные последовательности [12, 19, 20, 31, 68].

Большинство архитектурных белков бактериального нуклеоида существуют в виде гомо- или гетеродимера (Fis, HU, CbpA, IHF, H-NS и StrA). Основной олигомерной формой белка Dps является додекамер,

который собирается из димеров [33] или тримеров [159]. Додекамеры Dps способны формировать достаточно стабильные нуклеопротеидные комплексы с бактериальной ДНК. Причём способность его олигомеров более низкого порядка формировать аналогичные структуры на сегодняшний день до конца не изучена.

Как правило, белки нуклеоида распознают нуклеотидные последовательности косвенно, используя различные дополнительные структурные модули для распознавания сайтов связывания в зависимости от особенностей нуклеотидной последовательности, её структуры и микроокружения. У Dps *E.coli* эту функцию выполняют гибкие N-концы каждой из субъединиц, содержащие три остатка лизина в позициях 5, 8 и 10, а также остаток аргинина в позиции 18 [68]. Делеция первых 8 из 18 аминокислот N-концевого участка резко снижает способность Dps связываться с ДНК и агрегировать с другими молекулами Dps [28, 31]. Однако на сегодняшний день не выявлено типичных ДНК-связывающих модулей в структуре Dps [68]. Таким образом, высокое сродство Dps *E. coli* к ДНК в настоящее время рассматривается как результат сильного электростатического взаимодействия между положительно заряженными N-концевыми модулями белка и отрицательно заряженным остовом ДНК. Способы взаимодействия Dps с ДНК могут различаться для молекул белка, полученного из разных бактериальных штаммов, но электростатическое взаимодействие, вероятнее всего, играет ключевую роль в этих процессах.

Белки, участвующие в генной регуляции, обладают специфичностью к различным нуклеотидным последовательностям, но подобная информация о Dps на сегодняшний день отсутствует. Более того, обнаружено, что мутанты *E. coli* по *dps* имеют значительные отличия в профиле синтезируемых белков [12], а анализ с использованием кДНК-микрочипов, выполненный для таких мутантов *S. enteritidis* [28], выявил значительное количество генов с *dps*-зависимой транскрипцией. Все эти факты позволяют предположить наличие некоторой специфичности во взаимодействии Dps с ДНК. Таким образом,

изучение проблемы формирования упорядоченной структуры нуклеоида с участием Dps требует более детального рассмотрения с привлечением различных методологических подходов и учёта организации конкретных участков ДНК, что является актуальной фундаментальной задачей биофизики.

Кроме того, структурные особенности Dps, его способность накапливать ионы железа в своей внутренней полости, а также высокое сродство к ДНК позволяют рассматривать данный белок как весьма перспективный объект для прикладных исследований.

Цель исследования

Целью работы является исследование механизмов формирования нуклеопротеидных комплексов белка Dps с ДНК, а также изучение возможности построения упорядоченных макромолекулярных структур на основе данного механизма.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

- 1) Изучить физико-химические особенности как отдельных молекул белка Dps, так и их концентрированных растворов в различных условиях;
- 2) Исследовать характер взаимодействия белка Dps как с линейными фрагментами ДНК, так и с искусственными разветвлёнными структурами ДНК и изучить морфологию полученных комплексов;
- 3) Спроектировать искусственные самособирающиеся структуры на основе ДНК и изучить их физико-химические и морфологические характеристики;
- 4) Изучить физико-химические свойства сформированных нуклеопротеидных комплексов Dps-ДНК, в частности, кинетику их формирования с использованием различных биофизических и биохимических методов.

Научная новизна и практическая ценность работы

Результаты диссертационной работы расширяют понимание процессов, происходящих в нуклеоиде бактериальной клетки, а именно – особенностей формирования нуклеопротеидных комплексов с участием основного архитектурного фактора бактериального нуклеоида на стационарной фазе роста *E.coli* – белка Dps. В ходе работы было исследовано значительное число нуклеопротеидных комплексов различными методами, благодаря чему выявлена потенциальная мишень для белка Dps. На основании полученных данных предложена модель, описывающая взаимодействие белка Dps с различными фрагментами ДНК.

Изучены физико-химические свойства нуклеопротеидных комплексов и их компонентов с использованием разнообразных методов, в частности, атомно-силовой микроскопии, поверхностного плазмонного резонанса и метода задержки в геле нуклеопротеидных комплексов. Проведена оценка особенностей линейных размеров и морфологии отдельных молекул Dps, ДНК и их нуклеопротеидных комплексов. Зарегистрировано изменение гидродинамического радиуса молекул белка Dps в различных условиях, а также исследовано изменение интенсивности его флуоресценции в составе нуклеопротеида. Проведена оценка константы диссоциации Dps с фрагментами ДНК различной структуры. Получены температурные зависимости гидродинамического радиуса и собственной флуоресценции молекул в широком диапазоне температур. На основе исследованных нуклеопротеидных комплексов спроектированы элементарные конструкции нанометрового диапазона для решения прикладных задач в области материаловедения, полупроводниковой техники, медицины и биотехнологии.

Апробация работы

Результаты работы были представлены на 5 международных и всероссийских конференциях и опубликованы в соответствующих сборниках трудов, в том числе: «Proceedings of the International Summer School on Application of Scanning Probe Microscopy in Life Sciences, Soft Matter and

Nanofabrication» (Ольборг, Дания, 2013), «Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы» (Воронеж, Россия, 2013), «STRANN '14» (Санкт-Петербург, Россия, 2014), «Биология – наука XXI века» (Пушино, Россия, 2013, 2014).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 9 работ, из которых 3 в периодических отечественных и международных научных журналах из перечня Высшей аттестационной комиссии Российской Федерации и индексируемые международными базами данных Scopus и Web of Science.

Личный вклад автора

Проведение экспериментов, обработка, анализ и интерпретация полученных данных, а также написание научных статей, апробации результатов исследования осуществлялись лично автором либо при его непосредственном участии.

Объём и структура работы

Диссертационная работа изложена на 136 страницах машинописного текста: состоит из введения, обзора литературы, методической части, результатов с обсуждениями, выводов, а также списка литературы. Диссертация включает 3 таблицы и 44 рисунка. Список литературы содержит 220 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика функциональных свойств белка Dps

Белок Dps является мультифункциональным белком, состоящим из 12 одинаковых субъединиц и выполняющим, по крайней мере, три принципиально различные функции в бактериальной клетке. С одной стороны, он способен взаимодействовать с ДНК, компактизуя её в условиях стационарного роста, аминокислотного голодания и различных стрессов, и, таким образом, может быть отнесён к белкам нуклеоида или «гистон-подобным» белкам. Именно Dps экранирует геном от таких деструктивных факторов, как активные формы кислорода, и препятствует химическому и радикальному повреждению бактериальной ДНК в условиях окислительного стресса, теплового шока, воздействия УФ- и γ -облучения [21, 42, 59, 73, 79, 121, 138, 148, 151, 187, 192].

С другой стороны, белок Dps способен окислять супертоксичные для клетки ионы двухвалентного железа до трёхвалентного и накапливать их внутри своей белковой полости в легко доступной для последующего использования форме. Следовательно, он выполняет функцию, характерную для белков-ферритинов. За окисление железа отвечают 12 каталитических центров, расположенных между субъединицами. Эта функция белка относительно хорошо изучена и мало отличается от аналогичной функции других ферритинов.

Кроме того, во время клеточного дыхания выделяется значительное число как анион-радикалов $O_2^{\cdot-}$, так и молекул H_2O_2 , которые могут повредить железосерные кластеры ферментов, что приводит к высвобождению ионов железа Fe^{2+} . После взаимодействия с окислителями образуются свободные гидроксил-радикалы (OH^{\cdot}) в ходе реакции Фентона [68, 75]:



Dps для окисления ионов Fe(II), в отличие от классических ферритинов, использует молекулы H₂O₂ в качестве окислителя, что позволяет значительно снизить эффективность свободнорадикальных процессов, идущих в клетке [68]. Таким образом, жизненно важной функцией Dps является детоксикация бактериальной клетки от перекиси водорода и ионов двухвалентного железа посредством изъятия ионов Fe²⁺ из внутриклеточной среды. Эти процессы протекают в несколько стадий, включающих быстрое связывание ионов Fe²⁺ высококонсервативными ферроксидазными центрами, их окисление посредством H₂O₂ с восстановлением перекиси до воды и депонирование Fe³⁺ внутрь белковой полости [25, 32, 78, 189, 192, 218].

Несмотря на то, что закономерности распределения железа в клетке до конца ещё не изучены [43], результаты последних исследований клеток *E. coli* на стационарной фазе роста, выполненных с применением Мёссбауэровской спектроскопии, показали, что большая часть железа содержится в цитохромах, бактериоферритинах либо в железосерных белках [124, 125]. Помимо этого, имеются данные, свидетельствующие об участии Dps не только в метаболизме железа, но и меди [179].

Вне зависимости от механизма взаимодействия белок Dps надёжно связывается с ДНК, защищая её как от механических повреждений, так и от ферментативного расщепления (например, нуклеазами) на протяжении всего жизненного цикла клетки. Некоторые исследования свидетельствуют о возможности выполнения белком Dps репаративной функции как напрямую [17], так и косвенно [138].

Наконец, последние исследования дают повод предположить наличие у Dps ещё одной функции – ферментативной. Белок, выделенный из *M. Arborescens*, расположенной в желудке бабочек *Spodoptora exigua*, катализирует как синтез, так и гидролиз N-ацил аминокислот, в частности, N-ацил-глутаминов. Эти данные могут свидетельствовать о возможном участии Dps в поддержании функционирования микробиомных экосистем [148, 149].

1.2 Dps в суперсемействе белков-ферритинов

Ионы металлов имеют важное физиологическое значение и входят в состав активных центров большинства ферментов. Железо является одним из самых распространённых металлов, встречающихся в составе биомакромолекул, и участвует в самых различных биохимических реакциях [14, 75]. Большая часть ионов железа находится в связанном состоянии, и лишь незначительное количество железа присутствует в относительно свободном виде. Тем не менее, при взаимодействии с сильными окислителями, например, перекисью водорода, получаемые соединения железа весьма токсичны для клеточных структур и биомолекул.

Белки-ферритины играют ключевую роль в окислении свободных ионов Fe(II) и их последующем хранении. Эти белки представляют собой достаточно большое семейство и распространены как у высших организмов, так и у бактерий. В самом семействе бактериальных ферритинов можно выделить следующие подсемейства белков: ферритины (Ftn), бактериоферритины (Bfr) и подсемейство белков Dps [14, 15].

Ферритины и бактериоферритины в общих чертах похожи, несмотря на то, что ферритин позвоночных состоит из субъединиц двух типов H и L, а ферритины растений и бактерий содержат субъединицы только H типа [12, 23, 39, 41, 217]. Они состоят из 24 субъединиц, образующих сферу диаметром порядка 12–13 нм с внутренней полостью диаметром 7–8 нм. Их основная биологическая роль заключается в запасании ионов железа путём окисления Fe(II) до Fe(III) и хранении их внутри себя [75].

По имеющимся данным, сформированное внутреннее неорганическое ядро ферритинов может обладать как различными типами кристаллической структуры, так и иметь аморфное строение [15]. Клетки эукариот содержат только ферритины, тогда как прокариотические организмы содержат представителей всех подсемейств. Это может быть объяснено

необходимостью наличия у бактерий более надёжных механизмов, защищающих клетку от различных воздействий.

Белки подсемейства Dps несколько отличаются от предыдущих двух групп как структурно, так и функционально. Гомологи Dps были обнаружены у отдалённых родственных групп прокариотов [37, 146]. Эти исследования привели к выводу о том, что Dps является дивергентным представителем семейства ферритинов/бактериоферритинов.

Последующий рентгеноструктурный анализ данного белка подтвердил, что Dps является аналогом ферритинов [68]. Однако, несмотря на различия, проявившиеся в ходе эволюции, представители этих семейств имеют сходную структуру и аминокислотные последовательности. Тем не менее, стоит отметить, что бактериоферритины имеют большее родство с подсемейством Dps, чем классические ферритины.

1.3 Структура белка Dps и его олигомеров

1.3.1 Структура мономера Dps

Мономер Dps состоит из остатков 167 аминокислот, а его молекулярная масса составляет 18695 Да. За исключением некоторых отличий на N- или C-концах структура мономера Dps похожа на структуру мономеров ферритина и бактериоферритина и также содержит высоко консервативную последовательность из четырёх спиралей (Рис. 1) [38, 68, 79]. Высказано предположение, что семейство Dps могло быть гем- или металлсвязывающими белками, которые приобрели впоследствии способность взаимодействовать с ДНК [68].

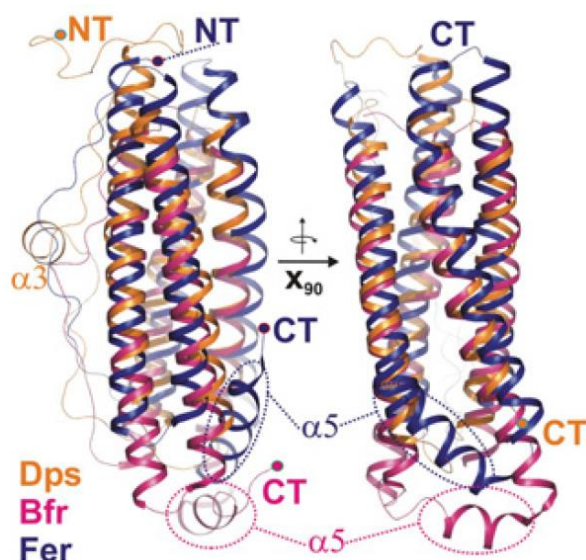


Рис. 1. Сравнение структур мономеров ферритина (тёмно-синий), Bfr (малиновый) и Dps (оранжевый) с двух перспектив, повернутых относительно друг друга на 90° (X_{90}). $\alpha 3$ – спираль в составе Dps, $\alpha 5$ – спираль в составе Bfr и ферритина. Концы трёх белков обозначены соответственно (NT, N-конец; CT, C-конец) [212]

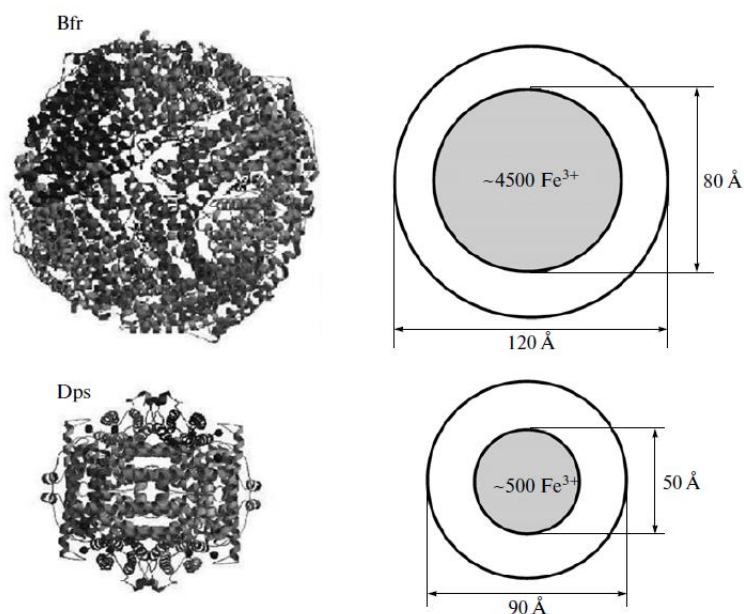
Мономер Dps представляет собой пучок из четырёх спиралей, практически идентичных таковым в мономере белка Bfr. В обеих молекулах первые две спирали (A и B) связаны друг с другом посредством короткой петли, равно как и последние две спирали (C и D). В свою очередь, пары спиралей связаны длинной петлёй, которая растянута вдоль поверхности пучка от края, содержащего N-конец, до края, содержащего C-конец. В бактериоферритине у длинной BC петли отсутствует вторичная структура, но есть короткая спираль $\alpha 5$ (остатки 146–151) возле C-конца молекулы. У Dps подобная спираль отсутствует, причём изучение гомологов Dps говорит об отсутствии спирали $\alpha 5$ практически у всех представителей данного подсемейства. Вместо этого у Dps имеется спираль $\alpha 3$ в BC-петле.

Анализ структурных элементов белков Dps и Bfr позволяет сравнить их ферроксидазные центры. Ферроксидазный центр, расположенный в центре четырёхспирального пучка Bfr, был впервые идентифицирован как биметаллический кластер человеческого ферритина H [102], в котором

четыре аспартата и два гистидина связывают металлические ионы. Структура ферроксидазного центра Dps при этом несколько отличается и содержит один гистидин, два фенилаланина, два лейцина и тирозин, которые образуют преимущественно гидрофобные взаимодействия внутри пучка.

1.3.2 Способность мономеров Dps к олигомеризации

Классические ферритины и бактериоферритины формируют олигомер, состоящий из 24 субъединиц, тогда как Dps, как правило, формирует додекамер из 12 одинаковых, или практически одинаковых субъединиц. Из-за меньшего размера внутренней полости (~5 нм) Dps может содержать меньшее число ионов железа (~450 ионов) по сравнению с Bfr, который может содержать до 4500 ионов железа [14, 16, 74, 185] (Рис. 2).



Додекамер представляет собой шарообразную структуру из 12 субъединиц, полую внутри. Диаметр додекамера Dps составляет примерно 90 Å, диаметр внутренней полости – 50 Å [68]. Сборка додекамера осуществляется из димеров или тримеров, так же как и у классических ферритинов. Тем не менее, существует два принципиальных отличия в

данном процессе, что обусловлено структурными особенностями Dps. Первое – это отсутствие четырёхсторонних взаимодействий, которые у ферритина обусловлены E-спиралью. Второе – это особенности симметрии ферритинов (4-3-2). Из-за этой особенности его сборка из тримеров возможна только одним путём. Вследствие такого способа сборки его олигомер структурно одинаков и с фронтальной, и с тыльной стороны (Рис. 3). Фронтальная и тыльная стороны Dps при этом неэквивалентны вследствие наличия у него симметрии типа 2-3. Всё это приводит к более плотной упаковке субъединиц Dps и формированию в белковой глобуле пор меньшего диаметра, которые, ко всему прочему, выстланы гидрофобными аминокислотами.

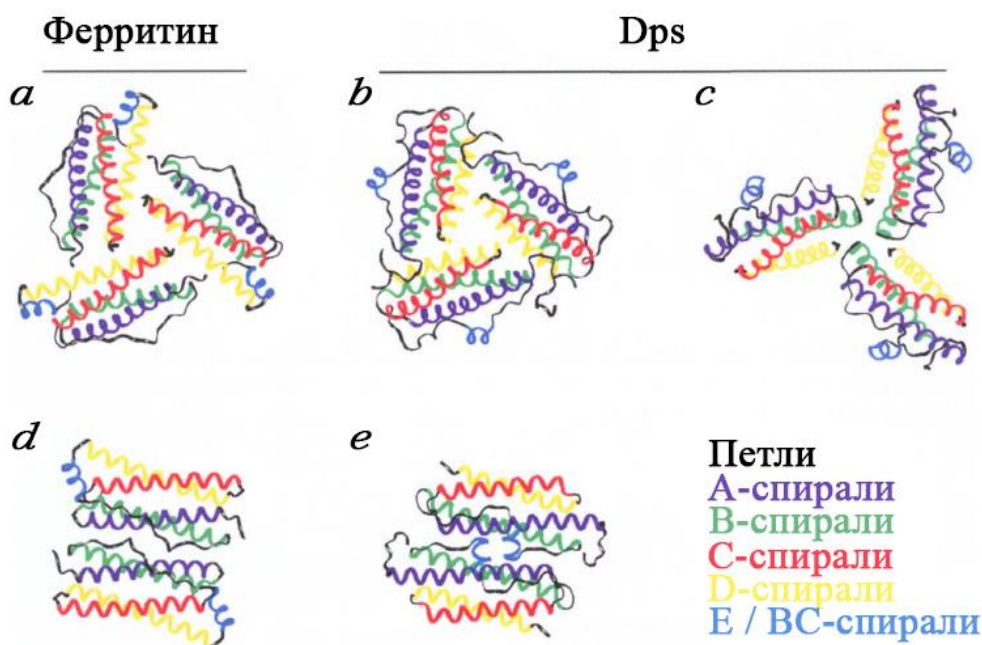


Рис. 3. Сравнение типов сборки мономеров Dps и Vfr.

a – тримерный участок 24-субъединичного Vfr; *b* – одна из двух возможных сборок тримера Dps из мономеров, формирующих гидрофильную полость; *c* – второй тип сборки тримера Dps с гидрофобной порой меньшего размера; *d* – сборка димера из мономеров в Vfr; *e* – сборка димера из мономеров в Dps

[68]

Сборка Dps в додекамер осуществляется путём гексамеризации димеров или тетрамеризации тримеров [71]. Хотя додекамер Dps является достаточно прочной структурой, отдельные точечные мутации в тримере могут дестабилизировать комплексы олигомеров Dps [216]. Суммарный поверхностный заряд белка Dps является отрицательным, однако детальное рассмотрение распределения заряда на поверхности белка позволяет выделить имеющие положительный заряд локальные участки молекулы (Рис. 4). Это связано с особенностями аминокислотного состава Dps, в частности, наличием остатков лизина в N-концевом участке молекулы, который обычно расположен на поверхности белка. Считается, что благодаря именно этим аминокислотным остаткам, Dps способен взаимодействовать с ДНК [68].

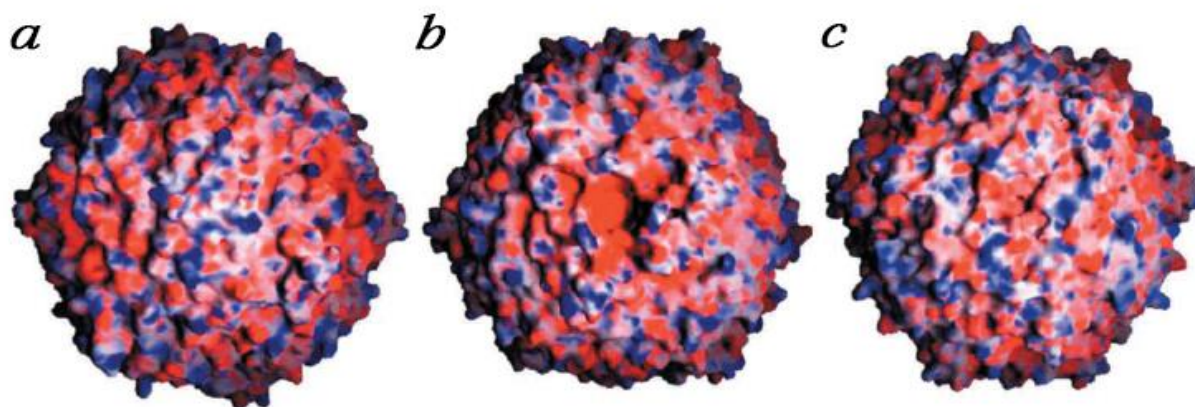


Рис. 4. а, b, с – вид с разных проекций на распределение электростатического заряда на поверхности додекамера Dps. Красным обозначены более электроотрицательные области, синим – менее электроотрицательные области на поверхности Dps [68]

Сродство к ионам железа в значительной степени обусловлено неравномерным распределением отрицательного заряда между внутренней и наружной поверхностями молекулы белка. Причём внутренняя поверхность заряжена более отрицательно [148]. Именно разность между зарядом поверхности и внутренней полости играет основную роль в притяжении клеточного железа к каналам Dps, в которых происходит его окисление.

1.4 Особенности строения ферроксидазного центра Dps

Каналы, по которым железо перемещается во внутреннюю полость белка, подразделяются на два типа. Каналы типа I (Рис. 5) имеют длину порядка 2 нм и выстланы отрицательно заряженными аминокислотами преимущественно из остатков аспартатов и глутаматов, которые участвуют в процессе транслокации железа в виде гексааквакомплексов $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}]$, играя важную роль в его кинетике [22, 23, 68, 112]. Химическое окружение водно-железных комплексов $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}]$ изменяется по мере продвижения по каналу, однако ориентация этих гексагональных комплексов до конца не определена. Данная модель справедлива для большей части белков подсемейства Dps.

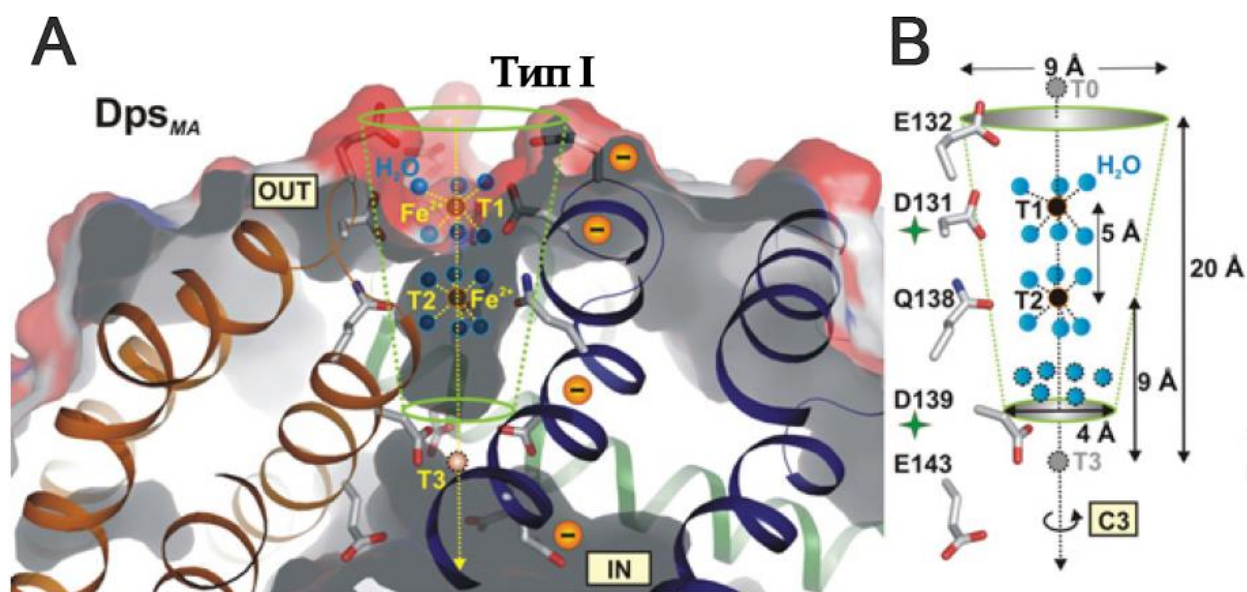


Рис. 5. А – схематичное изображение среза канала белка Dps (Тип I) из *M. arborescens*, образованного тремя субъединицами (обозначенными синим, зелёным и оранжевым цветами). Внешний и внутренний диаметры канала равны 9 и 4 Å, соответственно. Направление движения ионов железа обозначено жёлтой стрелкой. В – схематичное изображение расположения остатков аминокислот, вовлечённых в процесс транслокации железа [22, 212]

Каналы типа II обнаружены пока только у Dps из *H. Salinarum* [213]. Данный тип канала, так же как и каналы типа I, образован на стыке трёх субъединиц, однако они выстланы преимущественно остатками аргинина, из-за чего имеют меньшее сродство к ионам железа (Рис. 6).

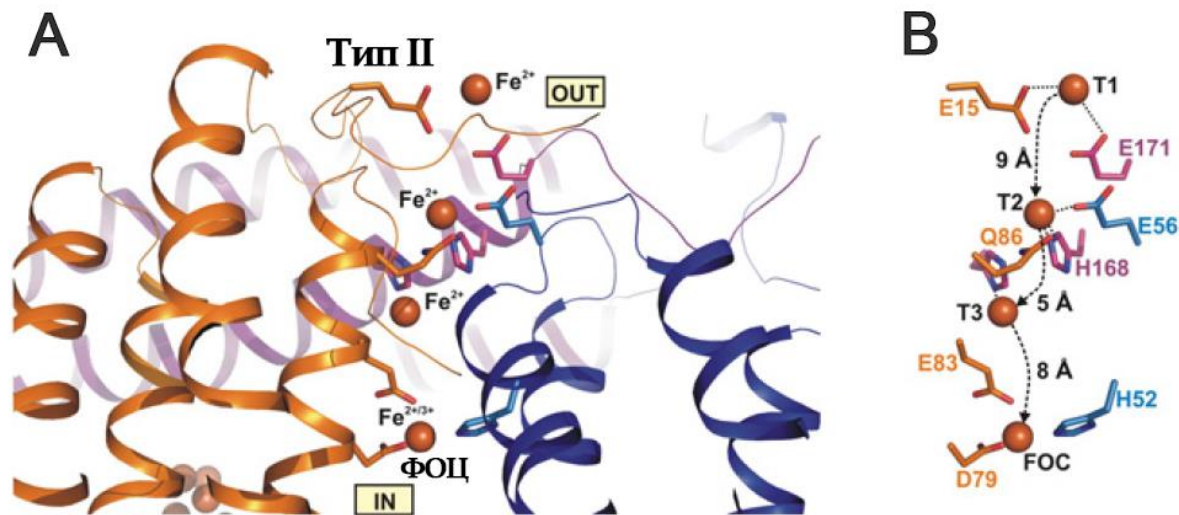


Рис. 6. А – схематичное изображение среза канала белка Dps (Тип II); В – схематичное изображение расположения остатков аминокислот, вовлечённых в процесс транслокации железа [212]

Наличие двух разных типов каналов (I и II) у белков семейства Dps различных таксонов обусловлено, вероятно, различными условиями обитания, особенностями питания и метаболизма. Например, Dps некоторых галобактерий вынуждены выполнять свои функции во внутриклеточной среде с большой концентрацией соли, достигающей 4–5М [153, 154]. Это могло стать причиной появления каналов типа II, транспортирующих дигидратированное железо. Хотя каналы типа II заряжены менее отрицательно по сравнению с каналами типа I, это компенсируется двумя факторами: большим количеством каналов типа II (12 против 4) и большей разностью потенциалов между внутренней полостью и внешней поверхностью.

Несмотря на меньший размер, каналы типа II, благодаря их большему количеству, могут перемещать примерно такое же количество железа, как и

каналы типа I. Помимо прочего, каналы типа II обладают некоторыми преимуществами, а именно: меньшей степенью связывания с ионами металла и меньшим расстоянием от выхода до ферроксидазного центра (0,8 против 2 нм).

Ферроксидазные центры (ФОЦ) – места, где ионы железа Fe^{2+} окисляются перекисью водорода до Fe^{3+} и далее запасаются во внутренней полости Dps. Первоначально они были обнаружены и изучены у классических ферритинов, а затем уже у бактериоферритинов и Dps [9, 72, 78, 79, 148, 213]. У белка Dps эти центры располагаются на границе двух мономеров на глубине примерно 2 нм от поверхности. Их структура достаточно консервативна, однако замена остатка аспарагина на гистидин у Dps из *T. elongatus* приводит к снижению сродства к ионам железа и увеличению сродства к ионам цинка, которые он окисляет уже с использованием O_2 , а не перекиси водорода [9]. Дальнейшие исследования показали возможность связывания не только цинка, но и других металлов [179].

1.5 Модели взаимодействия Dps с ДНК

Своим названием белок Dps обязан способности связываться с ДНК (**D**NA-binding **p**rotein from **s**tarved cells) [12]. Несмотря на прошедшие десятилетия с момента открытия Dps, сам механизм формирования нуклеопротеидных комплексов с участием Dps до конца неясен. Существует несколько моделей взаимодействия Dps с ДНК в структуре компактного нуклеоида.

Согласно одной из них, белок Dps формирует вокруг ДНК два связанных между собой кольца диаметром 9 нм, каждое из которых состоит из шести мономеров. Такие кольца укладываются в структуры более высокого порядка [12]. Эта модель предполагает перестройку шарообразной структуры додекамера в торообразную (Рис. 7) и, по-видимому,

«выворачивание» внутренней поверхности мономеров наружу, что представляется маловероятным, но способность димеров Dps связываться с ДНК [68, 146] не исключает такого способа взаимодействия.

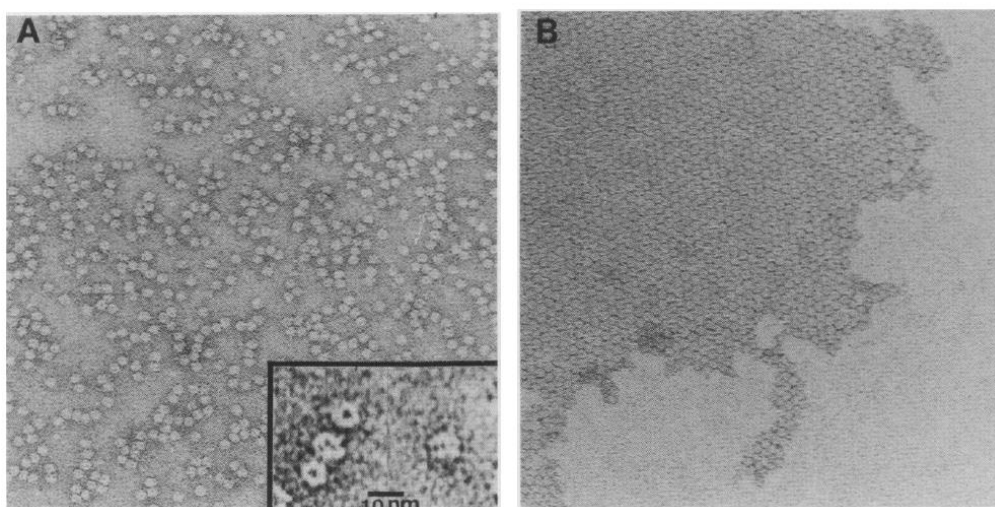


Рис. 7. Данные электронной микроскопии. А – чистый Dps; В – комплекс Dps-ДНК, формирующий гексагональные кольца [12]

Другая модель, предложенная Frenkiel-Krispin с соавторами, оспаривает возможность непосредственного связывания отрицательно заряженной двойной спирали ДНК с белком из-за того, что поверхность додекамера также несёт отрицательный заряд. Взаимодействие Dps с ДНК объясняется посредством образования ионных мостиков в присутствии Mg^{2+} [60, 61, 62] (Рис. 8). Её недостатком является неспособность объяснить явную зависимость ДНК-связывающей активности Dps от структуры гибких N-концевых фрагментов, несущих избыточный положительный, а не отрицательный заряд.

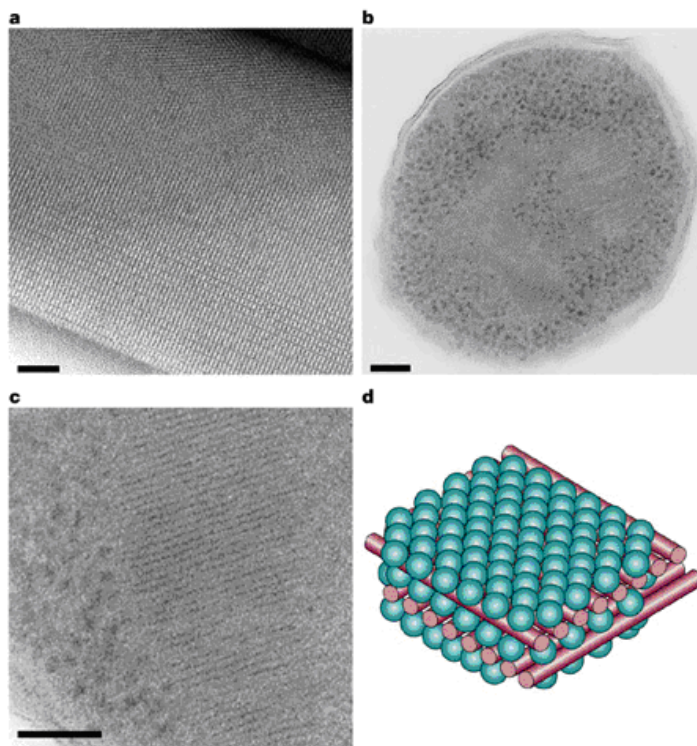


Рис. 8. Электронные микроснимки процесса со-кристаллизации Dps и бактериальной ДНК: а – при взаимодействии препаратов очищенных белка и ДНК; б и с – непосредственно в клетках *E. coli* во время поздней стационарной фазы роста; d – модель сокристаллизации белка Dps и ДНК (красным цветом изображена ДНК, голубым – белок) [130]

Все 12 N-концевых модулей додекамера выступают над поверхностью белка и содержат по 3 аминокислотных остатка лизина [122] и по одному остатку аргинина. Положительно заряженные N-концевые модули являются ключевыми элементами третьей модели [28, 31]. Именно им отводится главная роль в самоагрегации и в формировании ДНК-белковых комплексов (Рис. 9). При физиологических значениях рН боковые цепи этих аминокислот имеют положительный заряд и поэтому способны напрямую взаимодействовать с ДНК. Депротонирование остатков лизина при повышенных значениях рН уменьшает способность Dps взаимодействовать с ДНК, исключая возможность формирования крупных агрегатов. Мутантные клетки, содержащие Dps с одним (вместо трёх) остатков лизина, также

способны связывать ДНК, но не обеспечивают её полную конденсацию и изоляцию от повреждающих агентов.

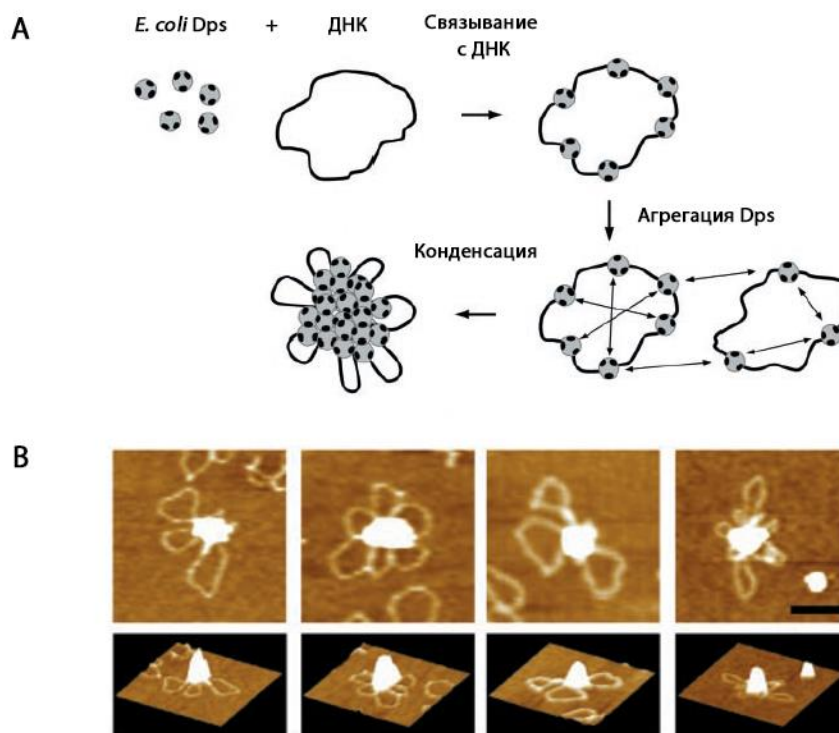


Рис. 9. А – модель конденсации ДНК в результате самоагрегации Dps, предложенная в работе [31]; В – данные атомно-силовой микроскопии, на основании которых построена модель

Мутанты, лишённые всех 3 остатков лизина на N-конце, так же как и белки семейства Dps, у которых отсутствует N-концевой фрагмент, совсем не способны связывать и конденсировать ДНК, как в случае белка из *Listeria innocua* [24], Dps из *Agrobacterium tumefaciens* [32], Dlp-1 и Dlp-2 из *Bacillus anthracis* [143], и HP-NAP из *Helicobacter pylori* [209]. Важно, что зависимость от N-концевого фрагмента оказалась одинаковой для образования комплексов белок-ДНК и агрегации додекамеров. Поэтому было высказано предположение, что оба явления обеспечиваются одним и тем же типом межмолекулярного взаимодействия [31]. Весомым подтверждением такой точки зрения являются данные о том, что формирование ДНК-белковых комплексов и агрегатов очищенного белка проявляет сходную зависимость от присутствия солей и малых заряженных молекул [62].

Стоит отметить, что взаимодействие ДНК с положительно заряженными участками поверхности Dps зарегистрировано и для других микроорганизмов даже при отсутствии лизиновых N-концов [31, 34, 37, 39, 60, 71, 91, 137, 149, 177]. Кроме того, установлено, что Dps из *M. Smegmatis* взаимодействует с ДНК с использованием С-концевого участка мономера [66, 158].

Помимо этого, в присутствии ДНК наблюдается формирование многослойных кристаллов ещё большего размера [31] (Рис. 10). Такой высокоорганизованный процесс «сокристаллизации» белка и ДНК был продемонстрирован для суперспирализованной плазмидной ДНК, линейной двуцепочечной ДНК и одноцепочечной РНК без видимых различий в кристаллической структуре [195]. Несмотря на то, что агрегация биологических макромолекул обычно считается несовместимой с выполнением биологических функций, «сокристаллизация» ДНК с Dps может быть частью защитной стратегии, так как позволяет изолировать ДНК от влияния множества повреждающих агентов. В естественных условиях для этого, очевидно, требуется много белка. Поэтому неудивительно, что при переходе бактерий от экспоненциальной фазы (быстрый рост) к стационарной (аминокислотное голодание) фазе роста количество молекул Dps в клетках увеличивается с 6000 до 180000 [21, 71, 174].

На Рис. 10 схематически показана модель плотной упаковки нуклеоида, отражающая роль ДНК-белковых и белок-белковых контактов, приводящих к образованию квази-кристаллических структур. Согласно этой модели, три смежных додекамера формируют пору, внутри которой находится часть N-концевых модулей додекамера [68]. Взаимодействующая с ними ДНК располагается внутри поры, словно нанизывает на себя тройки додекамеров. Коаксиальное расположение ДНК было подтверждено с помощью дифференциальной интерференционной контрастной и флуоресцентной микроскопии [195]. Тем не менее, полностью объяснить механизм формирования кристаллов в бактериальных клетках, находящихся

на поздней стационарной фазе роста, эта модель не позволяет. Также малопонятным остаётся механизм взаимодействия Dps с функционально-активным нуклеоидом во время экспоненциального роста, когда в клетках мало молекул Dps (в среднем всего один додекамер на 9300 пар нуклеотидов).

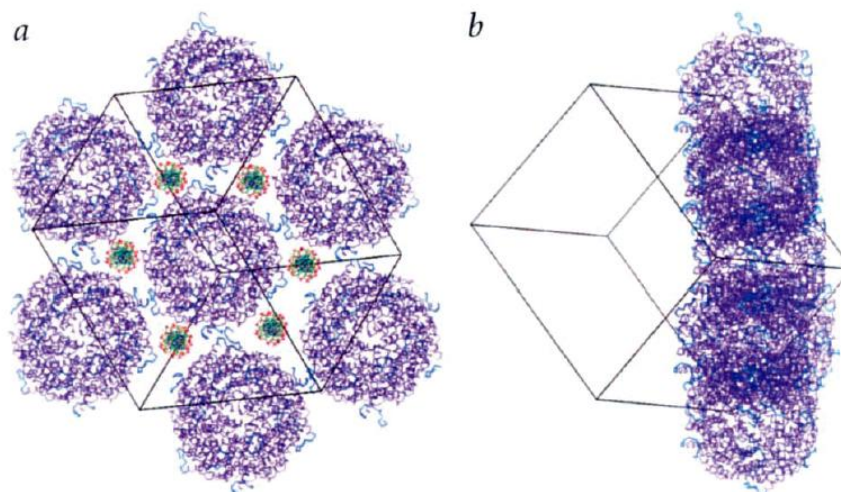


Рис. 10. Псевдо-гексагональная укладка в кристалле Dps и модель его взаимодействия с ДНК: центральная (а) и параллельная (b) проекции. Фиолетовым цветом обозначены додекамеры Dps, синим – N-концы каждого из мономеров, зелёным – двойная спираль ДНК, красным – фосфатные группы ДНК [68]

Наконец, модель, предложенная К. Zeth [212], объясняет компактизацию бактериального нуклеоида способностью Dps неспецифически связывать ДНК, которая накручивается вокруг додекамера белка в гистон-подобной манере.

Таким образом, белок Dps является неотъемлемым структурообразующим фактором нуклеоида, роль которого особенно важна при стрессовых условиях и во время стационарного роста. Способ его взаимодействия с функционально-активным нуклеоидом находится в стадии интенсивного исследования. Имеющиеся данные свидетельствуют о структурно-специфическом формировании ДНК-белковых комплексов, но,

учитывая прочность этих комплексов, пока неясно, каким образом конденсированный хроматин, образованный во время аминокислотного голодания, может быть ремодулирован обратно в активно транскрибируемый нуклеоид экспоненциально растущих клеток. Очевидно, что для объяснения данного процесса необходимо проведение дополнительного исследования с привлечением методов прямого визуального наблюдения.

1.6 Прикладные аспекты исследования нуклеопротеидных комплексов

Создание упорядоченных или одиночных структур размером менее 10 нм традиционными методами является труднореализуемой задачей, но её можно решить, используя новые биоорганические материалы. Особенно перспективными являются биомакромолекулы, с помощью которых возможно создание двух- и трёхмерных конструкций с заданными свойствами. К их числу, в частности, относятся ферритины, которые депонируют в клетках ионы железа (Рис. 11).

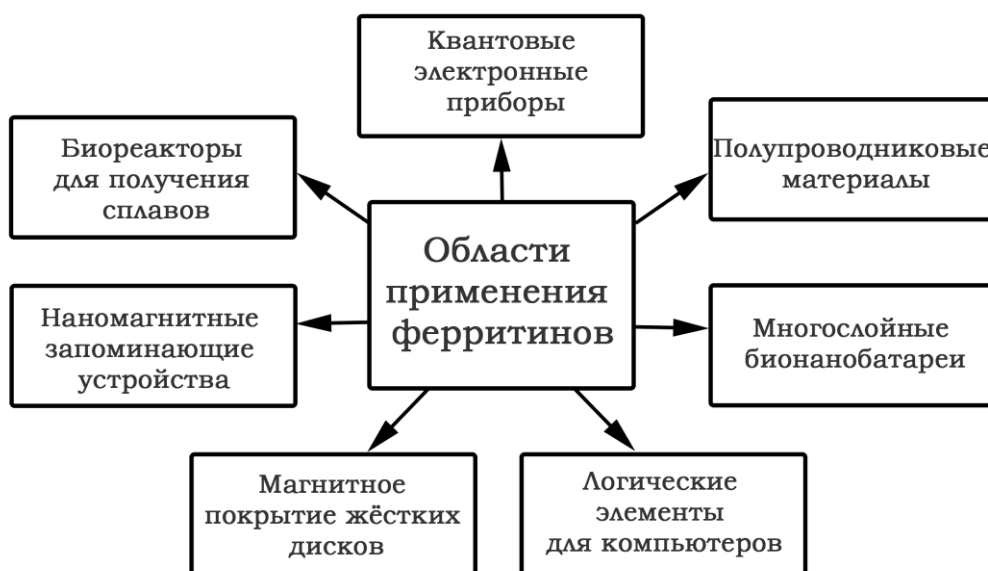


Рис. 11. Области прикладного применения белков-ферритинов

1.6.1 Нанореакторы для получения гомогенных материалов

Нанотехнология является одной из перспективных областей науки и техники. Однако для производства многих современных миниатюрных устройств требуются гомогенные материалы. Традиционные методы химии и физики, используемые для этой цели, зачастую отличаются определёнными недостатками, имеющими порой критическое значение на наноуровне. Одной из возможностей по решению данной проблемы является использование биомолекул, в частности, белков семейства ферритинов в качестве реактора для синтеза требуемых веществ [10, 52, 53, 119, 127, 128, 129, 140, 181]. Диаметр внутренней полости белков семейства ферритинов варьируется от 5 до 8 нм, что позволяет их использовать как универсальные откалиброванные контейнеры природного происхождения [185]. В настоящее время для этой цели используется два подхода.

Первый подход основан на изменении значений рН раствора, в который помещён ферритин, с целью обратимой денатурации белка. При значении рН 2 ферритин диссоциирует на субъединицы, после чего раствор постепенно очищают от ионов исходного металла с помощью диализа и добавляют к раствору мономеров необходимые ионы металла, затем плавно повышают значение рН. Остатки фосфорной кислоты и металла связываются с «внутренней» частью субъединицы, поэтому после сборки белка они оказываются во внутренней полости, формируя, таким образом, неорганическое ядро (Рис. 12).

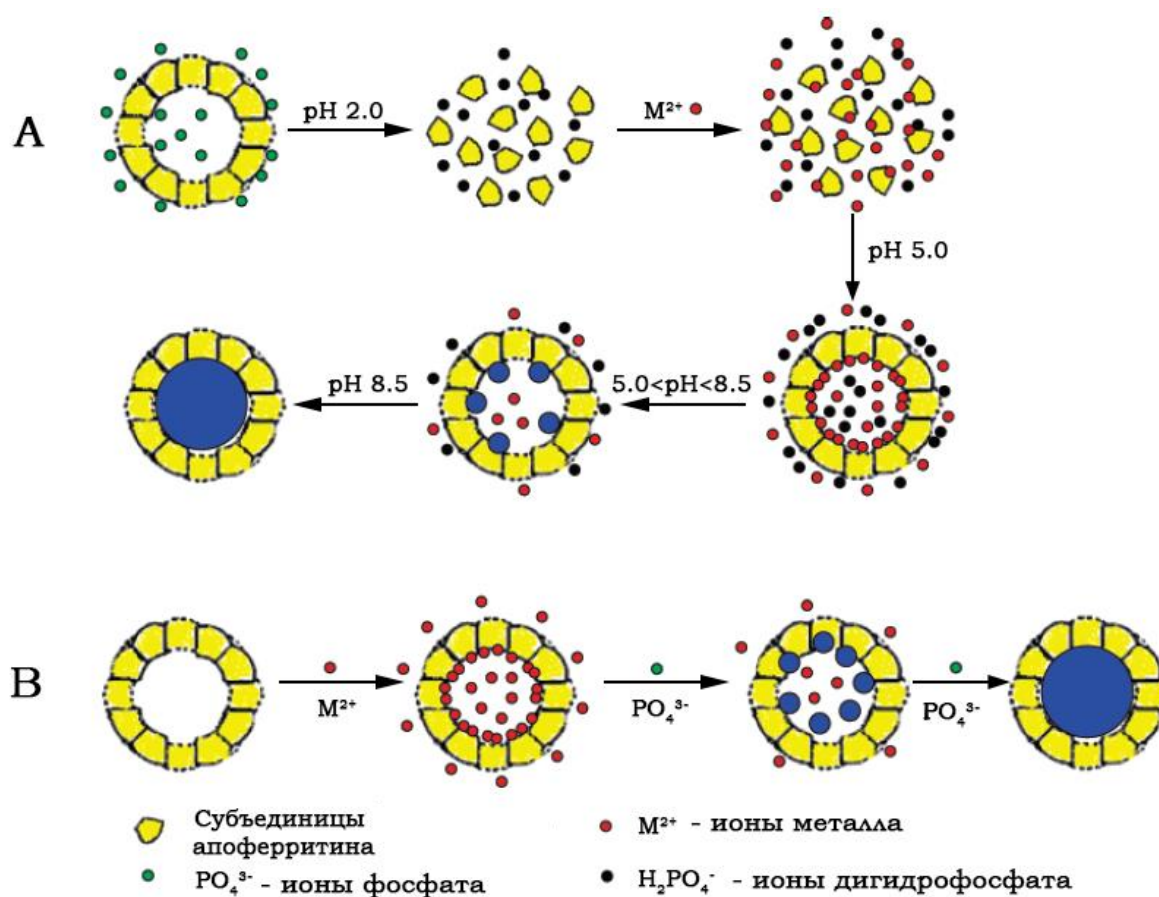


Рис. 12. Различные методы, применяемые для получения наночастиц:
 А – метод обратимой денатурации белка; В – метод диффузии [109]

Второй подход, используемый для создания металлических (CoPt) или кристаллических частиц (CdS), заключается в помещении ферритинов в раствор, содержащий ионы металла, которые диффундируют внутрь белка, образуя ядро. Варьируя концентрацию ионов в растворе, можно изменять размер получаемых наночастиц [190, 196]. Стоит отметить, что внутренняя среда белка играет важную роль в минерализации наночастиц, поэтому для получения комплексных наночастиц важно поэтапное добавление ионов – сначала катионы, а затем анионы [185].

Использование данного метода позволяет получать как металлические, так и кристаллические наночастицы. К настоящему времени удалось синтезировать спектр разнообразных материалов внутри белковой полости ферритинов. Это и ферромагнитные наночастицы CoPt [190], частицы Pd [186], Ag [64, 97], Cu [35, 56] Ni [64, 65], Co [64, 65], Au/Pd [175],

Mn_3O_4 [128], $Co(O)OH$ и Co_3O_4 [52, 181], $Cr(OH)_3$ и $Ni(OH)_3$ [140], $Eu(O)OH$ и TiO_2 [95], а также сульфиды [196], фосфаты [109], селениды различных металлов [82, 200]. Причём некоторые материалы были синтезированы непосредственно с помощью Dps [10, 11, 83, 88, 89].

Таким образом, спектр применения наночастиц, получаемых на базе ферритинов, весьма разнообразен, а использование различных соотношений компонентов в растворах позволяет получать наночастицы с заданными свойствами [109].

1.6.2 Полупроводниковые приборы

Фотолитография, являясь одним из основных инструментов по миниатюризации устройств, позволила за последние 50 лет уменьшить размер полупроводниковых приборов в несколько раз. Однако к настоящему моменту фотолитография достигает предела своих возможностей [199], что вынуждает искать иные способы и техники.

Использование ферритиновых наночастиц является одним из перспективных направлений. Как было упомянуто выше, в белковой полости ферритина на сегодняшний день синтезирован целый ряд соединений [10, 11, 35, 52, 56, 64, 65, 82, 83, 88, 89, 95, 97, 109, 128, 140, 175, 181, 186, 190, 196, 200]. Это позволяет использовать подобные наночастицы в таких миниатюрных полупроводниковых устройствах, как одноэлектронный транзистор и транзистор с плавающим затвором [202], а также тонкоплёночный транзистор [94, 140]. К настоящему времени проведена целая серия экспериментов с ферритинами, направленная на получение полупроводниковых устройств [77, 98, 132, 133, 134, 198, 199, 200, 201, 202]. Основная идея заключается в упорядоченном расположении слоя ферритинов на подложке, например, кремния (Рис. 13). И молекулы ферритина, и поверхность кремниевой подложки заряжены отрицательно, что затрудняет сорбцию белка на её поверхности. Однако это проблема решается

расположением положительно заряженного слоя, например, из 3-аминопропил-триэтоксисилана между ними [98, 99, 205]. Модификация поверхности подложки – не единственная возможность устранить электростатическое отталкивание. В некоторых случаях возможна модификация поверхности ферритина, в результате чего взаимодействие белка с близлежащими молекулами будет осуществляться за счёт гидрофобных связей, контролировать которые можно будет посредством изменения характеристик буферного раствора [202].

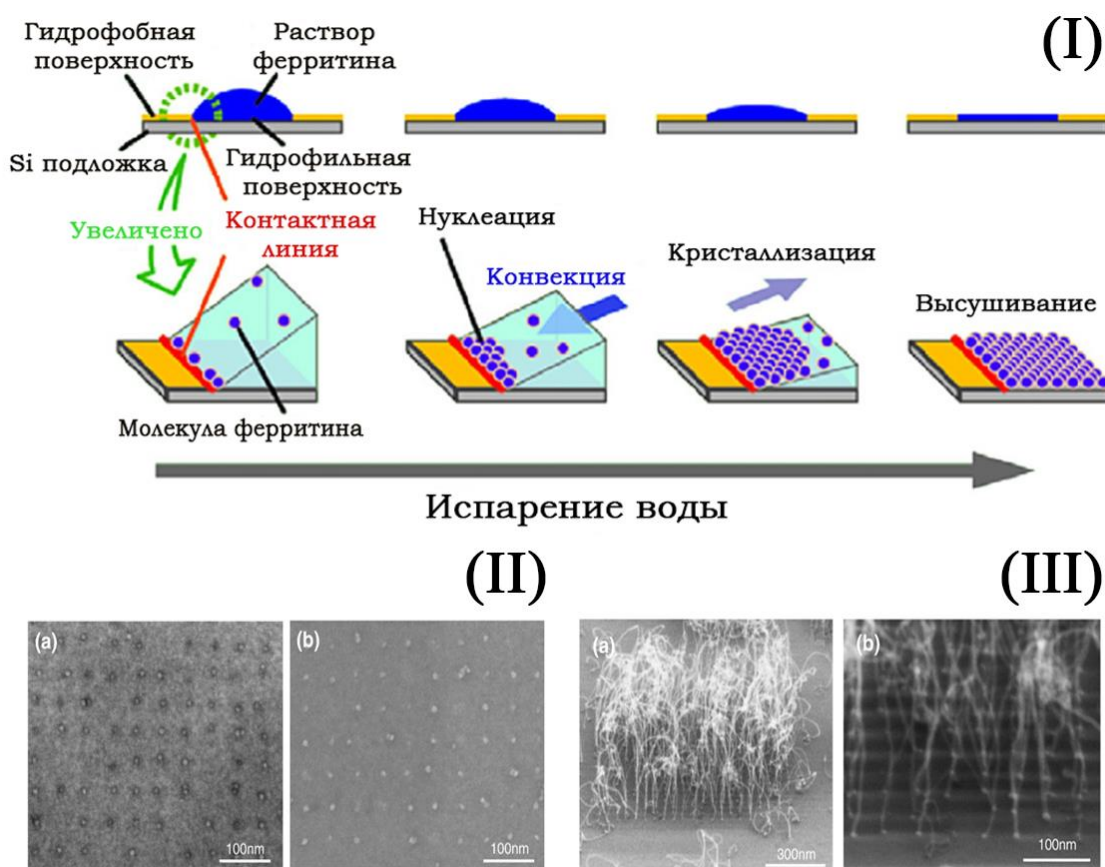


Рис. 13. (I) – схематичная иллюстрация метода двумерной кристаллизации ферритина [202]; (II) – изображения регулярного расположения ферритиновых наночастиц до (a) и после (b) отжига, полученные с помощью электронной микроскопии; (III) – Изображения карбоновых нанотрубок, выращенных из ферритиновых наночастиц, полученные с помощью электронной микроскопии [100]

После постепенного высушивания на подложке остаётся слой ферритинов с относительно регулярным расположением частиц. Последующий отжиг позволяет избавиться от органических компонентов, оставляя лишь металлические ядра с расположением в порядке, соответствующем исходному расположению белковых частиц (Рис. 13). Полученные структуры можно использовать как для создания транзисторов с плавающим затвором [77, 133, 134, 135, 136, 198, 206], так и для синтеза карбоновых нанотрубок [86, 96, 100, 105, 176]. В последнем случае карбоновые нанотрубки выращиваются на металлическом ядре, оставшемся на кремниевой подложке, а, манипулируя плотностью размещения ферритинов на подложке, можно регулировать плотность выращиваемых объектов.

1.6.3 Нанобатареи

В 2007 году в работе [40] была предложена концепция, дополненная позже [191], которая подразумевает использование чередующихся между собой слоёв ферритина, содержащих разные металлические ядра, для создания нанобатареи. В качестве металлов можно использовать как соединения Fe, так и соединения Co или Ni. Сама концепция батареи основана на 4 идеях: слои ферритина должны различаться окислительно-восстановительным потенциалом; батарея должна содержать анод и катод; необходимо присутствие ион-проницаемой мембраны, отделяющей компоненты нанобатареи; количество электронов, переходящих от ячейки к ячейке, должно быть максимизировано. Наличие мембраны позволяет ионам мигрировать в процессе зарядки и разрядки батареи. Помимо этого, мембрана не требуется, если активные материалы крепко привязаны к подложке.

Сам процесс создания нанобатареи заключается в нанесении на подложку из золота или легированного кремния слоя нативного ферритина,

содержащего внутри соединения железа. Вторым слоем наносится модифицированный ферритин, содержащий в своей внутренней полости соединения кобальта или никеля, далее батарея формируется на основе чередования подобных слоёв. После формирования слоёв к той части батареи, которая содержит соединения железа, присоединяется анод, к противоположной части батареи, содержащей соединения кобальта или никеля, – катод [191]. На Рис. 14 изображена схема реализации ферритиновой нанобатареи с использованием $\text{Fe}(\text{OH})_2$ и $\text{Co}(\text{OH})_3$.

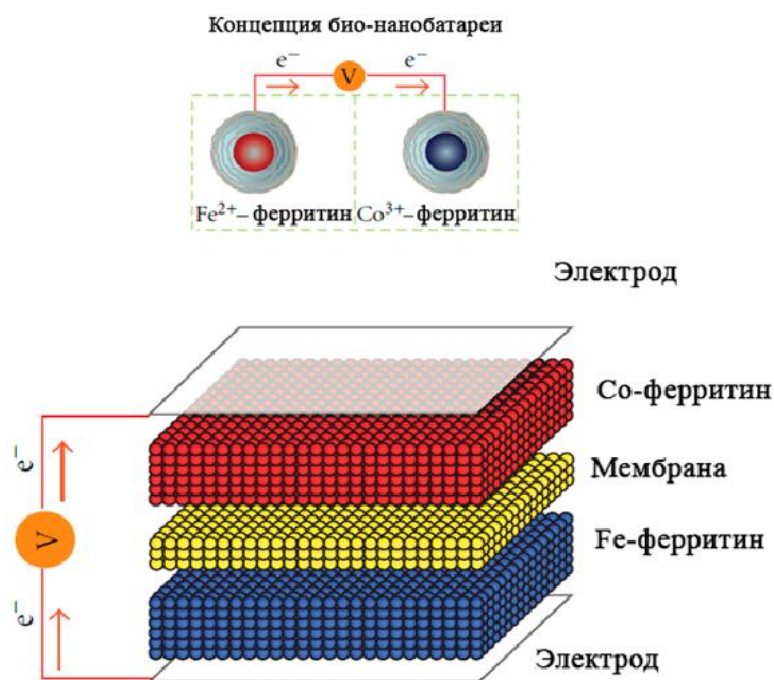
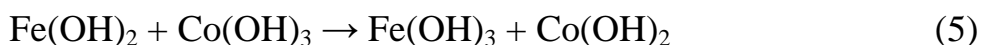
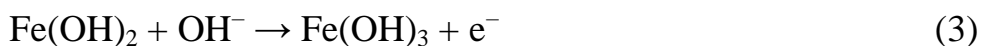


Рис. 14. Схема реализации нанобатареи с использованием ферритинов [191]

Каждый тип ферритина находится в буферном растворе, золотые электроды разделены ион-проницаемой мембраной. Когда цепь замкнута, электроны перемещаются по внешней цепи от анода к катоду.



В ходе работы аккумулятора протекает реакция (3), в результате чего образуется один электрон e^- и поглощается один ион OH^- , тогда как в ходе

реакции (4) выделяется один ион и поглощается один e^- . Суммарная реакция представлена как (5).

Диффузия ферритинов к электродам является лимитирующим фактором для электрического тока. Ёмкость же батареи будет зависеть от размера подложки и толщины золотого слоя, к которому присоединяется ферритин. Согласно предыдущим исследованиям [92, 120, 210], окисления ядер ферритинов в присутствии золотых электродов замечено не было. Для прочной связи слоя ферритина с подложкой его присоединяют химически. В этом случае мембрана не требуется. Если же слой ферритина не закреплён, требуется мембрана для защиты от разрядки батареи [214].

1.6.4 Применение в медицине

Размер и структура ферритина, а также его совместимость с биологическими тканями делают его подходящим объектом для использования в медицине. Различными авторами предложено использование ферритинов, например, в качестве метки [84], вакцины [87] или для доставки лекарства [219].

Для достижения данных целей оболочка ферритина модифицируется посредством присоединения к поверхности пептидов [107] и различных молекул [106] или модифицируется генетически [184], а внутренняя полость может заполняться ионами [196, 197].

В качестве связывающих молекул могут быть использованы, например, антитела, которые потом прикрепляются к наночастицам за счёт ковалентных или слабых связей. Ионы металлов, например, европия, оказываются внутри белка во время самосборки и служат в качестве флуоресцентной метки, которую можно детектировать при помощи различных методов [76].

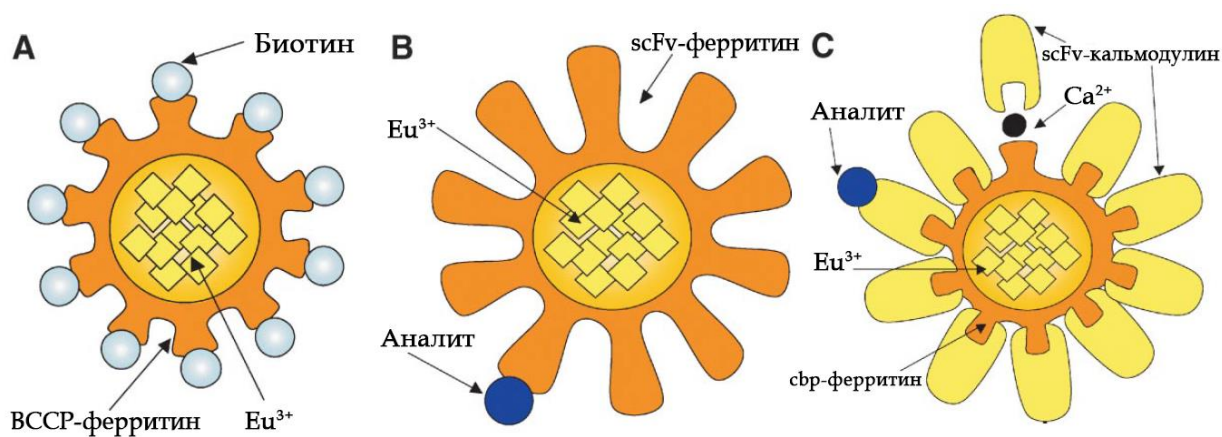


Рис. 15. Схематическое изображение ферритиновых наночастиц,

связанных с различным типом молекул: А – биотином, В – scFv-антителом к

TSH, С – кальмодулином [84]

Результаты работ [193] указывают на возможность связывания с ферритином не только отдельных молекул биотина, стрептавидина, кальмодулина, фрагментов антител, но и построения более сложных комплексов на их основе.

Полученные результаты говорят о возможности гибкого использования полученных молекул за счёт генерации гомогенных наночастиц разнообразного строения. Создание же антител *in vitro* открывает широкие перспективы для получения частиц с заданной специфичностью практически к любому антигену.

Кроме того, с использованием белков семейства ферритинов были получены такие вещества как магнетоферритин [27, 51, 211] и сжиженный белок [90, 147, 170], который можно трансформировать в вещество, по свойствам напоминающее жидкий кристалл.

1.7 Проектирование и создание молекулярных конструкций с применением методики «ДНК-оригами»

Способность белков Dps взаимодействовать с ДНК позволяет использовать последнюю для конструирования различных структур. Причём

за счёт сродства к специфичным участкам ДНК можно добиться регулярного расположения частиц.

«ДНК-оригами» – это перспективная прикладная технология, позволяющая проектировать и создавать искусственные ДНК-структуры с заданными свойствами и размерами. В этом случае нуклеиновые кислоты используются не для хранения генетической информации, а для получения материалов нанометрового диапазона заданной формы, причём как двумерных [157, 165], так и трёхмерных [36, 67, 171, 220]. Данное направление хоть и получило название «ДНК-оригами», но охватывает использование нуклеиновых кислот в целом.

Сама концепция подобного использования нуклеиновых кислот была предложена Н. Зиманом (Nadrian Seeman) в 1982 году [164] и получила широкое распространение в начале XXI века. Суть данного подхода заключается в проектировании ДНК-последовательности для получения заданных разветвлённых ДНК-объектов с использованием принципа комплементарности и возможности лигирования нуклеиновых кислот (Рис. 16) [163, 164].

ДНК – хорошо изученная биомолекула, которая может быть использована как для создания только ДНК-структур, так и комплексных структур, где ДНК выступает в роли каркаса и удерживает остальные молекулы. Более того, за счёт использования принципа комплементарности, проектирование ДНК-материалов отличается гибкостью с высоким уровнем контроля [208]. За прошедшее время исследователи, используя этот подход, спроектировали и создали самые различные структуры [108, 123, 141, 162, 165, 203], причём некоторые могут весить до 5 мегадальтон, что превышает массу рибосомы (Рис. 16-II).

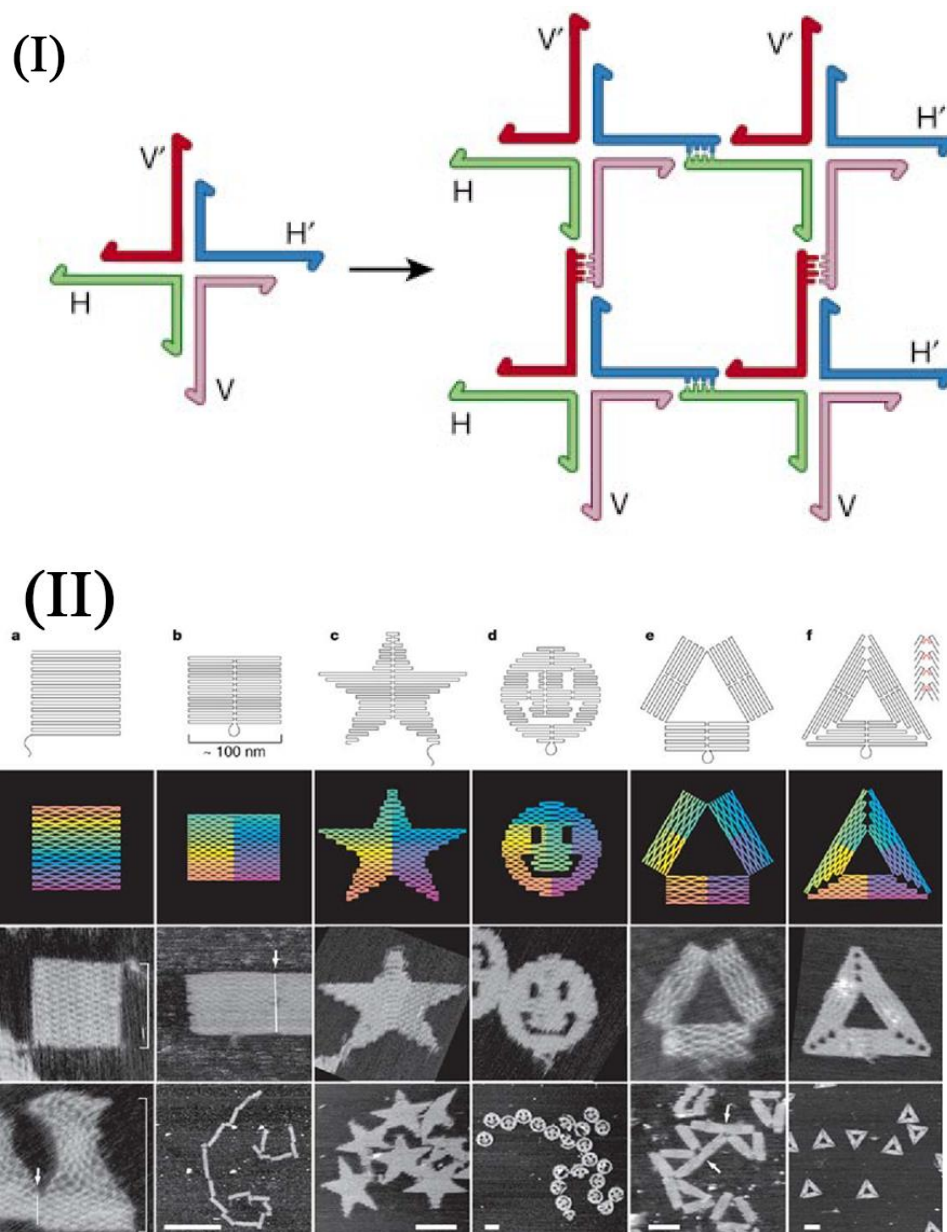


Рис. 16. (I) – схема процесса самосборки двумерной разветвлённой ДНК-молекулы, H, H', V, V' - липкие концы ДНК-молекулы, по которым происходит лигирование с соседними молекулами [163]; (II) – АСМ-изображения полученных двумерных ДНК-структур различной формы [157]

Создание таких ДНК-объектов требует привлечения широкого спектра методов при проектировании создаваемых конструкций, поэтому этот процесс является трудоёмким и длительным. За последние несколько лет данное направление получило значительное развитие за счёт совершенствования как способов проектирования с использованием специализированного программного обеспечения, так и способов аттестации,

посредством, например, атомно-силовой и электронной микроскопии, что позволяет конструировать всё более и более сложные объекты.

Существует два общих подхода для проектирования ДНК-структур с заданными размерами и свойствами. Первый заключается в использовании одной длинной одноцепочечной молекулы ДНК для формирования каркаса будущей структуры, а также набора более коротких одноцепочечных фрагментов ДНК, которые используются для фиксации конечной двумерной или трёхмерной конструкции. Второй подход основан на использовании коротких фрагментов, частично или полностью комплементарных друг другу. Благодаря возможности задавать свойства ДНК-структур, они могут быть использованы для упорядочивания и ориентации различных гетероэлементов, таких как белки [57, 113, 114, 144, 160], различные наночастицы [131], вирусные капсиды [173] и пептиды [194]. Тем не менее, в долгосрочной перспективе требуется лучшее понимание кинетики и термодинамики процесса самосборки как элементарных ДНК-конструкций, так и развитых ДНК-структур. Это позволит добиться более точного контроля самосборки биомолекул в высокоорганизованные и упорядоченные молекулярные массивы.

К настоящему времени ДНК-структуры используются для решения конкретных прикладных задач, таких как: упорядочивание золотых и серебряных наночастиц [26, 166, 180], карбоновых нанотрубок [126] или молекул фуллерена [47]. Кроме того, предложены концепции использования металлизированных фрагментов ДНК в электронике и фотонике [111, 161], для создания устройств, способных осуществлять движение [45, 110, 140, 168], для интеграции сложных молекулярных конструкций в единое целое [204], а также для адресной доставки веществ, например, лигандов, меток, гормонов, антител и других [150]. Наконец, ДНК-структуры могут использоваться при упорядочении белков для нужд кристаллографии.

Таким образом, использование искусственных самособирающихся молекул ДНК в комплексе с различными частицами, в частности, с белками,

является весьма перспективной областью исследования, которая может быть использована в качестве инструмента для решения различных фундаментальных и прикладных задач биологии, наноэлектроники и наномедицины [55, 150].

Ферритины, в частности Dps, на сегодня рассматриваются как перспективный материал для использования в нанобиотехнологии за счёт своего малого размера, а также возможность модификации их поверхности и синтеза во внутренней полости соединений с заданными свойствами. Конструктивным преимуществом использования белка Dps является возможность создания на его основе различных структур с использованием олигонуклеотидных матриц, к которым этот белок имеет естественное сродство. Это позволяет не только упорядочить расположение белковых частиц в пространстве, но и создавать сложные двумерные и в перспективе трёхмерные конструкции. Таким образом, исследование закономерностей, лежащих в основе механизмов взаимодействия белка Dps с участками ДНК различного нуклеотидного состава и пространственной организации, а также построения различных конструкций на их основе, является актуальной и перспективной задачей не только с точки зрения фундаментальных исследований, но и с точки зрения прикладного использования.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Бактериальные штаммы

Для получения клеточных лизатов, содержащих повышенное количество Dps, выделения и очистки из них рекомбинантного белка был использован штамм *E. coli* BL21*(DE3), специально оптимизированный для суперпродукции рекомбинантных белков. Для амплификации исследуемых фрагментов ДНК и их выделения был использован штамм *E. coli* K12.

2.2 Суперпродукция, выделение и очистка рекомбинантного белка

Dps

Клетки *E. coli* BL21*(DE3), трансформированные плазмидой pGEM-*dps*, выращивали на среде Лурия-Бертани (LB) (pH 7,4) при температуре 37°C с антибиотиком (ампициллин 20 мкг/мл). Индукцию белка проводили при OD₆₀₀ 0,4–0,6 добавлением в клеточную культуру 0,1 mM IPTG, после чего продолжали рост ещё в течение 12 часов при 37°C. Клетки осаждали центрифугированием при 10000 об/мин, отмывали два раза от среды холодным 0,01 M Tris-HCl буфером, pH 8,0 и хранили при –20°C. Уровень индукции рекомбинантного белка Dps оценивали с помощью электрофореза в 12,5% денатурирующем ПААГ по модифицированному методу Дэвиса.

Для выделения и очистки белка биомассу размораживали на ледяной бане, добавляя 3 мл охлаждённого буфера для лизиса, содержащего 50мM Tris-HCl (pH 8,0), 1мM EDTA, 100 мM NaCl. Клеточную массу разрушали, добавляя лизоцим (4 мкг/мл) и PMSF (4мкM) с дальнейшей инкубацией на ледяной бане в течение 20 мин. Далее суспензию клеток подвергали воздействию ультразвука на дезинтеграторе УРСК-7Н-18 суммарно в течение 1 минуты. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 13000 об/мин в течение 10 минут при +4°C.

Полученный лизат наносили на ионообменную колонку ДЕАЕ-Сефадекс-A25 (medium) (Sigma-Aldrich, USA), предварительно уравновешенную элюирующим буфером, содержащим 50мМ NaCl, 10мМ Tris-HCl (pH 8,0), 0,1мМ EDTA, 0,1мМ DTT, и разделяли на хроматографической системе LKB (Pharmacia, Sweden). Для очистки белка использовали градиент концентраций NaCl (от 50 до 700 мМ). Скорость элюции составляла 20мл/ч. Собирали фракции объемом 2,0 мл, присутствие белка в них определяли с помощью электрофореза в 12,5% денатурирующем ПААГ по модифицированному методу Дэвиса. Перед гель-фильтрацией фракции, содержащие целевой белок и минимальное количество примесей, объединяли и подвергали высаливанию сульфатом аммония (конечная концентрация 90%) в течение 30мин при 0°C. Преципитат осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 13000 об/мин и растворяли в буфере, содержащем 500мМ NaCl, 50мМ Tris-HCl (pH 8,0), 0,1мМ EDTA. Полученный раствор белка подвергали гель-фильтрации с использованием смолы Сефадекс-G200 (Pharmacia, Швеция). Элюцию белковой фракции осуществляли буфером, содержащим 500мМ NaCl, 50мМ Tris-HCl (pH 8,0), 0,1мМ EDTA со скоростью элюции 20мл/ч.

Для хранения белок концентрировали на колонках Vivaspin 20 (Sartorius, Германия) с порами, пропускающими белки массой менее 10кДа. Для этого содержимое колонки несколько раз центрифугировали при 13000 об/мин до достижения раствором белка нужного объема. Полученный препарат диализовали против буфера, содержащего 50мМ NaCl, 50мМ Tris-HCl (pH 8.0), 0,1мМ EDTA. На этой стадии чистота препарата составляла более 95%. На Рис. 17 показан уровень суперпродукции Dps в клеточном лизате (панель А) и результаты последовательных этапов очистки (панель В). Концентрацию очищенного белка определяли с помощью спектрофотометра Nanodrop ND-1000 (США).

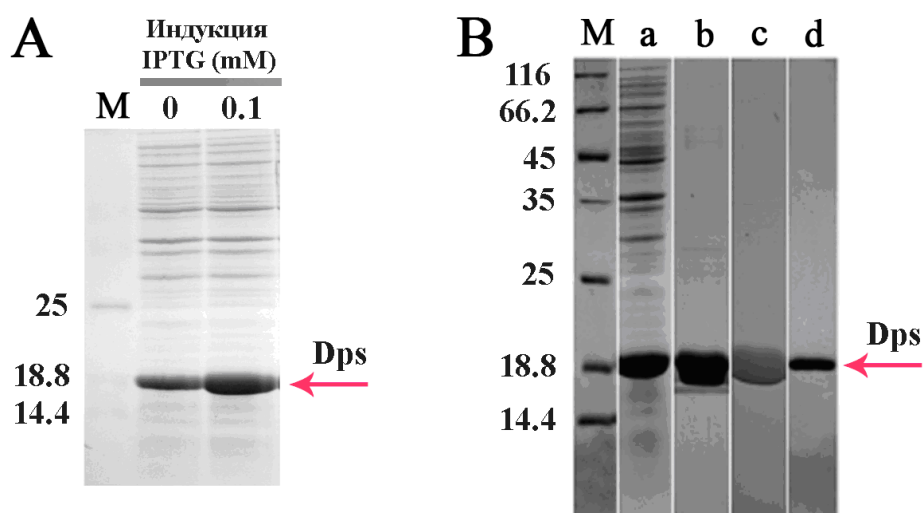


Рис. 17. А – уровень суперпродукции Dps в клеточном лизате *E.coli* в отсутствие IPTG и при добавлении 0,1мМ IPTG, соответственно; В – результаты последовательных этапов очистки Dps. М – маркеры молекулярной массы; а – суммарный лизат клеток; б – фракция белков, полученная после ионообменной хроматографии; с – препарат после гель-фильтрации; d – конечный препарат белка.

2.3 Электрофорез белков в ПААГ в денатурирующих условиях

Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии SDS проводили по модифицированному методу Дэвиса [44] с использованием электрофоретической камеры «Mini-Protean» (BioRad). Перед нанесением на гель к образцам белка добавляли буфер, содержащий 0,125М Tris-HCl (pH 6,8), 4% SDS, 20% глицерин, 0,002% бромфеноловый синий, 10% меркаптоэтанол, после чего пробы инкубировали при 95°C в течение 5 минут. Гели после электрофореза окрашивали 0,01 % раствором Кумасси R-250 на смеси этанол – уксусная кислота – вода в соотношении 4:1:5.

2.4 Определение нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК по Максаму-Джилберту

Секвенирование фрагментов проводилось по методике, приведённой в [63], с небольшими модификациями. К экстрагированному из геля модифицированному [γ - ^{32}P] фрагменту ДНК добавляли 200 мкл буфера, содержащего 50 мМ какодилат натрия (рН 8,0) и 1 мМ EDTA. Смесь охлаждали во льду, после чего добавляли 1 мкл диметилсульфата (DMS, Wako, Япония) и инкубировали 4–5 минут (в зависимости от длины и концентрации фрагмента) при комнатной температуре. Затем добавляли 50 мкл буфера для остановки реакции (DMS-stop), содержащего 1,5 М ацетат натрия (рН 7,0), 1 М DTT и тРНК (100 мкг/мл). Продукты реакции осаждали добавлением трёх объёмов 96% EtOH, выдерживали 4–8 часов при -20°C и центрифугировали при 10000 об/мин в течение 20 минут. Осадок растворяли в 250 мкл 0,3М ацетата Na и переосаждали тремя объёмами 96% этанола. После центрифугирования осадок промывали 70% EtOH, высушивали с использованием вакуумного насоса и растворяли в 30 мкл 1 М пиперидина. Полученную пробу прогревали при 95°C в течение 30 минут и также высушивали в вакууме, после чего дважды промывали в 10 мкл деионизованной стерильной воды и снова высушивали. Сухой осадок растворяли в 10–30 мкл буфера, содержащего 98% формамид, 8 мМ NaOH, 4 мМ EDTA, кипятили 5 минут, охлаждали до 0°C и наносили на денатурирующий 8% ПААГ. После проведения электрофореза гель экспонировали на экран Imaging Screen K (Bio-Rad, США) в течение 12–24 часов и визуализировали с помощью сканера Bio-Rad Personal Molecular Imager FX (США).

2.5 Локализация сайтов взаимодействия белка Dps с ДНК

Футпринтинг ДНК представляет собой метод поиска в структуре ДНК нуклеотидных последовательностей для ДНК-связывающих белков. Он позволяет установить последовательности нуклеотидов ДНК, с которыми взаимодействуют белки, как *in vitro*, так и *in vivo*. Для футпринтинга 5'-концы праймеров dps_2 и dps_3 (Табл. 1) были мечены ³²P при помощи полинуклеотидкиназы T4 (Fermentas) согласно протоколу, рекомендованному производителем. Три фрагмента ДНК были амплифицированы в ПЦР с парами праймеров ³²P-dps_2 – dps_1, dps_F2 – ³²P-dps_3 и dps_4 – ³²P-dps_3. Амплифицированные фрагменты были экстрагированы из геля согласно методике, описанной в [118].

Табл. 1. Праймеры, использованные в работе

Название	Последовательность использованных праймеров (подчёркнуты отсутствующие в геноме линкеры)	Позиция 5'-конца геномной последовательности	Нить	Длина фрагмента с линкерами
dps_1	5'-АТАТ <u>CTAGAT</u> АТАТАААGACGGTGTA-3'	849136	+	214 н.п.
dps_2	5'-GGAAGATCTTCCSTCGGAGAAACACT-3'	849331	-	(H)
dps_3	5'-TCCT <u>CTAGAT</u> GTTATGTCCCAGT-3'	848930	+	259 н.п.
dps_4	5'-ATGCAGATCTTCTCGCTACTTTTC-3'	849169	-	(S)
dps_3	5'-TCCT <u>CTAGAT</u> GTTATGTCCCAGT-3'	848930	+	420 н.п.
dps_2	5'-GGAAGATCTTCCSTCGGAGAAACACT-3'	849331	-	(L)

Для формирования нуклеопротеидных комплексов образцы ДНК (1 пмоль на реакцию) инкубировали 1 час при 37°C в 30 мкл транскрипционного буфера, содержащего 50 мМ TrisHCl (pH 8,0), 0,1 мМ EDTA, 0,1 мМ DTT, 10 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl и 5 мг/мл BSA (Sigma, США). Затем белок Dps был добавлен к полученным образцам ДНК в 2–10 кратном молярном избытке. Полученную смесь инкубировали 40 минут при 37°C. Для идентификации областей ДНК, с которыми взаимодействовал Dps,

реакционную смесь обрабатывали 3 мкл ДНКазы I (конечная концентрация 1 мкг/мл) в течение 2 минут, после чего реакцию останавливали добавлением 35 мкл 8М ацетата аммония. Продукты, полученные в результате обработки ДНКазой I, осаждали этанолом и наносили на 6% полиакриламидный гель. Фракционирование осуществляли в буфере TBE в присутствии 8М мочевины и визуализировали с помощью радиоавтографии. Гель калибровали маркерами, приготовленными по методу Максама-Гилберта.

2.6 Амплификация фрагментов ДНК

Амплификацию фрагментов, выбранных для анализа эффективности их взаимодействия с белком Dps, проводили в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием праймеров, приведённых в Табл. 1, на программируемых термостатах Thermocycler (Biometra, Германия) или ДТ-322 (ДНК-Технология, Россия).

Так как праймеры были максимально выровнены по GC-составу, программа амплификации для всех участков бактериальной ДНК была одинаковой и состояла из следующих циклов:

- 94°C – 4 минуты (предварительная денатурация ДНК-матрицы);
- 94°C – 20 секунд (плавление цепей);
- 55°C – 30 секунд (отжиг праймеров);
- 71°C – 40 секунд (синтез). (Всего 30 циклов).

ПЦР-смесь (20 мкл) содержала по 10 пмоль праймеров, 0,1мМ каждого dNTP, 1 нг геномной ДНК, 1 X Taq – буфер (67 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 2 мМ MgCl₂, 15 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,2% BSA), 1 U Taq ДНК-полимеразы (Евроген, Россия), стерильную деионизованную воду. Полученные ампликоны очищали от праймеров и субстратов электрофоретически в 5% ПААГ в присутствии бромфенолового синего для визуализации фронта. Электрофорез проводили в буфере TBE (89 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 89 мМ борная кислота, 2 мМ EDTA) в электрическом поле с напряжением 200–250

В и силой тока 70–110 мА. После разделения фрагментов гель окрашивали бромистым этидием и визуализировали на трансиллюминаторе согласно стандартному протоколу.

2.7 Экстракция фрагментов ДНК из ПААГ

Для экстракции полученных фрагментов ДНК из геля использовали две методики. Первая методика заключается в том, что полученные после электрофоретического разделения фрагменты бактериальной ДНК экстрагировали из геля путем вырезания участка, содержащего искомый фрагмент, а затем измельчали их чистым скальпелем [118], переносили в стерильную пробирку типа «Эппендорф» и гомогенизировали тefлоновым пестиком. К полученному гомогенату добавляли 400–700 мкл (в зависимости от количества фрагмента) элюирующего буфера (0,5 мМ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (рН 8,0), 1 мМ EDTA) и инкубировали 12–16 часов при непрерывном перемешивании. После чего пробы центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 минут при комнатной температуре, супернатант переносили в новую пробирку, а к осадку акриламида добавляли половину его объёма элюирующего буфера, перемешивали и повторяли центрифугирование. Затем фрагменты ДНК осаждали из надосадочной жидкости путём добавления 2,5 объёмов этанола, а полученную смесь инкубировали 15–20 часов при -20°C . После окончания инкубации смесь центрифугировали при 10 000 об/мин 20 минут ($+4^\circ\text{C}$). Надосадочную жидкость удаляли, полученный осадок промывали 70% этанолом, после чего высушивали и растворяли в небольшом объёме (20–100 мкл) деионизированной воды. Концентрацию фрагментов определяли на спектрофотометре ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc., США).

Вторая методика основана на электроэлюции. Для этого вырезанная часть геля, содержащая целевой фрагмент ДНК, помещалась в диализный мешок и заливалась 2 мл буфера TBE. Далее проводили электроэлюцию при

напряжении 100 В и силе тока 100 мА. Полученную смесь центрифугировали 10 минут при комнатной температуре со скоростью 10 000 об/мин. Затем супернатант переносили в новую пробирку, где проводили осаждение ДНК аналогично первой методике.

2.8 Оценка эффективности взаимодействия Dps с ДНК

Оценку эффективности взаимодействия с Dps с отдельными линейными фрагментами ДНК и их смесью производили методом EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay). Нуклеопротеидные комплексы Dps с фрагментами геномной ДНК *E. coli* формировали в течение 30 минут при комнатной температуре в 20 мкл буфера, содержащего 50мМ Tris-HCl (pH 8,0), 0,1мМ EDTA, 50мМ NaCl, после чего в пробы добавляли краситель и наносили на 5% ПААГ для фракционирования. Электрофорез проводили при напряжении 60 В до достижения фронтом нижнего края геля. Для визуализации полос гель окрашивали бромистым этидием и нитратом серебра, после чего фотографировали. О взаимодействии между очищенным белком и фрагментами ДНК судили по убыли свободной ДНК по отношению к контролю.

2.9 Окрашивание гелей нитратом серебра

Окрашивание гелей нитратом серебра проводили методом, предложенным А. Шевченко [169]. Процедура включала следующие стадии:

– *фиксация образцов*: гели, полученные после электрофоретического фракционирования, помещали в раствор, содержащий 48% ацетон, 1% трихлоруксусную (ТХУ) кислоту и 0,019% формальдегид, и инкубировали в течение 40 минут при комнатной температуре при постоянном перемешивании, после чего дважды промывали дистиллированной водой в течение 5 минут;

– *сенсibilизация*: отмытые от ТХУ гели выдерживали в течение 10 минут в 50% ацетоне и затем 1 минуту в 0,02% растворе тиосульфата натрия. Перед стадией окраски нитратом серебра гель снова промывали водой (дважды по 5 минут);

– *насыщение геля ионами серебра*: насыщение осуществляли в течение 15 минут в растворе нитрата серебра (0,8% нитрат серебра, 0,19% формальдегид) и затем гель дважды по 5 минут промывали дистиллированной водой;

– *проявление окраски*: отмытый от излишков нитрата серебра гель помещали в проявитель (2% карбонат натрия, 0,01% тиосульфат натрия, 0,019% формальдегид). Восстановление серебра останавливали через несколько минут Stop-буфером (10% уксусная кислота, 40% этанол). Гель промывали дистиллированной водой и фотографировали.

2.10 Приготовление никированной ДНК

Для исследования возможности формирования нуклеопротеидных комплексов, сформированных Dps с ДНК, содержащей одноцепочечные участки, 10 мкг плазмиды pET28b обрабатывали никазой Nt.BspD6I [207]. Реакционная смесь (20 мкл) содержала 10 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 10 мМ MgCl₂, 150 мМ KCl, 1 мМ DTT и 10 единиц активности никазы Nt.BspD6I или равное количество элюирующего буфера Nt.BspD6I (10 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 50 мМ KCl, 0,1 мМ EDTA, 1 мМ DTT, 50% глицерол) для экспериментального и контрольного образцов соответственно. Реакцию проводили в течение 1 часа при 55°C. После этого плазмидную ДНК сразу же обрабатывали с помощью фенол-хлороформной смеси и осаждали 96% этанолом. Полученный осадок высушивали при 37°C, после чего растворяли в чистой деионизированной воде. Для подтверждения наличия одноцепочечных участков регистрировали кривые плавления. Комплексы Dps с полученными плазмидными ДНК, содержащими одноцепочечные

участки, формировали в молярном соотношении 5:1 или 10:1 по методике, описанной выше, для линейных или Y-подобных ДНК.

2.11 Проектирование искусственных ДНК-структур

Для исследования предпочтительных мест связывания Dps с ДНК различной структуры, а также для изучения возможностей построения элементарных макромолекулярных конструкций на основе нуклеопротеидных комплексов было спроектировано несколько искусственных Y-подобных ДНК структур, способных к самосборке за счёт комплементарного взаимодействия соответствующих нуклеотидов. При проектировании необходимо учитывать несколько факторов:

- для обеспечения полноценного контакта Dps длина каждого из лучей Y-подобной самособирающейся ДНК-структуры должна быть сопоставима с размерами белковой глобулы и составлять не менее 10 нм;

- в центральной части проектируемой структуры должно располагаться максимальное количество А/Т-пар для обеспечения посадки белка в эту область;

- сама нуклеотидная последовательность искусственных одноцепочечных фрагментов ДНК должна быть продумана таким образом, чтобы обеспечить единственную возможность комплементарного спаривания каждого олигонуклеотида с двумя другими;

В качестве основы для проектирования Y-образной структуры были взяты одноцепочечные участки нуклеотидной последовательности регуляторной области гена *dps* и 3'-нетранслируемой области гена *ихiT*, являющиеся хорошими мишенями для взаимодействия с белком Dps. Помимо этого, были использованы одноцепочечные фрагменты ДНК, содержащие только поли-А, поли-Т, поли-Г и поли-С участки (Табл. 2).

После получения соответствующих синтетических одноцепочечных олигонуклеотидов было установлено, что для обеспечения их полноценного

комплементарного взаимодействия в водном растворе, на первом этапе необходимо расплавить случайно сформировавшиеся в них вторичные структуры. Затем раствор следует плавно охладить до комнатной температуры, чтобы обеспечить условия максимально эффективного взаимодействия комплементарных нуклеотидов и формирования стабильной трёхмерной структуры. Однако конкретная реализация этого подхода требовала некоторой оптимизации.

Табл. 2. Олигонуклеотиды, использованные для формирования самособирающихся Y-подобных ДНК структур

Олигонуклеотиды	
Y1	5'-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC-3'
Y2	5'-CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
Y3	5'-GG-3'
Y5	5'-CTTTCTCTACACCGTCTTATATATCGAATTAAGAAGTCGCAATGAGTATTACTTTGTAAAT-3'
Y6	5'-CAAGGGTAAACGAACCTTGCCTTTCTTAAATATTCGATATATAAAGACGGTGTAGAGGAAAAG-3'
Y7	5'-ATTTACAAAGTAATACTCATTGCGACTTCTTAATTAAGAAAGCGCAAGGTTTCGTTTACCCTTG-3'
Y8	5'-ATTTACAAAGTAATACTCATTGCGACTTCTTAATTAAGAAAGCGCAAGGAACGTTTACCCTTG-3'
Y9	5'-CATAACCATGCAGAATTTCTCGCTACTTTTCTCTACACCGTCTTTATATATCGAATTAAGAAGTCGCAATGAGT ATTACTTTGTAAAT-3'
Y10	5'-CAAGGGTAAACGAACCTTGCCTTTCTTAAATATTCGATATATAAAGACGGTGTAGAGGAAAAGTAGCGAGAAATT CTGCATGGTTATGC-3'

Наиболее эффективная схема включала следующие шаги. На первом этапе осуществляли плавление по отдельности одноцепочечных участков ДНК при 98°C в течение 5 минут, после чего их смешивали в пробирке, прогретой до такой же температуры, и оставляли ещё на 5 минут инкубироваться при 98°C. Далее смесь переносили на 10 минут в термостат, прогретый до 70°C, после чего её плавно охлаждали до комнатной температуры. Концентрацию исходных одноцепочечных фрагментов ДНК и полученных ДНК структур контролировали при помощи спектрофотометра

ND-1000. Размер образовавшихся ДНК-структур и гетерогенность полученного препарата оценивали электрофоретически, а формирование стабильных Y-образных структур регистрировали с помощью атомно-силового микроскопа Ntegra-Vita (NT-MDT, Россия) в полуконтактном режиме, который наиболее пригоден для изучения биологических объектов.

2.12 Исследование морфологии белка Dps, фрагментов ДНК и их комплексов методом атомно-силовой микроскопии

Для анализа морфологии отдельных молекул Dps, фрагментов ДНК и их нуклеопротеидных комплексов был использован метод атомно-силовой микроскопии (АСМ), как один из видов сканирующей зондовой микроскопии, основанный на Ван-дер-ваальсовских взаимодействиях зонда с поверхностью образца (Рис. 18).

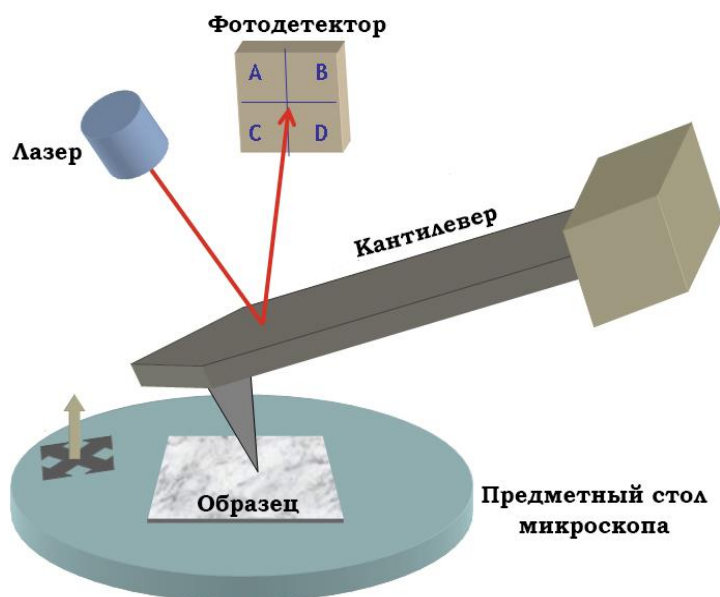


Рис. 18. Схематичное изображение принципа действия атомно-силового микроскопа

Для регистрации движения зонда над поверхностью образца на выступающем конце кантилевера (над иглой) расположена зеркальная площадка, на которую падает и от которой отражается луч лазера.

Вследствие изменения положения зонда на неровностях поверхности образца происходит колебание угла отражения зонда. Это регистрируется фотодетектором, а сила, с которой шип притягивается к близлежащим атомам, – пьезодатчиком. Совокупность этих данных используется в системе обратной связи, благодаря чему происходит построение объёмного рельефа поверхности образца в режиме реального времени.

В зависимости от расстояния иглы до образца, а, следовательно, до действующих Ван-дер-Ваальсовых сил, различают следующие режимы работы атомно-силового микроскопа (Рис. 19):

- контактный режим (contact mode);
- бесконтактный режим (non-contact mode);
- полуконтактный режим (tapping mode).

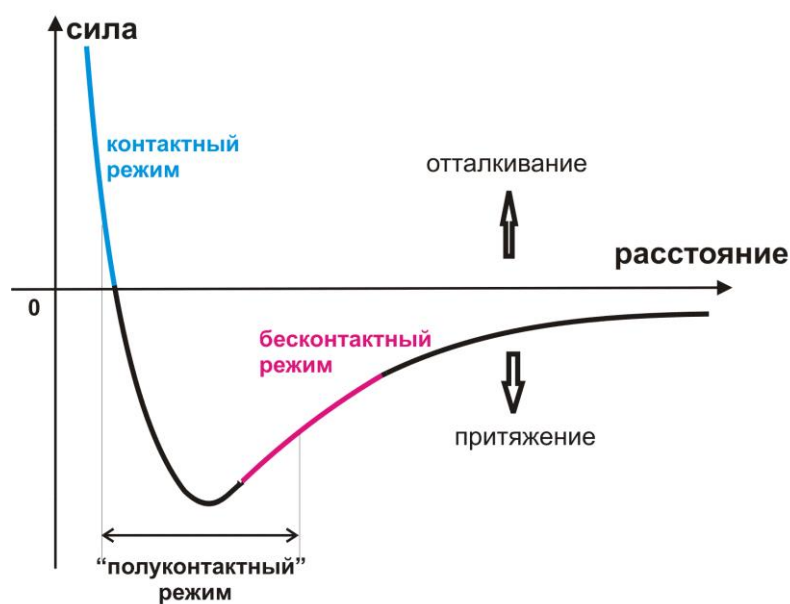


Рис. 19. Зависимость силы Ван-дер-Ваальса от расстояния иглы кантилевера до поверхности образца в различных режимах работы атомно-силового микроскопа

При контактном режиме игла физически взаимодействует с исследуемым образцом, поэтому на неё воздействуют силы отталкивания (Рис. 19). При этом взаимодействие между образцом и иглой вынуждает кантилевер изгибаться, повторяя топографию поверхности.

В случае бесконтактного режима кантилевер при помощи пьезокристалла колеблется над исследуемой поверхностью с амплитудой ~ 2 нм, что превышает расстояние между поверхностью и зондом. По изменению амплитудно-частотной характеристики определяется сила притяжения и формируется изображение поверхности.

Полуконтактный режим подобен бесконтактному режиму, однако в нижней точке своих колебаний игла кантилевера касается поверхности исследуемого образца.

По сравнению с электронным микроскопом, атомно-силовая микроскопия не требует нанесения проводящего металлического покрытия, более того, исследования могут быть осуществлены на воздухе или в жидкости. Помимо этого, она позволяет получить трёхмерное изображение рельефа поверхности.

Изучение магнитных свойств образца осуществлялось при помощи кантилевера MFM01. При этом использовалась двухпроходная методика: сначала исследуется рельеф поверхности аналогично тому, как описано выше, после чего кантилевер вновь проходит над образцом на постоянном расстоянии от его поверхности, в результате чего он подвергается воздействию дальнедействующей магнитной силы образца [7].

В данном случае сама магнитная сила F может быть представлена в виде производной от энергии Зеемана, которая взята с обратным знаком [7]:

$$F = (m, grad)H, \quad (1)$$

где m – эффективный магнитный момент зонда;

H – магнитное поле рассеяния образца;

Для исследования методом атомно-силовой микроскопии белок Dps, фрагменты ДНК различной длины, а также полученные нуклеопротеидные комплексы были разбавлены до концентрации 1 нг/мкл буфером, содержащим 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 10 мМ NaCl, 0,1 мМ EDTA и 5 мМ MgCl₂. Нуклеопротеидные комплексы формировали при комнатной температуре в стерильной пробирке путём смешивания белка с 3–10 кратным молярным

избытком ДНК, после чего смесь инкубировали в таких же условиях в течение 30 минут. По окончании инкубации образцы наносились на чистый скол слюды, выдерживались на ней 5 минут, после чего промывались два раза по 30 секунд дистиллированной водой и высушивались. Полученные образцы исследовались на атомно-силовом микроскопе в полуконтактном режиме с использованием кантилеверов NSG03 с резонансной частотой 47–150 кГц. Полученные изображения обрабатывались с использованием программного обеспечения Nova (NT-MDT, Россия).

2.13 Исследование собственной флуоресценции белка Dps и его нуклеопротеидных комплексов

Флуоресценция является частным случаем люминесценции и представляет собой излучательный переход возбуждённого состояния с самого нижнего синглетного колебательного уровня в основное. При этом время жизни подобного состояния составляет порядка 10^{-8} с [5].

В качестве анализируемых данных, как правило, используют спектры испускания флуоресценции – то есть зависимость интенсивности флуоресценции образца от длин волн (нм) или волновых чисел (в см^{-1}).

Измерение собственной флуоресценции свободных молекул нативного Dps и его нуклеопротеидных комплексов осуществляли на спектрофотометре Perkin Elmer 44В (PerkinElmer, Inc) в кювете объёмом 200 мкл. В качестве образцов были использованы: чистый белок Dps, линейные фрагменты ДНК (S, H), разветвлённая ДНК-структура (Y5-Y6-Y7), а также сформированные ими нуклеопротеидные комплексы. Измерения проводились при длине волны возбуждения 280 нм при трёхкратном усилении и размерах щели 8x5 для белка и комплексов и 5x5 для фрагментов ДНК в диапазоне температур 20–80°C с шагом в 5°C.

Комплексы с Dps с линейными и разветвлёнными искусственными фрагментами ДНК готовились в эквимольном соотношении.

Концентрации исследуемых образцов составляли:

- Dps-ДНК(S) ~ 0,275 пмоль/мкл;
- Dps-ДНК(H) ~ 0,22 пмоль/мкл;
- Dps-ДНК(Y) ~ 0,23 пмоль/мкл;
- Dps ~ 0,275 пмоль/мкл;
- ДНК (S) ~ 0,275 пмоль/мкл;
- ДНК (H) ~ 0,22 пмоль/мкл;
- Y-ДНК ~ 0,23 пмоль/мкл.

2.14 Оценка гидродинамического радиуса частиц Dps и его комплексов

Динамическое рассеяние света – физический метод, позволяющий определить коэффициент диффузии дисперсных частиц в жидкости за счёт анализа характерного времени флуктуаций интенсивности рассеянного света. Из значений коэффициентов диффузии рассчитываются радиусы частиц.

Когда световой луч падает на частицы в растворе, происходит взаимодействие электромагнитной волны с неоднородной средой и свет рассеивается. Основное предположение теории динамического рассеяния света заключается в том, что рассеянный свет имеет ту же частоту, что и возбуждающий луч света.

Определение радиуса исследуемых частиц осуществлялось с помощью прибора Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Великобритания), позволяющего выявлять диаметр молекул в диапазоне 0,3 нм – 10 мкм и с чувствительностью к концентрации белка от 0,1 мг/мл. Исследуемые образцы (фрагмент ДНК S, белок Dps, а также комплексы Dps-ДНК(H)) с концентрацией 0,55 пмоль/мкл помещались в кювету объёмом 0,5 мл и исследовались в диапазоне температур 20–90°C с шагом в 5°C. В качестве источника излучения использовали гелий-неоновый лазер с длиной волны 633 нм и максимальной мощностью 4 мВт. Для каждого из образцов было

произведено не менее трёх измерений при каждом значении указанного температурного диапазона. Полученные данные обрабатывали при помощи программного обеспечения Malvern Instruments.

2.15 Изучение кинетики формирования нуклеопротеидных комплексов белка Dps с фрагментами ДНК

Плазмон – это квазичастица, которая возникает в результате квантования колебаний электронного газа в проводящем материале. Свет, проникая в проводящий материал, распространяется в нём в виде быстро затухающей электромагнитной волны, которая приводит к появлению колебаний свободных электронов материала. Поверхностные плазмоны представляют собой волны переменной плотности электрического заряда. Они могут возникать и распространяться в электронной плазме металла вдоль его поверхности или вдоль тонкой металлической плёнки (Рис. 20).

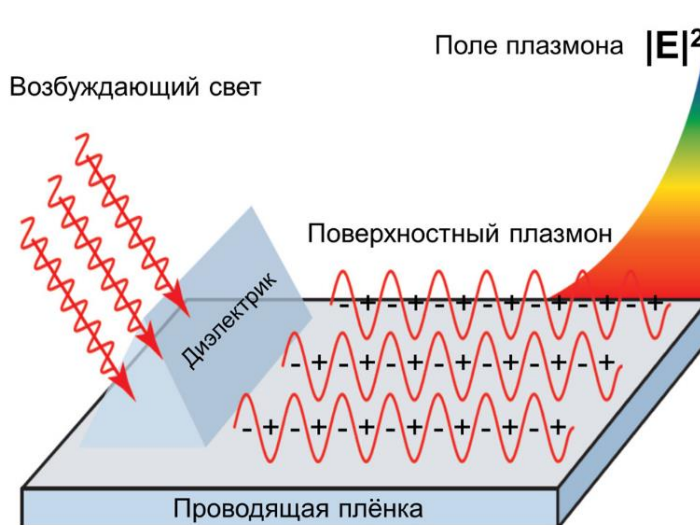


Рис. 20. Возбуждение поверхностного плазмона на проводящей плёнке [6]

Свет с частотой ниже плазменной частоты отражается потому, что электроны в металле экранируют электрическое поле в световой электромагнитной волне. Свет с частотой выше плазменной частоты

проходит, поскольку электроны не могут достаточно быстро ответить, чтобы экранировать его. В большинстве металлов плазменная частота находится в ультрафиолетовой области спектра, делая их блестящими в видимом диапазоне.

Метод поверхностного плазмонного резонанса основан на использовании полного внутреннего отражения света. При этом вдоль отражающей свет поверхности распространяется электромагнитная волна, скорость которой зависит от угла её падения. Если при определённом угле падения скорость данной волны совпадет со скоростью поверхностного плазмона на поверхности металла, то условия полного внутреннего отражения нарушатся, отражение перестанет быть полным, и возникнет поверхностный плазмонный резонанс (Рис. 21).

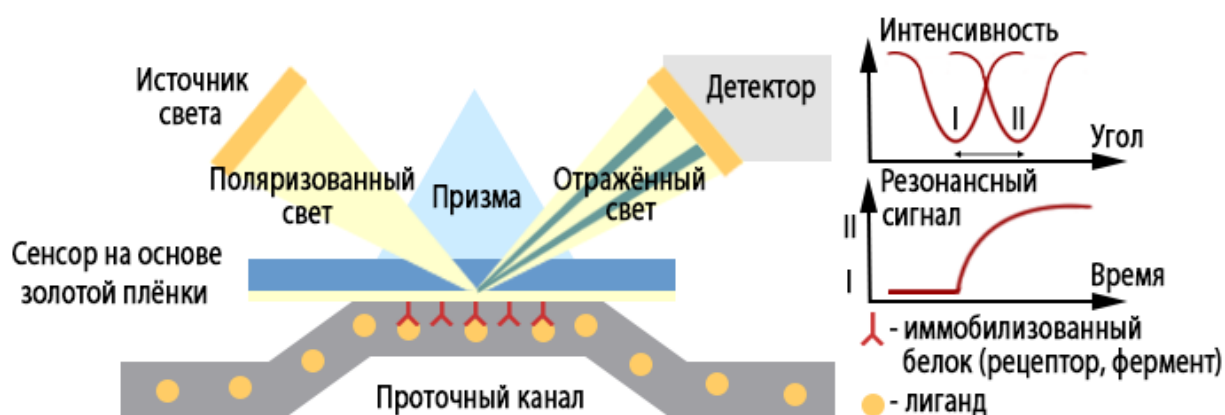


Рис. 21. Схематичное изображение метода поверхностного плазмонного резонанса

Исследование кинетики формирования нуклеопротеидных комплексов Dps с линейными и искусственными разветвлёнными фрагментами проводилось посредством метода поверхностного плазмонного резонанса с использованием прибора ProteOn XPR (BioRad, США). Детекция поверхностного плазмонного резонанса осуществлялась с использованием сенсора, чья рабочая поверхность непосредственно взаимодействует с исследуемым образцом. На поверхность сенсора в течение некоторого времени подаётся исследуемый образец, где происходит сначала ассоциация,

а потом диссоциация исследуемых частиц. Регистрация изменений взаимодействия на поверхности фиксируется детектором сенсора, после чего происходит обработка данных с использованием соответствующего программного обеспечения.

Данный метод позволяет исследовать кинетику как прямой реакции $A + B \rightarrow AB$, так и кинетику обратной реакции $AB \rightarrow A + B$. Совокупность констант прямой и обратной реакции позволяет рассчитать величину константы диссоциации, которая характеризует прочность образуемого соединения. Расчёт этой равновесной величины может давать недостаточно обоснованные данные, поэтому для получения достоверных результатов принято рассчитывать кинетические и равновесные константы одновременно по нескольким сенсограммам. Оценку различия между экспериментальными и теоретическими данными производят при помощи параметра хи-квадрат (χ^2), при значении которого $\chi^2 < 10$ аппроксимация полученных результатов считается достоверной.

$$\chi^2 = \frac{\sum^n (r_{th} - r_{exp})^2}{n - p}, \quad (2)$$

где r_{exp} – экспериментальные значения;

r_{th} – теоретические значения;

n – количество экспериментальных точек;

p – количество оцениваемых параметров.

Для проведения экспериментов препарат нативного Dps был иммобилизован на чипах ProteOn™ GLH#176-5013 и ProteOn™ NLC#176-5021 (Bio-Rad, США) через аминокислотные группы. Химическая иммобилизация белка на поверхности чипа осуществлялась за счёт взаимодействия ϵ -аминогруппы остатков лизина при добавлении в раствор белка компонентов набора ProteOn™ Amine Coupling Kit (Bio-Rad, США). Для этого поверхность чипа предварительно активировали в течение 200 секунд смесью N-

гидроксисульфосукцинимидом (sulfo-NHS) и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDAC, EDC) в соотношении компонентов 1:1 и скоростью 30 мкл/мин. Сразу после активации чипа над его поверхностью пропускался раствор белка с концентрацией 20 мкг/мл в 10 mM ацетатном буфере (pH 4,5) в течение 350 секунд со скоростью 30 мкл/мин. После этого для деактивации активированных EDAC/sulfo-NHS карбоксильных групп над поверхностью чипа пропускался 1M раствор этаноламина (pH 8,5) со скоростью 30 мкл/мин в течение 350 секунд.

Для анализа взаимодействия лиганда, в роли которого выступали молекулы Dps, с аналитом (фрагментов ДНК) над поверхностью чипа в перпендикулярном направлении пропускались раствор искусственной разветвлённой ДНК (Y5-Y6-Y7) с концентрацией 50 нМ и раствор линейного фрагмента (H) с концентрацией 30 нМ. В качестве контрольного раствора пропускался рабочий буферный раствор, содержащий 0,05% Tween20 (pH 7,4). Пропускание аналита над поверхностью чипа проводилось со скоростью 30 мкл/мин в течение 350 секунд. По завершении стадии ассоциации лиганда и аналита через проточную кювету подавался рабочий буферный раствор. Стадия диссоциации комплекса лиганд-аналит осуществлялась в течение 1200 секунд. Анализ полученных кинетических данных поверхностного плазмонного резонанса проводится в программе ProteOn manager в рамках модели гетерогенного лиганда.

2.16 Моделирование исследуемых фрагментов ДНК

Способность фрагментов ДНК формировать изгибы двойной спирали, а также их различные физико-химические свойства оценивались при помощи моделей, сделанных с использованием Интернет ресурса DNA Tools [icgeb.trieste.it]. Полученные данные были визуализированы посредством программного обеспечения [RasMol]. Компьютерная программа DNA Tools рассчитывает по прописанным в ней алгоритмам параметры нуклеотидной

последовательности исследуемых фрагментов ДНК без учёта внешних факторов, например, солевого состава растворителя, температуры, значения рН, и формирует соответствующий файл с цифровыми данными. Полученный файл загружается в программу RasMol, которая предназначена для получения визуального изображения в соответствии с полученными значениями.

2.17 Исследование белка Dps при помощи XANES-спектроскопии

Синхротронное излучение представляет собой магнитотормозное излучение релятивистских частиц, которые движутся в постоянном магнитном поле по круговой орбите. Синхротронное излучение сконцентрировано в узком пучке в направлении движения частиц, что способствует повышению яркости самого пучка. Такой пучок коллимируется в узком конусе с углом раствора порядка $1/\gamma$ (где γ – Лоренцовский фактор, характеризующий отношение полной энергии релятивистской частицы к её энергии покоя), что соответствует ~ 50 угловым секундам для электронов с энергией 2 ГэВ. В процессе исследования можно наблюдать не точку, равную размерам частицы, а некоторый участок её орбиты, имеющий форму плоского веера, направленного перпендикулярно вектору центростремительного ускорения по ходу излучающего электрона. Это и характеризует ряд особенностей синхротронного излучения по сравнению с излучением рентгеновских трубок:

- высокая яркость излучения (определяется точечным характером источника и направленностью генерируемого рентгеновского пучка);
- непрерывный спектр излучения, позволяющий варьировать длину волны для эксперимента, а также проводить сканирование по энергии (что необходимо для методик рентгеновской спектроскопии);

– поляризация рентгеновского излучения (рентгеновское излучение из поворотных магнитов полностью линейно поляризовано в плоскости орбиты электронов в накопительном кольце);

– временная структура пучка (электроны при движении в накопительном кольце разбиваются на так называемые «банчи»), что позволяет исследовать динамику процессов.

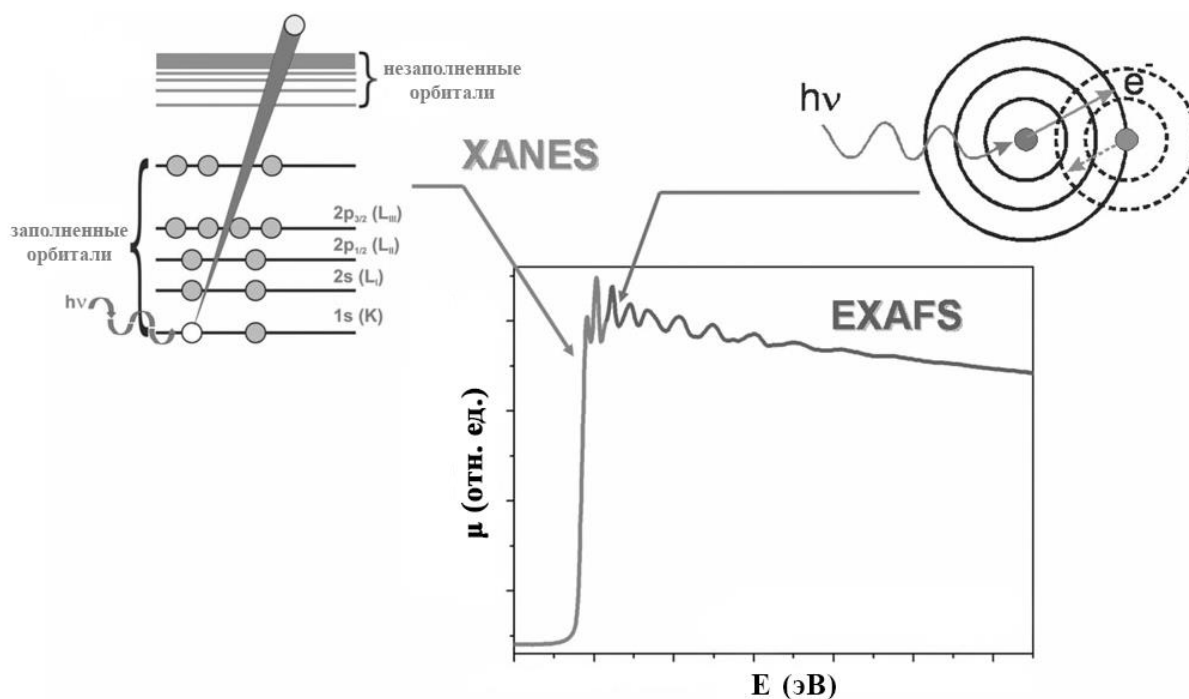


Рис. 22. Схематичное изображение принципа действия XANES- и EXAFS-спектроскопий: E – энергия рентгеновского излучения (эВ), μ – коэффициент поглощения рентгеновского излучения (отн.ед.) [69]

Фотоны с различными энергиями отличаются по своему поведению в процессе их рассеяния, в связи с этим тонкую структуру спектров принято разделять на две части (Рис. 22):

1. Низкоэнергетическая (ближняя, или околопороговая) тонкая структура – XANES (X-ray Absorbtion Near Edge Structure), которая соответствует энергиям фотоэлектронов 30–50 эВ. В этом случае существенным фактором оказывается многократное рассеяние фотонов;

2. Высокоэнергетическая (протяжённая, или дальняя) тонкая структура – EXAFS (Extended X-ray Absorbtion Fine Structure), где главный вклад в поглощение даёт однократное рассеяние фотоэлектрона.

Метод регистрации спектров XANES представляет собой вид абсорбционной спектроскопии. Данный метод является одним из мощных средств для изучения структуры твёрдых тел. Для регистрации спектров XANES используется комплекс аппаратуры с высокой разрешающей способностью. Это обусловлено возможностью получения важной структурной информации из незначительного изменения ($\sim 0,2$ эВ) энергетического положения осцилляций спектра или расщепления спектральных пиков. Это позволяет использовать XANES-спектроскопию не только для исследования локальной структуры различных твёрдых тел (высокотемпературные сверхпроводники, фуллерены, тонкие моноатомные слои, сверхлёгкие сплавы и др.), но и для изучения особенностей электронного и атомного окружения металлов и их соединений, входящих в состав белковых макромолекул.

Синхротронные XANES-спектры железа в области мягкого рентгеновского излучения обладают высокой чувствительностью к свойствам поверхности (энергия квантов возбуждающего синхротронного излучения до 1000 эВ), поэтому ярко выраженная их тонкая структура для $L_{2,3}$ – краёв поглощения железа требует особого внимания во время подготовки образцов для сверхвысоковакуумных экспериментов. При этом глубина информативного слоя составляет около 10 нм, что сопоставимо с размерами молекулы белка Dps. Использование такого подхода может оказаться крайне информативным, особенно учитывая тот факт, что он относится к неразрушающим. Это позволяет регистрировать весьма небольшие перепады энергии, что свидетельствует о высокой разрешающей способности таких измерений.

Для проведения синхротронных исследований в сверхвысоком вакууме было использовано ~ 100 мкл раствора белка Dps с концентрацией 2 мг/мл в

буфере, содержащем 10 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0) и 0,1 мМ EDTA. Образец белка наносили на подложки кристаллического кремния ориентации (100), предварительно очищенные в нейтральном растворе с помощью ультразвука. Подложки с нанесённым образцом затем промывались дистиллированной водой в течение 30 секунд и высушивались в течение 5 минут. Процедура нанесения образца на подложку, промывки и высушивания повторялась ещё 3–4 раза. После этого подложки высушивались в равновесных условиях при комнатной температуре в течение трёх недель.

Экспериментальные спектры XANES вблизи $L_{2,3}$ -края поглощения железа были получены на российско-германском канале (RMBL) синхротрона BESSY II в Гельмгольц-центре (Берлин, Германия). Аппаратурное уширение составило 0,1 эВ, вакуум поддерживали на уровне 10^{-7} Па. А для регистрации компенсаторного тока образца использовали методику регистрации полного выхода электронов TEY (total electron yield). Глубина информативного слоя составляла ~ 10 нм, что сопоставимо с размером молекулы Dps.

В качестве эталонов для последующего сопоставления спектральных кривых и их моделирования были использованы XANES $L_{2,3}$ -спектры оксидов железа Fe_2O_3 и Fe_3O_4 (Alfa Aesar, США). Последний представлял собой нанопорошок с размерами частичек ~ 20 – 30 нм. Спектры эталонов регистрировали в тех же условиях, что и образец с нанесённым белком Dps. Кроме этого, при моделировании был использован XANES $L_{2,3}$ -спектр FeO, опубликованный в работе [156].

ГЛАВА 3. ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Выбор участков ДНК для оценки эффективности их взаимодействия с белком Dps

Белок Dps выполняет ряд функций в бактериальной клетке, одной из которых является регуляция экспрессии генов [28, 37, 154, 187].

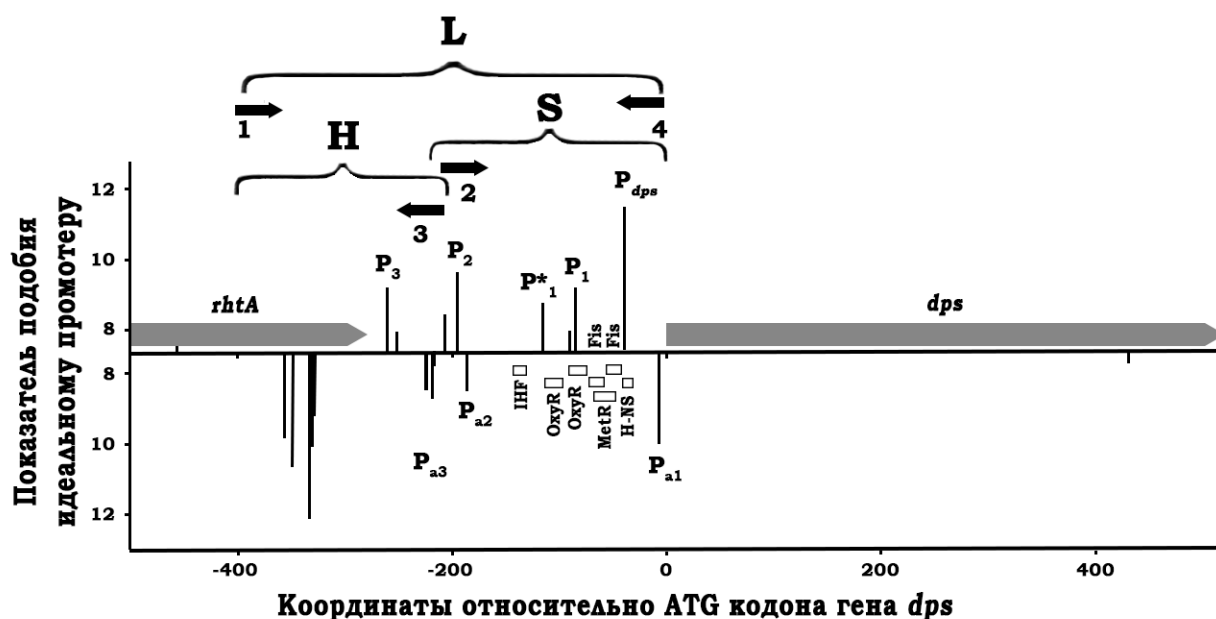


Рис. 23. Схема расположения праймеров, использованных для получения фрагментов регуляторной области гена *dps* в ПЦР. Столбиками указаны координаты точек инициации транскрипции: P_{dps} – точка инициации транскрипции, установленная экспериментально; P^* , P_1 , P_2 , P_3 – точки инициации транскрипции, предсказанные алгоритмом PlatProm в прямом направлении; P_{a1} , P_{a2} , P_{a3} – точки инициации транскрипции, предсказанные алгоритмом PlatProm в антисмысловом направлении. Цифрами обозначены комплементарные области ДНК и использованные в работе праймеры: 1–4 – соответствуют фрагменту L (420 п.н.); 1–3 – соответствуют фрагменту H (214 п.н.); 2–4 – соответствуют фрагменту S (256 п.н.). Стрелками указаны направления прочтения праймеров [172]

Это предполагает возможность его взаимодействия с промоторными участками регулируемых генов, в частности, с регуляторной областью собственного гена [28]. Длина всей регуляторной области составляет 420 п.н., на которой расположено 5 промоторов для инициации транскрипции в прямом направлении и 3 антисмыслового направления (Рис. 23).

Считается, что Dps не имеет специфически распознаваемых мотивов или модулей в геномной ДНК, которые он способен узнавать. Однако наличие нескольких промоторов для прямой и антисмысловой транскрипции в регуляторной области собственного гена предполагает саму по себе возможность такого распознавания. Поэтому для исследований было использовано три фрагмента ДНК, содержащих частично или полностью регуляторную область гена *dps*, и, соответственно, разные наборы промоторов (Рис. 23).

В связи с отсутствием в структуре белка Dps модулей, способных распознавать какую-либо нуклеотидную последовательность ДНК, было выдвинуто предположение о том, что мишенью для предпочтительного взаимодействия может быть не нуклеотидная последовательность, а какая-либо физико-химическая или структурная особенность участка ДНК. Поэтому на первом этапе было проведено моделирование пространственной структуры фрагментов ДНК, содержащих регуляторную область гена *dps* с использованием программы DNA Tool [188] (Рис. 24). Все три фрагмента ДНК обладали высоким содержанием А/Т – пар, что предполагает повышенную термодинамическую подвижность молекулы.

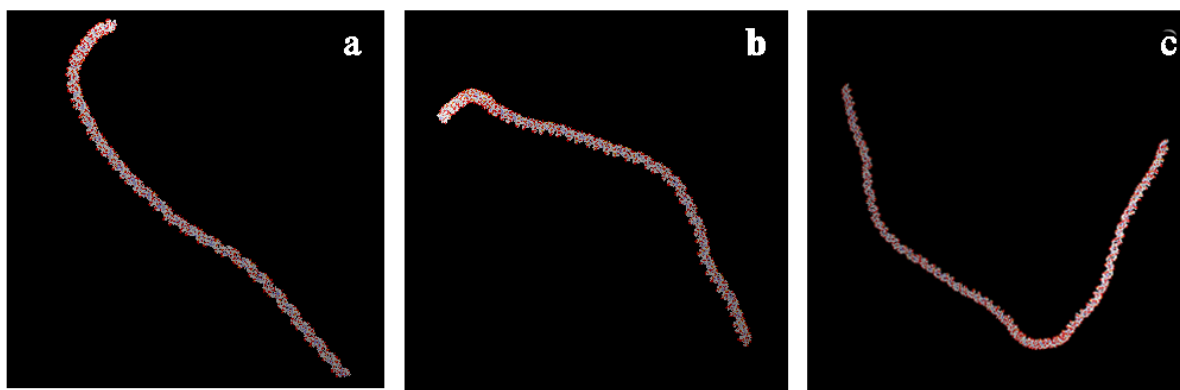


Рис. 24. Модели фрагментов ДНК, построенные с использованием программы DNA Tool: а – фрагмент Н (214 п.н.); б – фрагмент S (259 п.н.);
 с – фрагмент L (420 п.н.)

Видно, что фрагменты S и Н являются наименее изогнутыми, а фрагмент L – обладает максимальной способностью формировать анизотропные изгибы двойной спирали. Кроме того, полученные модели предполагают, что эти фрагменты ДНК благодаря своим свойствам могут быть использованы в качестве удобной модели линейных, не формирующих суперспирализованных петель, участков ДНК. Помимо этого, они потенциально обладают высоким сродством к Dps, что является весьма перспективным для дальнейшего их использования в исследованиях особенностей морфологии нуклеопротеидных комплексов Dps-ДНК методом атомно-силовой микроскопии. Поэтому на следующем этапе нами были проанализированы морфологические особенности этих фрагментов на поверхности слюды. Для этих экспериментов фрагменты ДНК были получены в ПЦР, экстрагированы из ПААГ и очищены соответствующим образом (см. Материалы и методы).

Расчётные параметры фрагментов ДНК имеют следующие величины: высота ДНК – 2 нм, длина фрагментов определяется количеством нуклеотидов, умноженным на длину одного нуклеотида, и составляет: для фрагмента Н – 75,3 нм, фрагмента S – 91,16 нм, фрагмента L – 147,84 нм.

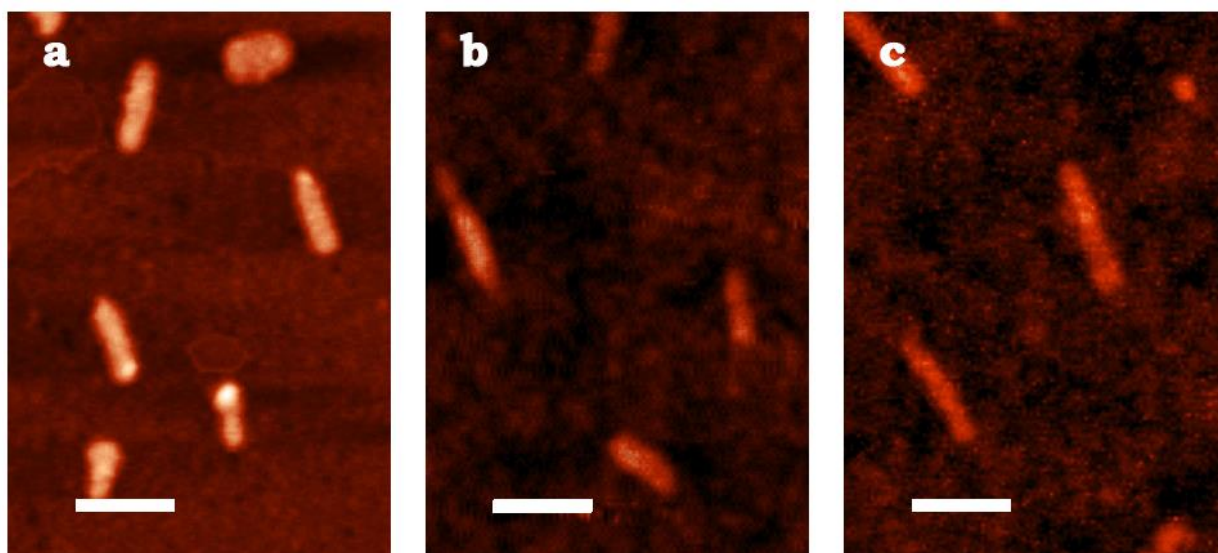


Рис. 25. АСМ-изображения фрагментов ДНК, полученных в полуконтактном режиме: а – фрагмент Н (214 п.н.); б – фрагмент S (259 п.н.); с – фрагмент L (420 п.н.); белая черта на рисунках соответствует 100 нм

На Рис. 25 приведены полученные АСМ изображения фрагментов ДНК. Анализ изображений показал, что значения высоты и длины фрагментов, в целом, соответствуют расчётным величинам. Однако значение ширины ДНК несколько выше ожидаемой и соответствует порядка 20 нм. Это обусловлено особенностями метода атомно-силовой микроскопии, в частности, размером вершины иглы кантилевера (в данном случае радиус кривизны составлял не более 10 нм) и размером исследуемого объекта.

3.2 Исследование физико-химических свойств белка Dps

Для анализа вариаций олигомерных форм, присутствующих в растворе нативного белка после его выделения и очистки, был использован метод динамического светорассеяния. На Рис. 26 приведена кривая распределения олигомерных форм Dps при 25°C, усреднённая по нескольким экспериментам. Она свидетельствует о наличии основного максимума, размер частиц которого составляет 9,7 нм, что соответствует литературным данным [212].

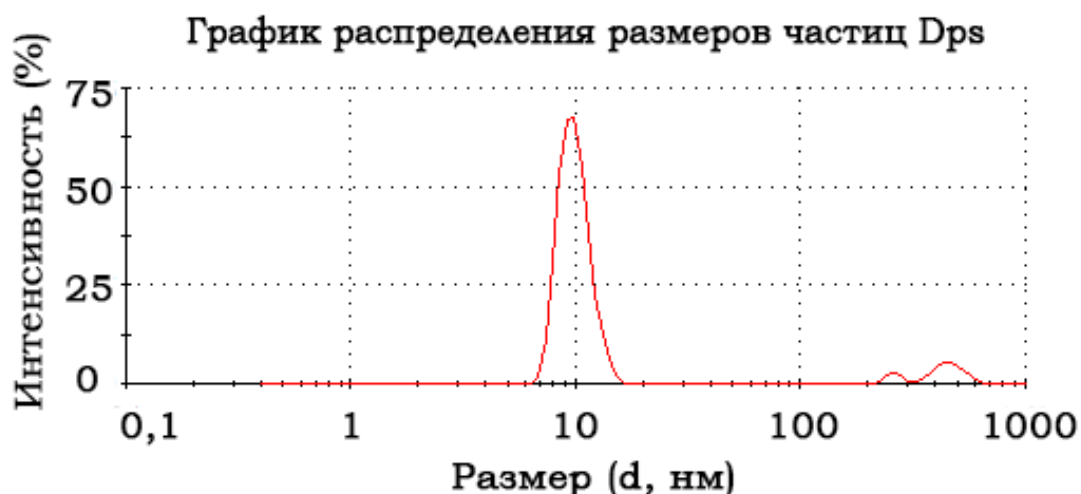
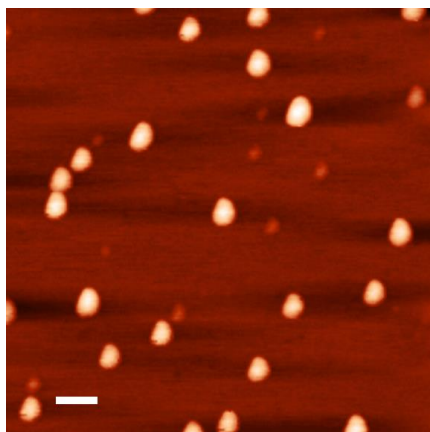


Рис. 26. Распределение размеров частиц, присутствующих в растворе нативного белка Dps при 25°C

Отметим также, что регистрирующая система в некоторых экспериментах показывала присутствие незначительного количества слабо выраженных (~ 7,1%) пиков в области 344 нм, что, вероятно, отражает способность Dps к самоагрегации [31]. Тем не менее, произведённые нами манипуляции в процессе выделения и очистки белка не привели к значительным изменениям олигомерной формы белка. Поэтому далее мы провели исследование морфологии поверхности слюды с нанесённым на неё препаратом белка методом АСМ (Рис. 27).

Особенностью этого эксперимента являлось то, что в данном случае концентрация белка составляла около 1 нг/мкл, что на несколько порядков меньше, чем в экспериментах с применением метода динамического светорассеяния. Помимо этого, в экспериментах с применением АСМ анализируется поверхность слюды с высушенными на её поверхности частицами Dps, что может дать нам дополнительную информацию о способности частиц белка Dps сохранять свои размеры в зависимости от наличия растворителя.

(A)



(B)



Рис. 27. (А) - пример АСМ-изображения нативного Dps (белая черта соответствует 100 нм); (В) - гистограмма распределения высот измеренных частиц белка

Высота наблюдаемых на поле АСМ частиц преимущественно соответствует 7 нм. При этом, как и в случае с ДНК (Рис. 25), линейные размеры частицы в планарной проекции несколько завышены, что также объясняется особенностями применённого метода и режимом измерений. Однако встречаются и более мелкие объекты, наличие которых может быть связано с частичной деградацией белка в процессе его высушивания на сколе слюды, а также кристаллизацией солевых компонентов буферного раствора во время удаления влаги. Таким образом, найденные нами величины частиц в водном растворе и на поверхности слюды после высушивания варьируются незначительно ($\pm 1,5$ нм). Такие незначительные отличия могут свидетельствовать о влиянии растворителя на геометрические размеры молекулы, однако, это влияние минимально, и размеры частиц выделенного белка близки к размерам Dps, описанным в литературе [68].

Важным параметром, характеризующим конформацию белковой молекулы, являются её спектральные характеристики. Определение типа конформационных изменений, происходящих в белковой молекуле после поглощения кванта света, может быть осуществлено с помощью комплекса физико-химических методов, в том числе, не нарушающих исходной

структуры макромолекул. Поскольку спектры испускания белков в значительной степени являются отражением их структурной организации, в своей работе мы использовали именно эту характеристику белка для оценки стабильности молекулы Dps и её нуклеопротеидных комплексов. Несмотря на относительно небольшое количество ароматических аминокислот в составе каждого мономера (2 остатка триптофана, 3 остатка тирозина, 5 остатков фенилаланина), Dps имеет выраженный спектр испускания флуоресценции с максимумом в области плато 332 нм (Рис. 28).

Полученные данные позволяют сделать вывод, что основной вклад в формирование спектра испускания Dps вносит именно триптофан. Учитывая положение максимума и согласно принятой классификации [2], с высокой степенью вероятности можно предположить, что остатки Dps находятся в поверхностных слоях белковой глобулы и неполярной (внутренней) форме. Таким образом, зарегистрированный спектр флуоресценции (Рис. 28) можно использовать в качестве индикатора состояния олигомерной формы белка в зависимости от воздействия различных физико-химических факторов.

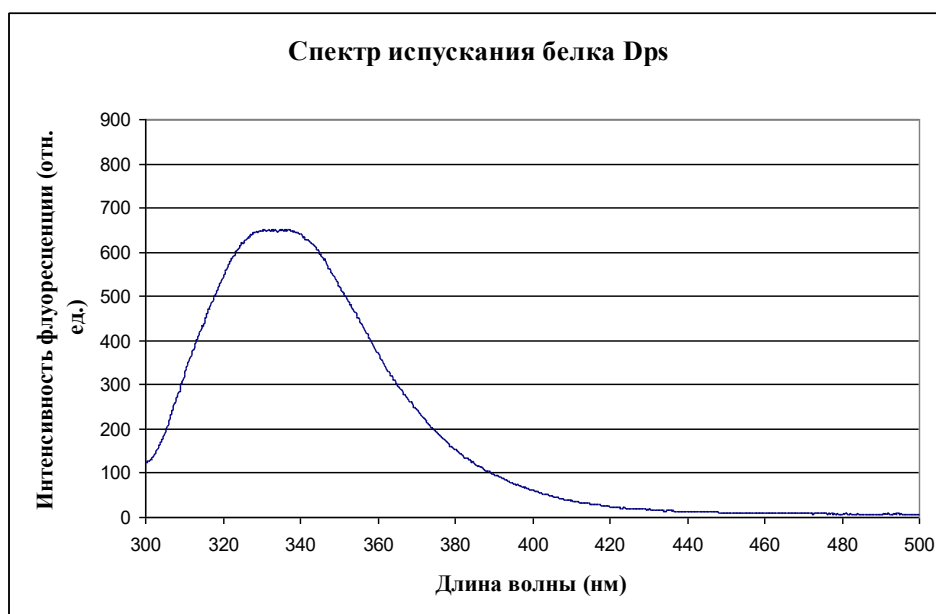


Рис. 28. Спектр флуоресценции белка Dps при 20°C

Существуют экспериментальные данные [1], свидетельствующие о влиянии электромагнитного излучения на экспрессию гена *dps*, что является

значимым для использования бактериоферритина в качестве биосенсора и основы для создания новых материалов с заданными свойствами. Поскольку этот белок нуклеоида принимает участие в утилизации ионов железа, окисляя его с Fe^{2+} до Fe^{3+} и формируя феррогидритное ядро внутри белковой полости, нами были изучены магнитные свойства Dps (Рис. 29).

На панелях а и б Рис. 29 показана одна и та же область в режимах отображения рельефа (панель а) и магнитных свойств (панель б). Концентрация нанесённого на подложку белка составляет 100 нг/мкл, поскольку обычно используемая концентрация 1 нг/мкл не позволила детектировать какие-либо магнитные свойства белка Dps. Однако для наблюдения отдельных молекул Dps или их агрегатов такая концентрация избыточна, так как белок покрывает всю поверхность подложки, что делает невозможным интерпретировать полученные морфологические данные.

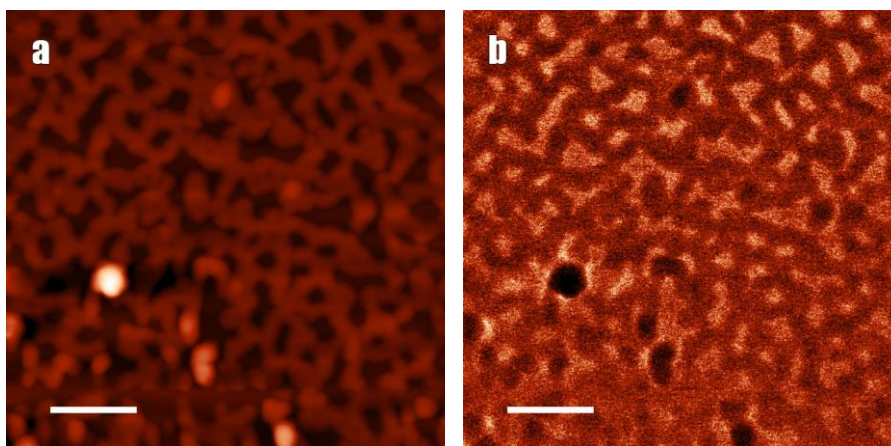


Рис. 29. а – рельеф поверхности подложки с нанесённым белком Dps; б – магнитные свойства поверхности этой подложки; белая черта на рисунках соответствует 100 нм

Стоит учитывать, что в данном случае исследование магнитных свойств молекул Dps при помощи атомно-силовой микроскопии не позволяет получить количественные величины. Тем не менее, полученный результат является качественной характеристикой, на основании которой можно сделать вывод о различии магнитных свойств образца и подложки, а также

предположить, что молекулы белка действительно ассоциированы с металлами или их соединениями.

3.3 Изучение особенностей неорганического ядра белка Dps *E.coli*

Исследование таких наноразмерных объектов, как молекулы белка, которые представляют собой гибридные биоорганические частицы, имеет большой научный и практический интерес [3, 212]. С одной стороны, они имеют фиксированный внутренний объём, что позволяет эффективно контролировать размерность неорганического ядра такой частицы, с другой стороны, наличие органической оболочки препятствует двухстороннему обмену кислородом, в результате чего сохраняются свойства исходного материала.

Важную информацию об исследуемом объекте могут представлять синхротронные XANES-спектры железа в области мягкого рентгеновского излучения. Однако высокая чувствительность к свойствам поверхности (энергии квантов возбуждающего синхротронного излучения до 1000 эВ) и ярко выраженная тонкая структура регистрируемых спектров, как, например, в случае $L_{2,3}$ -краев поглощения Fe [48, 156], предъявляют специфические требования к подготовке образцов для измерений в сверхвысоком вакууме [58].

Поэтому на первом этапе было необходимо оценить применимость предлагаемого метода пробоподготовки для XANES-спектроскопии в области Fe $L_{2,3}$ -краёв поглощения. После чего уже приступить к изучению специфики локального атомного окружения в неорганических ядрах осаждённых молекул белка в экспериментах со сверхвысоким вакуумом.

На предварительном этапе исследований были зарегистрированы XANES $L_{2,3}$ -спектры эталонов, в качестве которых были использованы Fe_2O_3 и Fe_3O_4 . Именно с ними работали для дальнейшего сопоставления экспериментальных спектральных кривых и последующего моделирования. Помимо спектров эталонных оксидов были использованы литературные данные о спектре FeO, который был зарегистрирован в аналогичных условиях

[156]. Полученные спектральные кривые отражают особенности распределения тонкой структуры в зависимости от зарядового состояния ионов железа в составе FeO, Fe₂O₃ и Fe₃O₄ и приведены на Рис. 30.

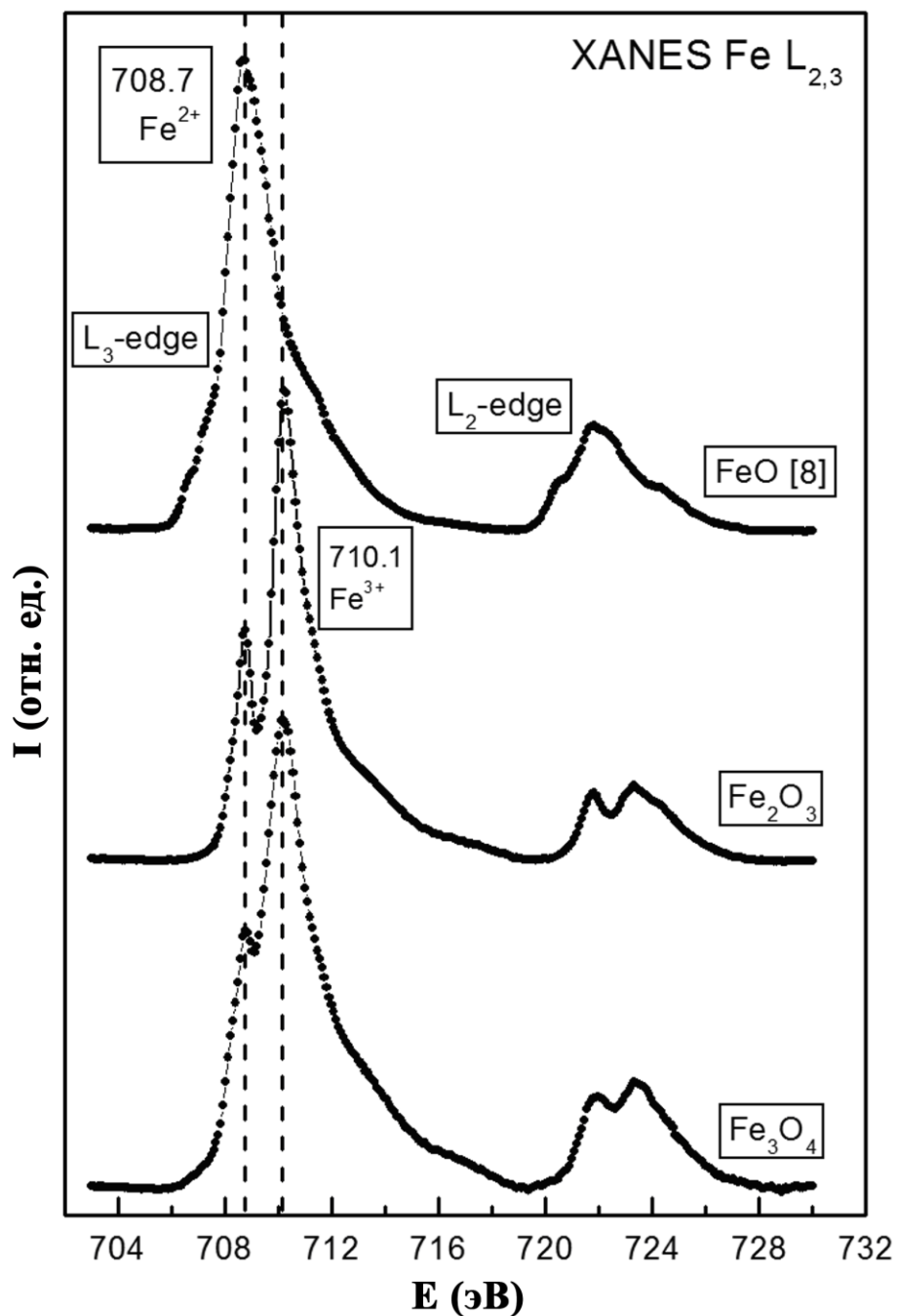


Рис. 30. XANES Fe L_{2,3} спектры эталонных образцов оксидов железа FeO, Fe₂O₃ и Fe₃O₄. E – энергия рентгеновского излучения (эВ), I – интенсивность рентгеновского излучения (отн.ед.)

Энергетическое положение и распределение основных спектральных особенностей находится в хорошем согласии с известными литературными

данными [156]. Основной пик L_3 -края поглощения двухзарядного иона Fe^{2+} в FeO имеет энергию $\sim 708,7$ эВ. Оксиды Fe_2O_3 и Fe_3O_4 (Рис. 30) имеют более сложную тонкую структуру краёв поглощения, что обусловлено $p-d$ - и $d-d$ -кулоновским обменным взаимодействием электронов. Наличие двух максимумов (низкоэнергетический t_{2g} и высокоэнергетический e_g) тонкой структуры краёв L_3 и L_2 с энергией расщепления $\sim 1,5$ эВ обусловлено действием кристаллического поля.

Использованный нами способ пробоподготовки позволил зарегистрировать XANES $L_{2,3}$ -спектр железа белка Dps (Рис. 31).

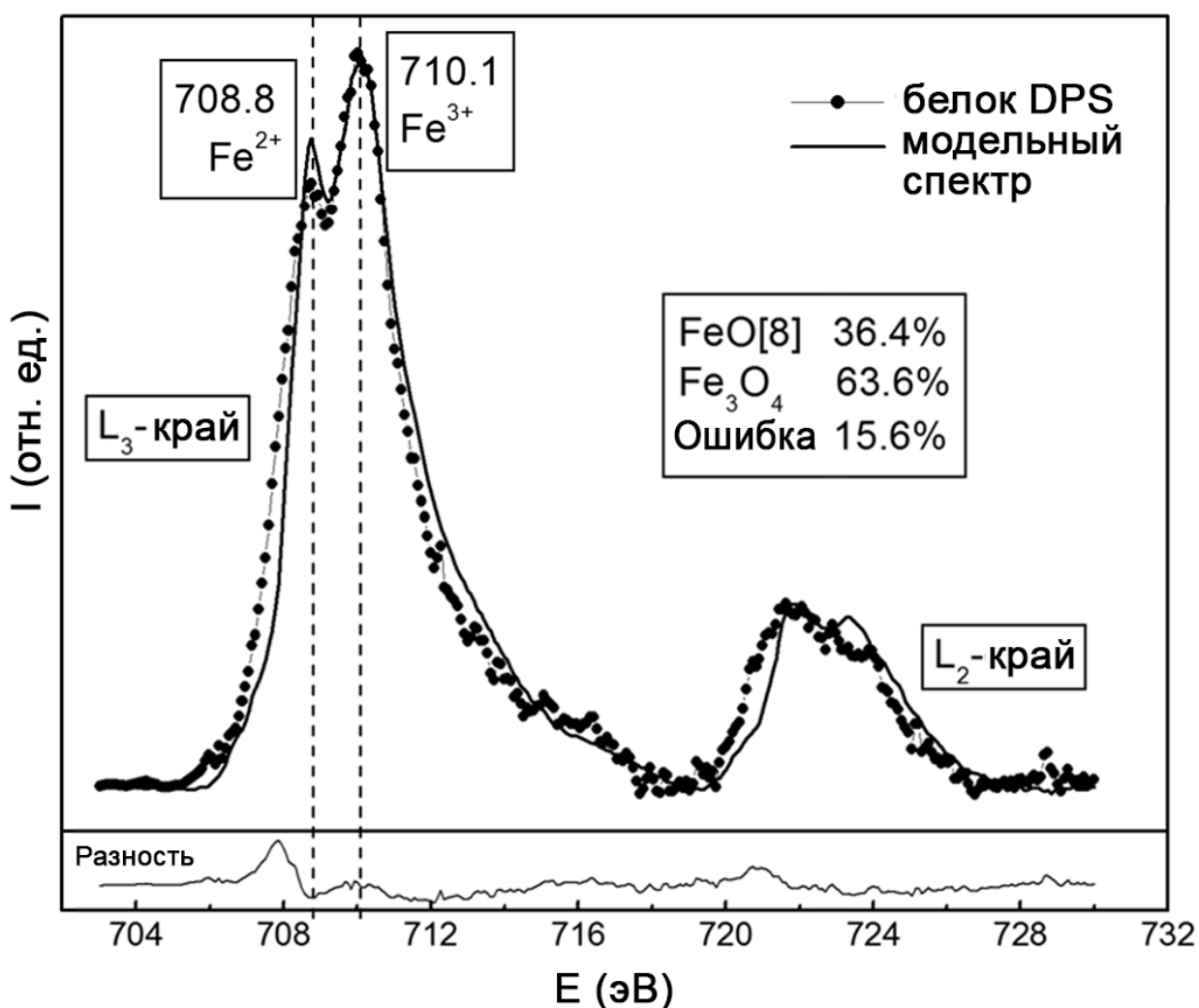


Рис. 31. XANES Fe $L_{2,3}$ -спектр белка Dps (точки) и модельный спектр (сплошная линия) совместно с результирующим вкладом выбранных спектров эталонов и разностным спектром (внизу)

В его тонкой структуре наблюдается два пика $2t_{2g}$ - и $3e_g$ -края поглощения. Однако в целом тонкая структура L_3 -края железа Dps отличается от тонкой структуры всех эталонных спектров (Рис. 31), в том числе, от структуры эталонного нанопорошка Fe_3O_4 . Заметим, что интенсивность $2t_{2g}$ -пика спектра Dps выше, чем у всех эталонных образцов, что свидетельствует о более сложном соотношении разнозарядных ионов в ядре Dps.

Для выявления компонентов, которые потенциально могут входить в состав неорганического ядра белка, было применено математическое моделирование спектров с использованием методики, предложенной в работах [48, 178, 182, 183]. Для получения этого модельного спектра были проверены все возможные комбинации спектров эталонов для основных форм оксида железа (как показатель вклада того или иного зарядового состояния ионов железа).

В результате сопоставления экспериментальных данных и результатов моделирования было выявлено, что наиболее близким совпадением с XANES $L_{2,3}$ -спектром образца Dps обладал набор эталонов FeO и Fe_3O_4 , вклад которых составлял 36 и 64% соответственно. Это свидетельствует о наличии в составе Dps не только трёхзарядного (Fe^{3+}), но и двухзарядного (Fe^{2+}) состояния ионов железа, причём в октаэдрическом и тетраэдрическом окружении атомами кислорода.

Необходимо учитывать, что осаждение молекул белка из водного раствора на подложку и их высушивание может приводить к изменению фазового состава неорганического ядра Dps из-за частичного или полного разрушения его олигомеров. Однако литературные данные свидетельствуют о минерализации *in vitro* двухвалентного железа с участием ионов хлора в отсутствие кислорода и пероксида водорода [218]. Поэтому полученные данные вполне могут отражать естественное соотношение Fe^{2+} и Fe^{3+} в ядрах нативных молекул Dps. Это свидетельствует о преимущественном содержании трёхвалентного железа в исследованном образце (Рис. 31), что соответствует

ожидаемому результату, поскольку одной из основных биологических функций Dps является окисление токсичного для клеток Fe^{2+} до Fe^{3+} с депонированием внутрь белковой полости в легко доступной для последующего использования форме. Тем не менее, присутствие ионов Fe^{2+} может указывать на более сложный состав минерализованного ядра нативных молекул Dps.

Таким образом, использованный подход расширяет понимание атомного и электронного строения, фазового состава частиц Dps и позволяет глубже понять особенности функционирования Dps как в роли биологической макромолекулы, так и в роли гибридной биологической наночастицы.

3.4 Оценка сродства Dps к различным областям регуляторной области собственного гена

Известно, что делеция *dps* приводит к изменению белкового профиля в голодающих клетках *E.coli* [12], а также к изменению профиля транскрипции в *S.enteritidis* [29] и *E.coli* [152]. Но такой эффект может быть опосредован взаимодействием других регуляторных белков с сайтами связывания, которые высвобождаются при делетировании *dps*. Иными словами, данные, полученные *in vivo*, предполагают, но не являются достаточными для опровержения традиционной точки зрения о неспецифичном взаимодействии Dps с ДНК [12, 20, 31, 50, 68]. Поэтому для проверки этого предположения нами было проведено тестирование эффективности связывания Dps с «промоторным островком» *yeaI* и регуляторной областью собственного гена (Рис. 32).

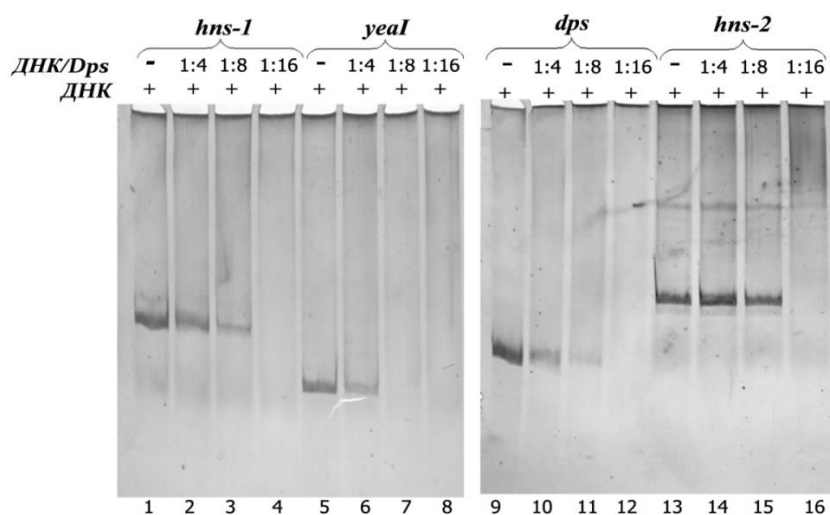


Рис. 32. Оценка эффективности связывания белка Dps с различными фрагментами ДНК *E. coli*. На дорожки 1, 5, 9 и 13 нанесены только модельные фрагменты ДНК в количестве 0,14, 0,29, 0,28 и 0,19 мкг соответственно. На дорожки 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 14, 15 и 16 – их комплексы с белком Dps. Над гелем указаны молярные соотношения ДНК:белок. Гель окрашивали бромистым этидием и нитратом серебра

Для сравнительного анализа было выбрано 4 фрагмента ДНК, полученных в ПЦР: L, *hns-1*, *hns-2* и *yeaI*. Фрагменты L и *hns-1* были взяты из промоторных областей генов *dps* и *hns*, фрагмент *hns-2* содержал частично промоторную и частично кодирующую части соответствующего гена, а фрагмент *yeaI* из транскрипционно неактивного «промоторного островка», локализованного в области гена *yeaI*. Фрагмент L имел длину 420 пар нуклеотидов и содержал экспериментально картированный промотор этого гена [13, 20], а также по 4 дополнительных промотора, предсказанных компьютерным алгоритмом PlatProm для транскрипции в прямом и обратном направлении [167]. Фрагмент *hns-1* содержит экспериментально идентифицированный промотор гена *hns* [46], картированный ранее промотор для антисмысловой транскрипции [8], а также 2 дополнительных промотор-подобных сайта, предсказанных алгоритмом PlatProm. Фрагмент *hns-2* длиной 466 п.н., перекрывается с фрагментом *hns-1* на 334 п.н. и

включает антисмысловой промотор. Фрагмент *yeaI* имеет длину 310 п.н. и содержит 42 предсказанные PlatProm точки инициации транскрипции.

Для оценки способности Dps формировать нуклеопротеидные комплексы с выбранными фрагментами ДНК был использован метод задержки ДНК-белковых комплексов в геле (Рис. 32). Особенностью электрофоретического фракционирования Dps и его комплексов с ДНК является невозможность в большинстве случаев одновременной регистрации свободной ДНК и образовавшихся комплексов. Такое явление можно объяснить бóльшим размером молекулы Dps, состоящей из 12 одинаковых субъединиц, и возможностью образования крупных олигомерных комплексов в присутствии фрагментов ДНК, которые практически не входят в гель. Более того, аналогичный результат электрофоретического фракционирования нуклеопротеидных комплексов, образуемых этим белком, был опубликован ранее [20]. Поэтому об эффективности взаимодействия Dps с ДНК судили по убыли фракции свободных фрагментов ДНК.

Было установлено, что все используемые фрагменты обладают способностью взаимодействовать с Dps. Однако наблюдаемая в ходе экспериментов эффективность этого взаимодействия была неравнозначна. Было выявлено, что два А/Т-богатых фрагмента ДНК, содержащих «промоторный островок» *yeaI* и регуляторную область *dps*, имеют бóльшее сродство к Dps, чем линейные фрагменты ДНК, содержащие кодирующие последовательности ДНК или пространство между конвергентными генами. Стоит отметить, что данные эксперименты были выполнены *in vitro*, в отсутствие какой-либо конкуренции со стороны регуляторных белков. Также нужно учитывать, что большинство белков, участвующих в транскрипции, обычно влияют на экспрессию своих собственных генов, поэтому для дальнейшего тестирования особенностей взаимодействия Dps с ДНК был выбран фрагмент L, как наиболее удобный и перспективный модельный объект.

Для более детального понимания особенностей сродства Dps к регуляторной области собственного гена фрагмент L разделили на два участка. Первый фрагмент длиной 259 пар нуклеотидов содержит основной промотор гена – P_{dps} [13, 101] и расположен ближе к кодирующей части гена *dps* (Рис. 23). Второй, длиной 214 пар нуклеотидов, содержит дистальный промотор-подобный сайт P₃, который продемонстрировал низкую транскрипционную активность, но был важен для максимальной экспрессии *dps* [172] (Рис. 33).

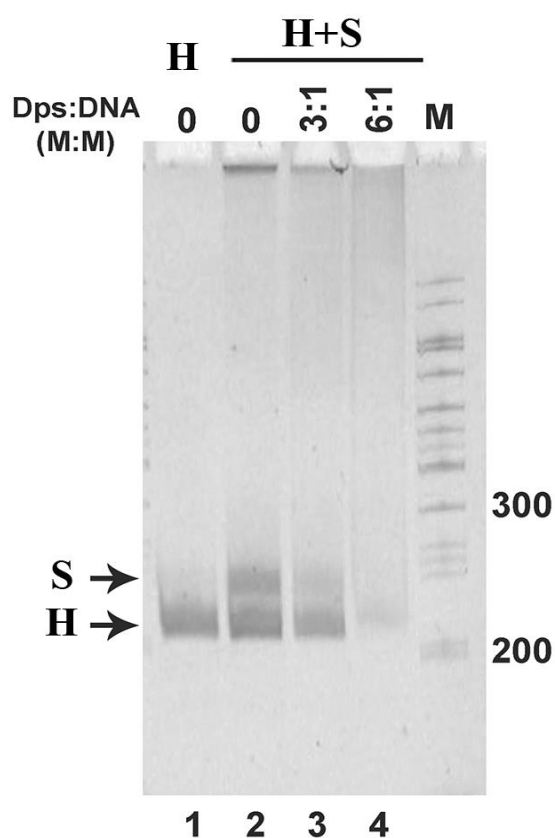


Рис. 33. Оценка эффективности взаимодействия Dps с различными участками регуляторной области собственного гена индивидуально и в условиях конкуренции за белок методом оценки электрофоретической подвижности в геле. Все фрагменты ДНК наносились на гель в количестве 1 пмоль. Перечень образцов, их молярные соотношения указаны сверху рисунка. М – маркеры длины ДНК

Оценку сродства Dps к фрагментам ДНК S и H исследовали с использованием метода задержки в геле нуклеопротеидных комплексов. Для этого были смешаны эквимольные концентрации (1 пмоль/мкл) фрагментов H и S, после чего с этой смесью были приготовлены комплексы аналогично тому, как было описано в предыдущем разделе.

В результате было выявлено, что в условиях конкуренции фрагмент, содержащий функциональный промотор, имеет бóльшее сродство к Dps, чем дистальная часть регуляторной области (Рис. 33). Таким образом, структурно-функциональные особенности именно этой области являются наиболее предпочтительными мишенями для взаимодействия с Dps, что подтверждает предположение о наличии в бактериальной хромосоме участков ДНК, которые обладают повышенным сродством к этому белку.

Структура белка Dps не предполагает наличия классических ДНК-связывающих модулей, однако отличия в эффективности его взаимодействия с различными по физико-химическим свойствам фрагментами бактериальной ДНК могут свидетельствовать о наличии определённых нуклеотидных последовательностей, наиболее предпочтительных для связывания с Dps (Рис. 34).

Поэтому на следующем этапе была предпринята попытка локализовать Dps-связывающие сайты в регуляторной области *dps* с использованием футпринтинга ДНКазой I нуклеопротеидных комплексов, формируемых белком Dps с исследуемыми фрагментами ДНК регуляторной области собственного гена (Рис. 35).

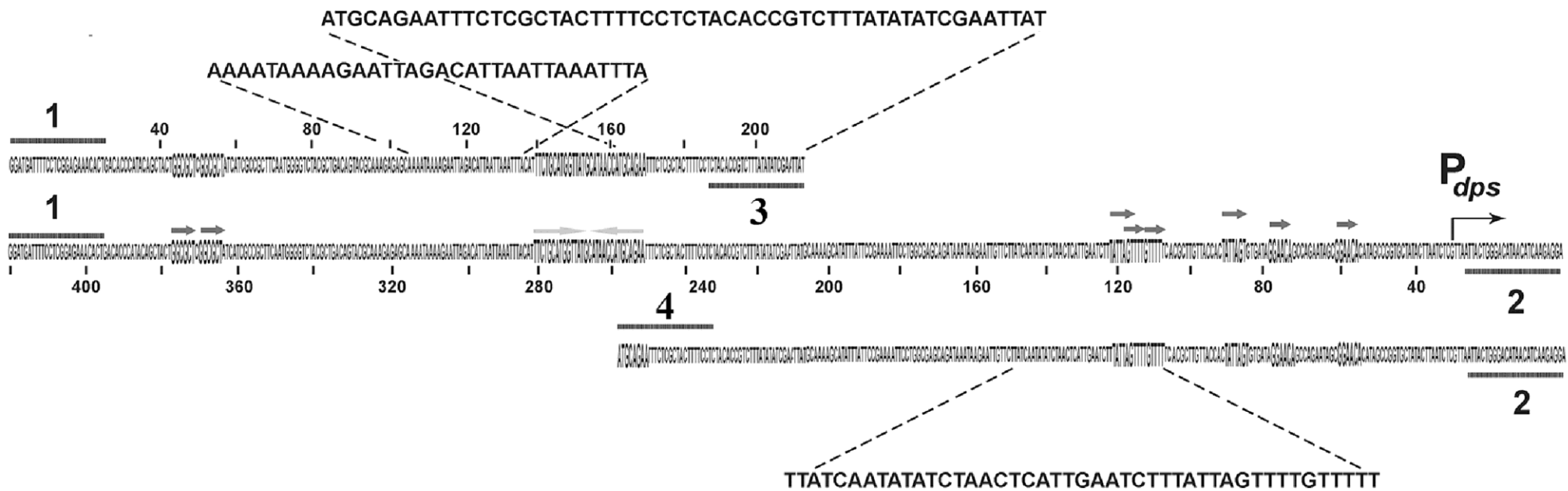


Рис. 34. Схема, иллюстрирующая взаимное расположение и структурную организацию регуляторной области и гена *dps* и расположения в ней прямых и инвертированных повторов (обозначены стрелками)

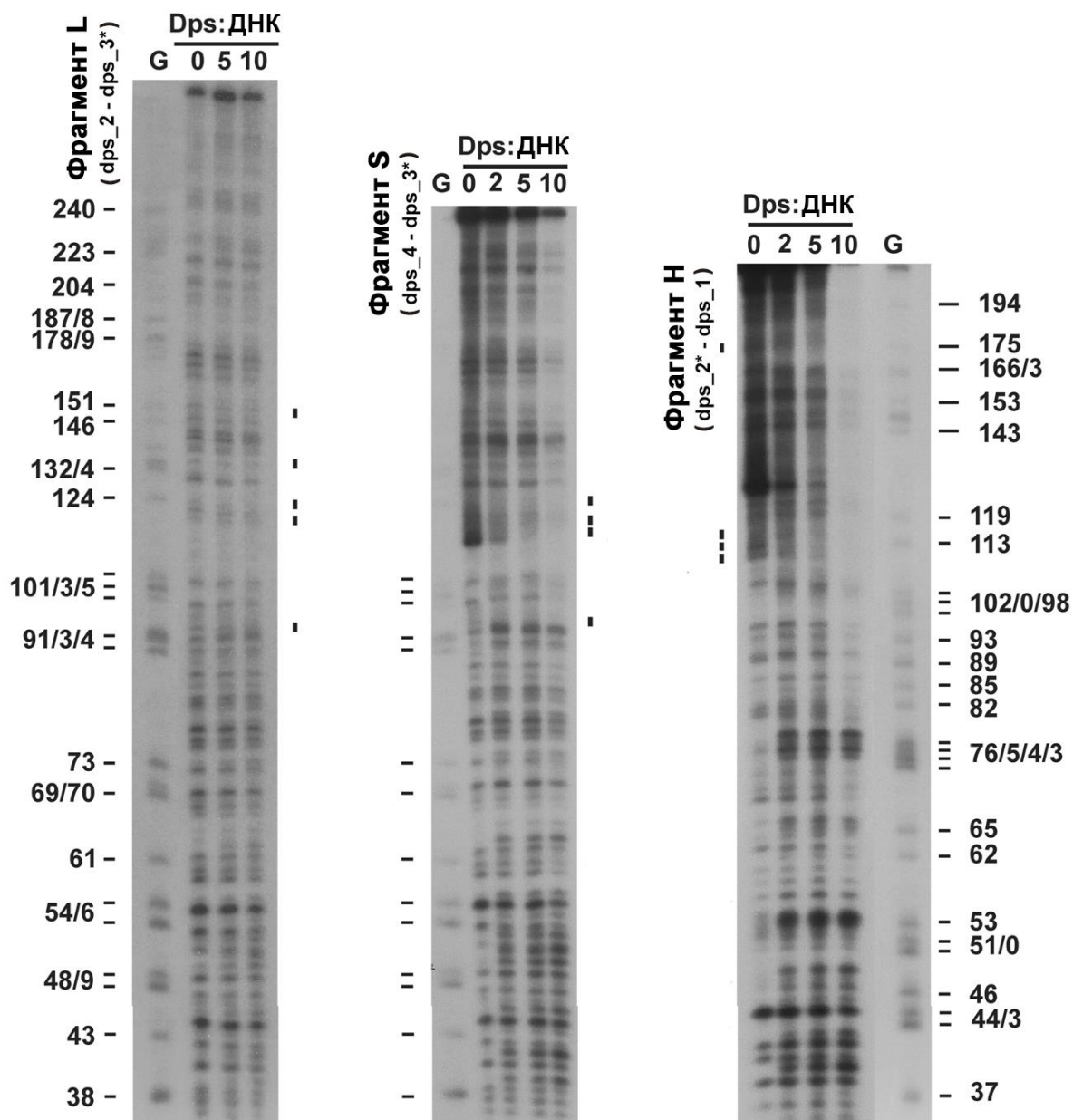


Рис. 35. Футпринт ДНКазы I, выполненный для нуклеопротеидных комплексов Dps с фрагментами ДНК L, S и H. Праймеры, меченые ^{32}P , отмечены звёздочкой

Было обнаружено несколько гиперактивных сайтов, содержащих защищённые dps_1 и dps_4-концы у обоих коротких фрагментов при использовании 10-кратного и 5-кратного молярного избытка Dps. Также было обнаружено лишь несколько защищённых участков в области 175-й и 113-й пары оснований праймера dps_2 и в области 120-151 праймера dps_3. Последнее воспроизводилось в экспериментах при формировании

комплексов как с короткими фрагментами (dps_4 – P³²- dps_3), так и длинными (dps_2– P³²- dps_3), предполагая некоторую специфичность Dps в этих областях связывании. Для изучения особенностей морфологии нуклеопротеидных комплексов, сформированных такими областями, на следующем этапе они были исследованы при помощи атомно-силовой микроскопии.

3.5 Особенности морфологии комплексов Dps с линейными фрагментами ДНК

Исследование особенностей морфологии нуклеопротеидных комплексов проводили методом атомно-силовой микроскопии. Образование комплексов с ДНК вызывало формирование избыточного количества агрегированных молекул, что значительно затрудняло интерпретацию получаемых изображений. Но их устранение с помощью промывания поверхности образца дистиллированной водой позволило наблюдать отдельные комплексы Dps с фрагментами ДНК S или H, которые были использованы на предыдущем этапе для оценки сродства Dps к ДНК в условиях конкуренции. В обоих случаях наблюдалось взаимодействие белковых частиц с концевыми участками молекул ДНК (Рис. 36). Мы не наблюдали формирования упорядоченных двумерных структур, зарегистрированных ранее с помощью электронной микроскопии [12, 60, 62, 71, 195, 212]. Но это было ожидаемо, поскольку согласуется с литературными данными [31, 33, 34]. Помимо этого, также не наблюдалось формирования гексамерных колец вокруг ДНК [12] или нуклеосом-подобного оборачивания ДНК вокруг сферических частиц Dps [212], что предполагается существующими моделями взаимодействия Dps. Не было также обнаружено большого количества молекул Dps, взаимодействующих с одним и тем же участком линейного фрагмента ДНК. Но даже если принять во внимание, что подобные комплексы могли быть удалены в процессе промывания, ясно, что

Dps может взаимодействовать с концевыми участками двуцепочечной ДНК (Рис. 36).

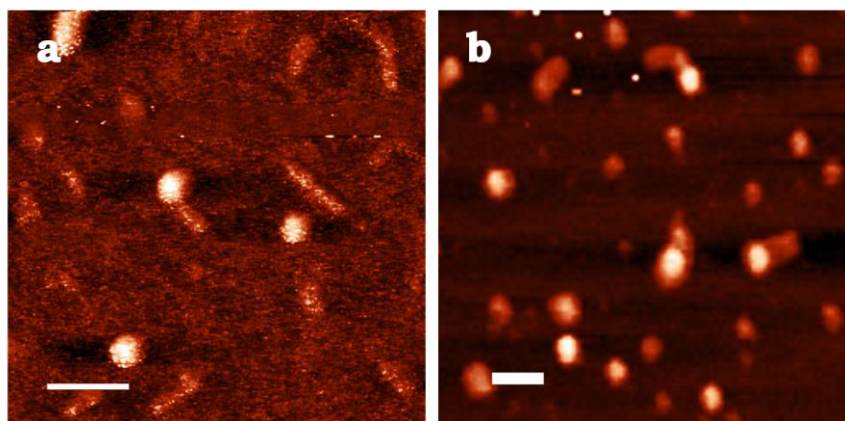


Рис. 36. АСМ-изображения комплексов Dps с ДНК: а – нуклеопротеидные комплексы, сформированные Dps с фрагментами S (259 п.н.); б – нуклеопротеидные комплексы, сформированные Dps с фрагментами Н (214 п.н.); белая черта на рисунках соответствует 100 нм

Поскольку фрагменты S и H перекрываются на 53 п.н. в их А/Т-богатых областях, выдвинуто предположение, что повышенное сродство белка к фрагменту Н (Рис. 33) обусловлено его меньшей термодинамической стабильностью по причине содержания меньшего числа А/Т пар (65 и 58% для фрагментов S и Н, соответственно). Для проверки этого предположения на следующем этапе была предпринята попытка спроектировать и собрать разветвлённые самособирающиеся Y-подобные молекулы ДНК различной структуры и нуклеотидного состава, используя модифицированную технологию ДНК-оригами [157].

3.6 Искусственные разветвлённые структуры ДНК как мишень для Dps

Исходно были собраны две разветвлённые структуры для изучения сродства Dps к А/Т-богатым участкам ДНК. Одна из них собрана из 2 синтетических олигонуклеотидов Y1 (57 п.н.) и Y3 (64 п.н.) (Табл. 2). Она

имеет участок длиной 32 п.н. со стабильным G/C-остовом и две гибкие одноцепочечные ветви, одна из которых состоит из 25 остатков аденинов, а вторая – из 32 остатков цитозинов (Рис. 37А). Если Dps имеет повышенное сродство к одноцепочечной ДНК, то ожидаемым является формирование комплекса с этими одноцепочечными ветвями, тогда как G/C-остов будет не закрыт белковой глобулой, сформировавшей нуклеопротеидный комплекс. Вторая структура была собрана из олигонуклеотидов Y1, Y2 и Y3 (Табл. 2) и состояла из трёх комплементарных ветвей: двух ветвей длиной 32 п.н. и одной 25 п.н. в длину. Две длинные ветви этой молекулы состояли только из остатков гуанина и цитозина, тогда как укороченная ветвь состояла только из A/T пар и могла быть идеальной мишенью для специфического взаимодействия (Рис. 37В). Если это так, то в данном случае ожидаемым является обнаружить Dps на конце короткой ветви.

На левой панели Рис. 37А показано схематичное изображение Y-подобной ДНК, содержащей две одноцепочечных ветви и одну комплементарную. На центральной панели Рис. 37А приведены результаты визуализации с помощью АСМ свободных молекул ДНК, собранных из олигонуклеотидов Y1 и Y3. Все они имеют зерноподобную форму, что может быть связано со способностью гуанинов к квазикомплементарному взаимодействию с аденинами и гуанинами.

Видимый продольный размер этих частиц составляет около 25 нм, что меньше ожидаемого для полностью развёрнутого дуплекса ($32 * 0,34 + 32 * 0,59 = 29,8$ нм, где 0,34 нм – длина одного нуклеотида, 32 – количество нуклеотидов во фрагменте). Такая гетерогенность полученных структур может быть обусловлена взаимодействием 3'-концевых цитозинов олигонуклеотида Y1 не только с 5'-концевыми гуанинами из Y3, но и с другими гуанинами данной поли-G цепи, образуя смесь дуплексов различной структуры. Тем не менее, все эти структуры должны содержать, по крайней мере, небольшие участки двуцепочечной ДНК. Помимо продолговатых зёрен длиной около 25 нм были также зарегистрированы более мелкие частицы

длиной 13–20 нм, что соответствует размерам одиночных олигонуклеотидов, которые могли сформировать квадруплексы или иные вторичные структуры.

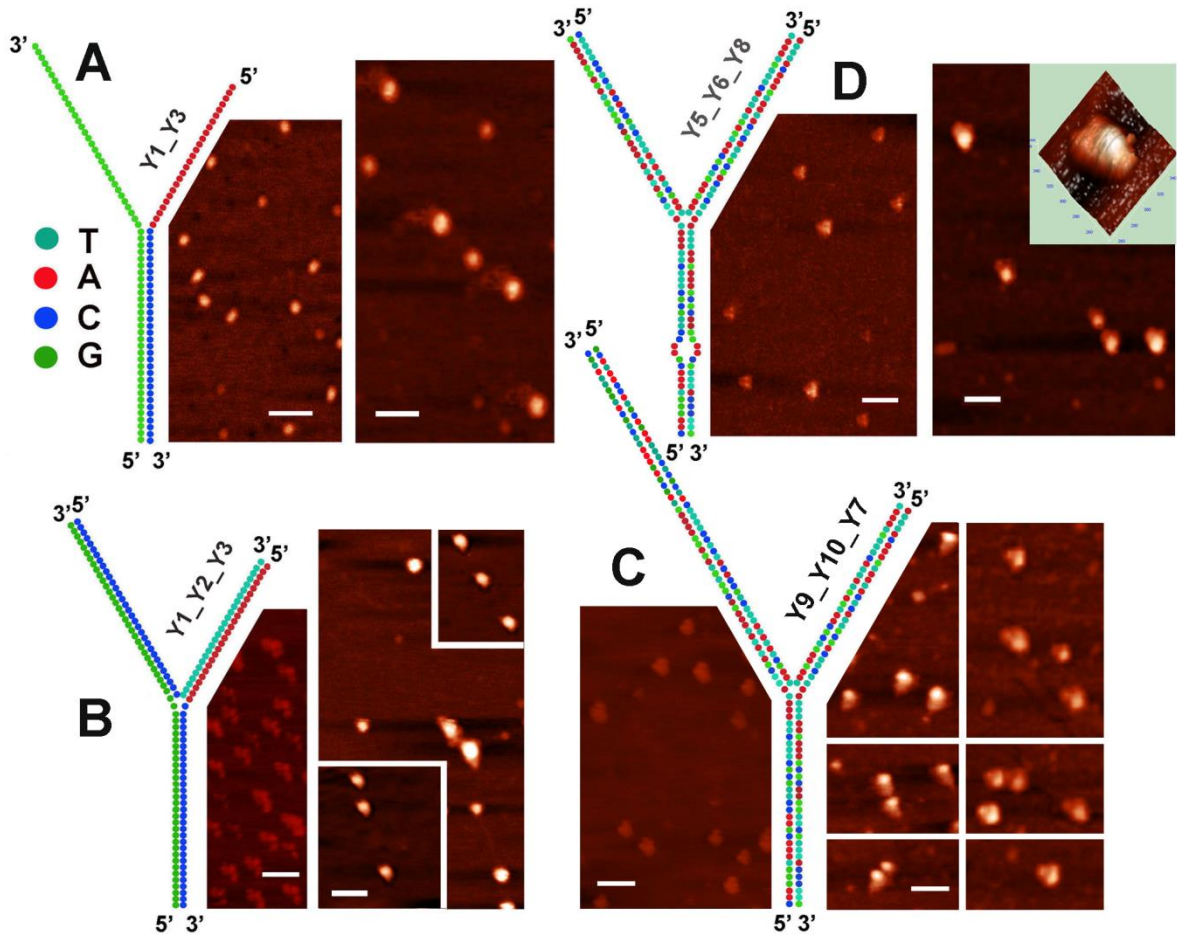


Рис. 37. Комплексы, образованные Dps с четырьмя искусственными разветвлёнными ДНК-структурами. Их конструкции схематично показаны слева от каждого из АСМ-изображений. В центре каждой панели – АСМ изображения свободных молекул ДНК. С правой стороны – АСМ изображения нуклеопротеидных комплексов с Dps каждой из таких структур. А – ДНК-структура из цепей Y1-Y3; В – ДНК-структура из цепей Y1-Y2-Y3; С – ДНК-структура из цепей Y7-Y9-Y10; D – ДНК-структура из цепей Y5-Y6-Y8. Вставка справа рисунка D иллюстрирует 3D-изображение комплексов. Белая черта на рисунках соответствует 100 нм

Добавление Dps меняет структуру этих зерновидных частиц таким образом, что вместо ожидаемой конструкции, состоящей из двуцепочечного участка, соединённого с бинарным комплексом, мы наблюдали 2–4

неупорядоченных одноцепочечных участка ДНК (Рис. 37А), имеющих длину 14–60 нм. Если принимать во внимание погрешность метода АСМ в планарной проекции, то они могут рассматриваться как два олигонуклеотида длиной 34 и 38 нм, соответственно. Их присоединение к поверхности белка или к его N-концам может осуществляться за счёт их 3'- или 5'-концов или внутренних частей, а также за счёт одновременного взаимодействия с белком двух одноцепочечных ветвей разных Y-образных молекул.

Во всех случаях максимальная длина наблюдаемых одноцепочечных участков была больше длины одноцепочечных ветвей правильно собранного дуплекса, которая составляет 15–20 нм. Это свидетельствует о том, что первичное связывание Dps происходило с зерновидными частицами и было достаточно сильным для изменения их структуры и удерживания неупорядоченных молекул.

Разветвлённые молекулы ДНК на Рис. 37В были собраны из олигонуклеотидов Y1, Y2 и Y3 (Табл. 2). Они сформировали Y-подобную структуру, приведённую на центральной части рисунка Рис. 37В. При этом сама структура состояла из асимметричной V-образной области и соединённого с ней маленького домена. Размеры этого домена достаточно близко совпадали с размерами зерновидных частиц, наблюдаемых на центральной панели на Рис. 37А, в то время как длина V-образной области варьировалась в пределах 24–30 нм, что несколько больше ожидаемого размера ($64 \cdot 0,34 = 21,8$ нм). Соотношение между двумя его сторонами составляло 0,88, что достаточно близко к расчётному значению ($57/64$ п.н. = 0,89). Короткая сторона V-образного модуля на Рис. 37В, по всей вероятности, соответствует A/T-ветви, тогда как G/C-ветвь конформационно скрыта. Ориентация триплекса относительно короткой ветви была случайной из-за независимой сборки олигонуклеотидов. Кроме того, на Рис. 37В присутствует 10–20% более крупных Y-подобных объектов длиной 53–62 нм, высотой 2,6 нм. Они, вероятно, были сформированы из агрегировавших триплексов и дуплексов в результате квази-комплементарного квадруплекс-

подобного взаимодействия вдоль G-цепи. Таким образом, существуют основания предполагать, что самосборка наблюдаемых частиц проходит через стадию формирования комплементарных триплексов, связанных с дуплексами через неканоническое спаривание.

Электрофоретическое фракционирование структур, полученных с использованием олигонуклеотидов Y1-Y2-Y3 и Y5-Y6-Y7 и их нуклеопротеидных комплексов, действительно выявило две полосы, которые по своей электрофоретической подвижности могут соответствовать триплексам и дуплексам (Рис. 38, дорожка 1).

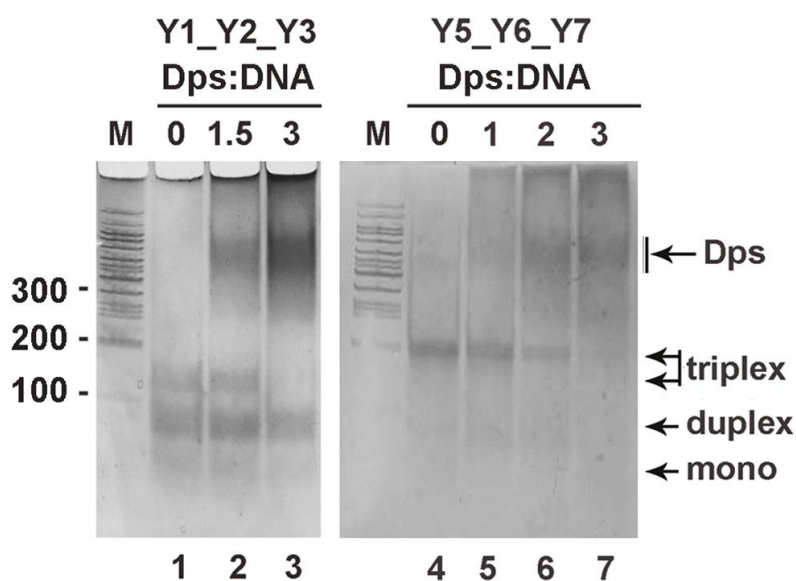


Рис. 38. Оценка электрофоретической подвижности комплексов Dps с Y-подобными структурами Y1-Y2-Y3 (Рис. 37В) и Y5-Y6-Y7. Состав и молярное соотношение смесей Dps-ДНК указаны над рисунком. Комплексы с Dps были сформированы без предварительного фракционирования Y-подобных структур после самосборки. Гели были откалиброваны с помощью ДНК-маркеров (M) и окрашены с помощью AgNO_3

Как и ожидалось, обе Y-подобные структуры взаимодействовали с Dps. Однако исследование морфологии поверхности с помощью АСМ выявило, что белок располагается только в центральной части данных структур (В на Рис. 37), что при определённой укладке этих Y-ДНК на поверхности слюды не исключает возможности взаимодействия с A/T- или

G/C ветвями молекулы. Тем не менее, подробное рассмотрение отдельных структур размером приблизительно 24–30 нм также не выявило специфического связывания с концами Y-ДНК (вставки на правой панели Рис. 37B). Поскольку диаметр этих структур был лишь ненамного больше диаметра Dps, то в планарной проекции они практически полностью были закрыты белком и видимы только окончания всех трёх ветвей.

Для того чтобы сравнить сродство Dps к бинарным структурам и триплексам, мы приготовили смесь из самособирающихся молекул и без дополнительного фракционирования добавили к этой смеси Dps (Рис. 38, дорожки 1–3). Трёхкратный молярный избыток белка был достаточен для связывания всех сформировавшихся триплексов, тогда как большинство дуплексов остались свободными. Основываясь на этих данных, мы предположили, что Dps может связывать одноцепочечную ДНК и даже плавить двойную спираль (Рис. 37A), но разветвлённые структуры, предоставляя дополнительную двуцепочечную платформу для взаимодействия, могут быть более предпочтительными мишенями для положительно заряженных N-концов додекамера Dps.

На следующем этапе было установлено, что способ взаимодействия, зарегистрированный для структуры Y1-Y2-Y3 (Рис. 37B), не является следствием её специфической первичной структуры и/или нуклеотидной последовательности, поскольку Y-образные молекулы, собранные из олигонуклеотидов с естественными нуклеотидными последовательностями Y5, Y6 и Y7 или Y8, формировали нуклеопротеидные комплексы с аналогичным расположением додекамера Dps.

С помощью электрофоретического фракционирования было выявлено, что эффективность самосборки этих конструкций, состоящих суммарно из 96 п.н., была гораздо более высокой (Рис. 38, дорожка 4) по сравнению с триплексом Y1-Y2-Y3 (Рис. 38, дорожка 1). Этот факт связан с тем, что нуклеотидная последовательность Y5, Y6 содержит перекрывающиеся части фрагментов H и S, вследствие чего, фракция дуплексов составляет

незначительную часть смеси. Однако добавление двукратного молярного избытка белка приводило к увеличению количества дуплексов в смеси (Рис. 38, дорожка б). Таким образом, можно сделать вывод о том, что между разветвлёнными молекулами ДНК с одноцепочечными и двуцепочечными участками белок предпочитает последние.

Тем не менее, до конца не ясно, будут ли молекулы Dps проявлять сродство именно к двуцепочечным молекулам ДНК или к близкорасположенным одноцепочечным участкам ДНК. Для проверки этого предположения было спроектировано и использовано две модификации вышеописанных форм самособирающихся Y-подобных ДНК. В первой было добавлено 26 нуклеотидов, которые содержали сайт, защищённый Dps от воздействия ДНКазы I, на 5'-конец олигонуклеотида Y5 и 3'-конец Y6 (9 нм), увеличивая, таким образом, длину этой ветви триплекса (Табл. 2 и Рис. 37C). Полученные при помощи атомно-силовой микроскопии результаты свидетельствуют, что в таком случае формируются нуклеопротеидные комплексы, в которых можно отчётливо наблюдать одну или две ветви ДНК, не закрытые додекамером Dps (Рис. 37C, правая часть). Если ранее взаимодействие с Dps происходило либо в области ветвления Y-ДНК, либо на конце линейной ДНК, то теперь взаимодействие было преимущественно в области разветвления, при этом удлинённая ветвь была отчётлива различима. Во второй модификации Y-ДНК мы произвели замену двух нуклеотидов AA на TT в центре олигонуклеотида Y7 (Табл. 2, Y8), поэтому Y-подобная структура Y5-Y6-Y8 (Рис. 37D) стала содержать короткую одноцепочечную петлю в одной из ветвей. Такая замена в нуклеотидной последовательности привела к некоторому смещению белковой глобулы от точки ветвления молекулы ДНК (Рис. 37D), в результате можно было наблюдать все три ветви Y-ДНК (смотри 3D вставку на Рис. 37D).

Таким образом, можно отметить, что Dps преимущественно взаимодействует с точками ветвления Y-ДНК. Это может быть обусловлено их повышенной термодинамической нестабильностью, сформированной

вследствие увеличения расстояния между сахаро-фосфатными остовами нуклеотидов. При этом следует отметить, что Dps сохраняет некоторое сродство к одноцепочечным или гибким областям в структуре ДНК. Если это так, то связывание Dps с одноцепочечными участками полноценной ДНК может вызывать их плавление, аналогичное тому, как показано на Рис. 37А. Для проверки этой возможности мы проанализировали морфологию нуклеопротеидных комплексов, сформированных Dps с нативной и обработанной никазой плазмидной ДНК pET28b.

3.7 Исследование комплексов Dps с плазмидной ДНК

Для изучения возможности взаимодействия Dps с плазмидной ДНК, содержащей одноцепочечные разрывы, был применён метод атомно-силовой микроскопии. Сначала была исследована очищенная плазида pET28b, которую использовали в качестве модели нативной суперспирализованной молекулы ДНК (Рис. 39А). Эта плазида была обработана сайт-специфичной никазой Nt.BspD6I, узнающей девять последовательностей GAGTC и делающей разрывы четырёх нуклеотидов в верхней нити ДНК в сторону 3'-конца [115]. В результате этого воздействия плазида релаксирует и даже может фрагментироваться в случае близкого расположения сайтов, распознаваемых никазой (Рис. 39В).

Далее к обработанной никазой ДНК добавляли Dps. В рамках данного эксперимента комплексы с ДНК формировали в присутствии 5- и 10-кратного молярного избытка белка. Такой подход обеспечивает формирование комплексов с нативной и деформированной после обработки никазой ДНК и позволяет идентифицировать их различия. Тогда как относительно небольшой избыток белка даёт шанс увеличить долю комплексов, образованных Dps с предпочтительными нуклеотидными последовательностями. Плотность связывания Dps при его 10-кратном избытке была больше на обработанной никазой плазмиде по сравнению с

нативной: 1 молекула на 117 ± 12 нм против 135 ± 23 нм соответственно (расчетная длина плазмиды составляет 1917 нм).

Полученные различия не являются статистически значимыми, но для плазмиды, модифицированной сайт-специфичной нуклеазой, они были постоянны. Тем не менее, бинарные комплексы с додекамерами Dps в обоих случаях имели схожую морфологию, но их тщательное изучение не выявило одноцепочечных участков в области взаимодействия с Dps (Рис. 39 С и D).

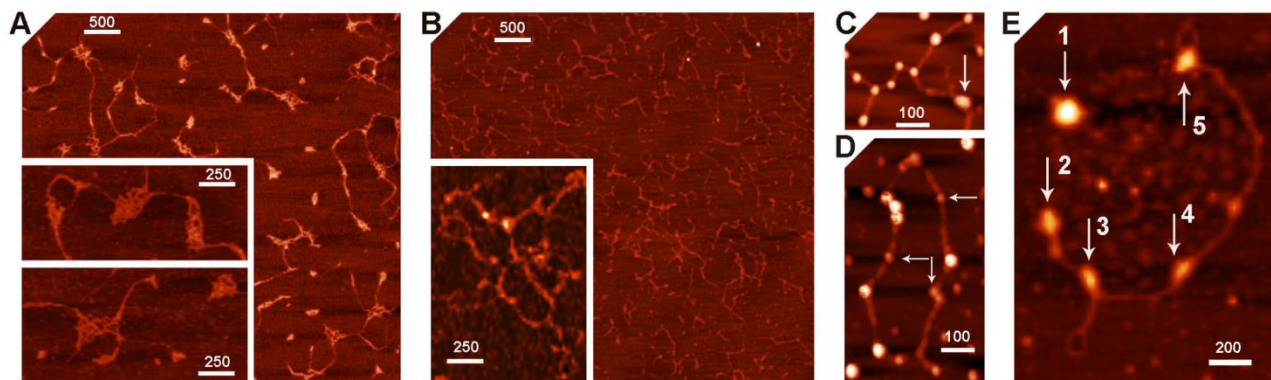


Рис. 39. Изображения, полученные с помощью АСМ для нативной плазмиды (А, С) и плазмиды рЕТ28b, обработанной сайт-специфичной нуклеазой Nt.BspD6I (В, D, E), в свободном состоянии (А, В) и в составе нуклеопротеидных комплексов с Dps (С–Е). Белая черта – шкала (нм).

Горизонтальными и вертикальными стрелками на панелях С–Е указаны области формирования нуклеопротеидных комплексов с додекамерами Dps и олигомерами более низкой организации, соответственно

Для нативных и никированных образцов плазмиды примерно 15% комплексов были сформированы с частицами Dps, степень олигомеризации которых была меньше, чем додекамер (Рис. 39D, горизонтальные стрелки). Поэтому можно предположить, что додекамерная форма является не единственно возможной для формирования нуклеопротеидных комплексов с ДНК. Помимо этого, при взаимодействии с плазмидой, фрагментированной в результате обработки нуклеазой, в большинстве случаев Dps располагался на концах двойной спирали. Таким образом, способность взаимодействовать с

концами двойной спирали ДНК свойственна не только в случае коротких линейных фрагментов ДНК. Образцы плазмиды, обработанные никазой, при этом содержали в два раза больше комплексов, образованных агрегированными или модифицированными частицами Dps (30 и 15%, соответственно), которые, как правило, были встроены в матрицу ДНК. И хотя их детальная структура требует специального исследования, ясно, что способ этого взаимодействия вызывает значительные конформационные перестройки в ДНК, поскольку суперскрученная ДНК, отчётливо наблюдаемая возле комплекса 3 (Рис. 39Е), не может образоваться в плазмиде после обработки никазой или в результате пробоподготовки.

3.8 Оценка физико-химических характеристик нуклеопротеидных комплексов белка Dps с различными фрагментами ДНК

Для оценки возможных конформационных изменений додекамеров Dps при формировании нуклеопротеидных комплексов, оценки их стабильности, а также констант ассоциации и диссоциации при взаимодействии с различными фрагментами ДНК, было использовано несколько подходов. В частности, оценку конформационных изменений молекул Dps отдельно и в составе нуклеопротеида при действии различной температуры проводили с использованием метода динамического светорассеяния и флуоресцентной спектроскопии. Константы ассоциации-диссоциации комплексов Dps-ДНК измерили с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса.

Гидродинамический радиус молекул Dps в растворе из 50мМ NaCl, 50мМ Tris-HCl (pH 8,0), 10^{-4} М EDTA был 9–10 нм при 25°C. Повышение температуры до 55°C с шагом в 10°C практически не оказывало влияния на гидродинамический радиус белка (Рис. 40А). Его среднее значение при этом составляло 9,86 нм, а средняя интенсивность зарегистрированных максимумов составляла 75,8%, что свидетельствует о высокой достоверности

полученных значений. Стоит отметить, что в ряде экспериментов регистрировалось присутствие минорных пиков с бóльшим значением гидродинамического радиуса, но их вклад составлял в среднем 6,1%. Повышение температуры до 60°C приводило к формированию единственного максимума, соответствующего величине 9,6 нм с интенсивностью 81,7% (Рис. 40В). Дальнейшее увеличение температуры до 65°C приводило к формированию второго, достаточно чётко выраженного максимума с интенсивностью 38,1% в области 115,7нм и снижению интенсивности максимума, соответствующего 9,6 нм до 45,5%, что свидетельствует о начале формирования агрегатов белка.

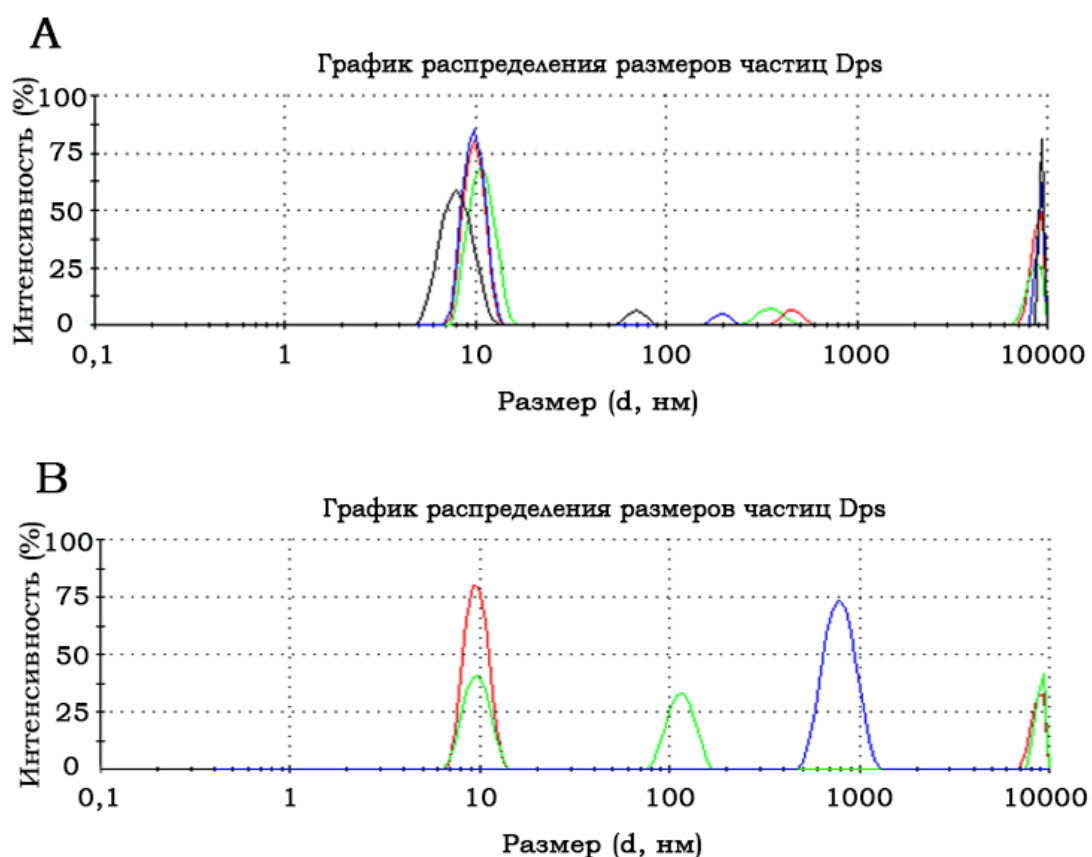


Рис. 40. Распределение размеров частиц в растворе белка Dps при действии различных температур, полученное методом динамического светорассеяния. (А): красная линия – 25°C; зелёная линия – 35°C; синяя линия – 45°C; чёрная линия – 55°C; (В): красная линия – 60°C; зелёная линия – 65°C; синяя линия – 70°C

Повышение температуры до 70°C приводило к формированию крупного агрегата диаметром 964,7 нм, что, по всей вероятности, связано с полной денатурацией белка в результате воздействия температуры. Таким образом, был сделан вывод о том, что Dps достаточно стабилен в широком диапазоне температур, причём в области 65°C происходит первичная денатурация молекул белка с последующим формированием крупных агрегатов.

Метод динамического светорассеяния позволяет достаточно точно определить гидродинамический радиус сферических объектов, и этот факт делает его практически не применимым к таким частицам, как фрагменты ДНК. Поэтому на следующем этапе мы использовали данный метод для изучения оценки параметров нуклеопротеидных комплексов, которые имеют структуру, близкую к глобулярной (Рис. 41).

Для проведения данной серии экспериментов комплексы готовили согласно описанной выше методике (см. Материалы и методы, раздел 2.7) с четырёхкратным избытком белка. После инкубации в буфере были проведены соответствующие измерения на приборе Zetasizer Nano (Malvern, UK) при различных температурах. При 20°C были зарегистрированы четыре группы частиц. Первый тип имел диаметр от 6,3 до 14,2 нм (средний диаметр частицы ~ 9,1 нм) и интенсивностью максимума 15,1%. Второй тип частиц имел размеры в диапазоне 17,6 – 34 нм (средний диаметр частицы ~25,4 нм) и обладал меньшей интенсивностью. Третий тип частиц, присутствующих в растворе, имел размеры 146,2 – 780,9 нм (средний диаметр частицы ~ 405 нм), и его вклад составлял 30%. Четвёртый тип имел диаметр частиц свыше 5190 нм, а его интенсивность была наиболее выраженная.

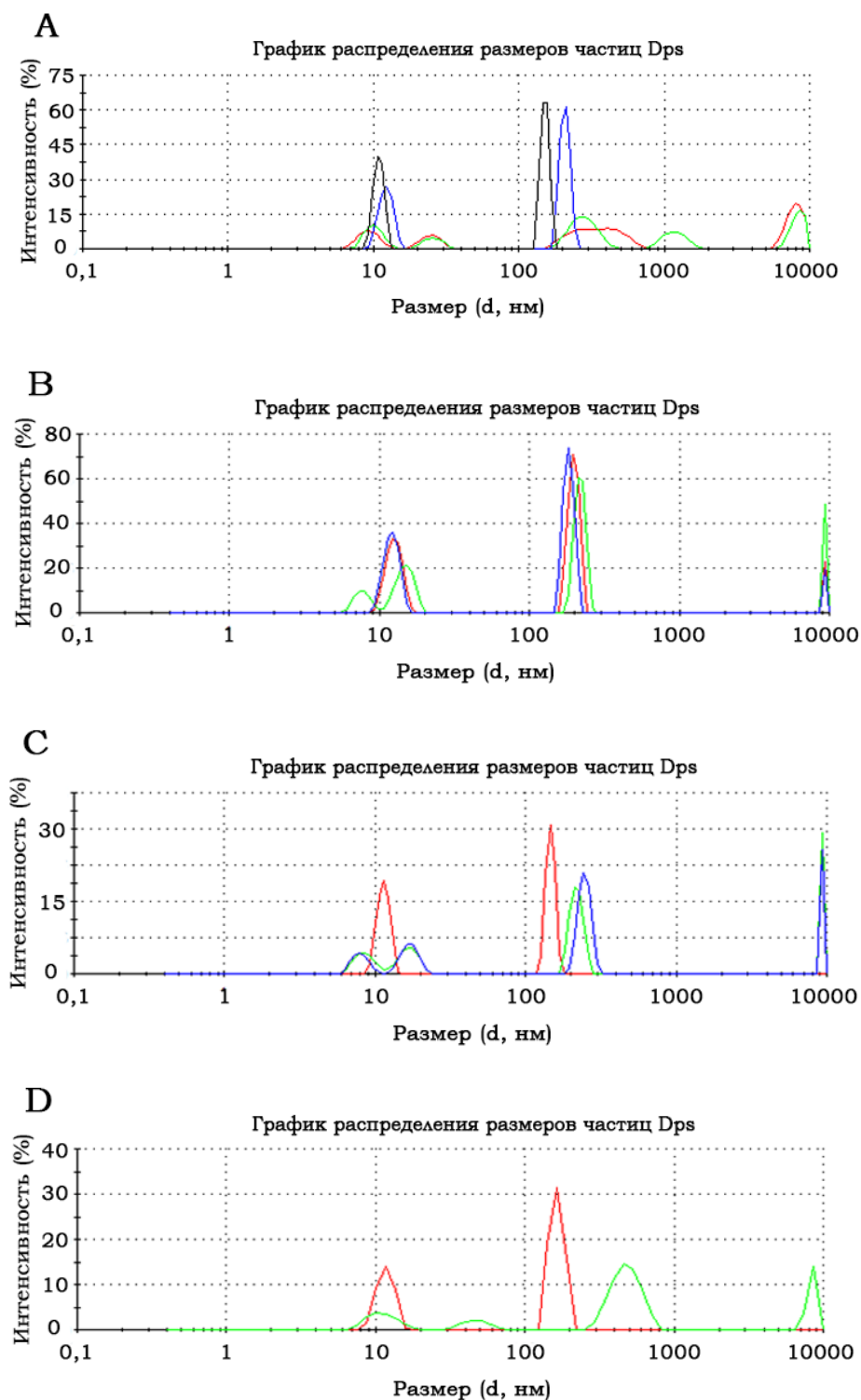


Рис. 41. Распределение размеров частиц в растворе комплексов Dps-ДНК(Н) при действии различных температур. (А): красная линия – 20°C; зелёная линия – 25°C; синяя линия – 35°C; чёрная линия – 45°C; (В): красная линия – 55°C; синяя линия – 60°C; зелёная линия – 65°C; (С): красная линия – 70°C; синяя линия – 75°C; зелёная линия – 80°C; (D): красная линия – 85°C; зелёная линия – 90°C

Повышение температуры до 25°C не вызывало глобальных изменений среди вышеперечисленных типов частиц. Однако третий тип частиц разделился на две группы: диаметром 157,2 – 468,9 нм с интенсивностью 35% и диаметром от 726 – 1872 нм с интенсивностью в полтора раза меньше (Рис. 41А). Полученные данные свидетельствуют о присутствии в растворе значительного количества достаточно крупных полидисперсных частиц, которые вполне могут являться нуклеопротеидными комплексами и их агрегатами. Это согласуется с результатами электрофоретического фракционирования, при котором можно наблюдать только убыль свободной ДНК и полное отсутствие полос, соответствующих нуклеопротеидным комплексам, так как их размеры не позволяют им войти в гель.

Увеличение температуры ещё на 10°C приводит к значительному изменению размеров частиц (Рис. 41В). Из четырёх групп остаются только две. Первая имеет практически те же размеры (9,1 – 16,4 нм), но, в отличие от экспериментов при комнатной температуре, на его долю приходится 37,6% от общего количества частиц в растворе. Вторая группа частиц имеет совершенно новый, но ожидаемый размерный диапазон (169,1 – 261 нм). Такие размеры уже значительно ближе к размеру нуклеопротеидных комплексов, которые мы наблюдали с помощью АСМ (Рис. 36). Дальнейшее повышение температуры до 45°C приводит к ещё большей дифференциации частиц на группы. Размеры частиц первой группы составляют 8,5–13,2 нм, а второй 126,4–181,9 нм. На долю первой группы при этом приходится почти 42%, а на долю второй – 58,1% общего числа частиц в растворе. Учитывая средний размер частиц первой группы (10,8 нм), можно сделать вывод, что она преимущественно состоит из молекул белка, не прореагировавших с фрагментами ДНК. Наибольшее количество частиц второй группы имеет размер 151,8 нм, что достаточно близко к длине используемых фрагментов ДНК, к которой присоединился Dps.

Нагревание раствора до 55°C, 60°C и 65°C не приводит к значительному перераспределению размеров частиц (Рис. 41С), хотя на

графике можно наблюдать максимум в районе 9200 нм, на долю которого приходится от 6,1% до 12,1% при различных температурах, что, возможно, является результатом агрегации не связавшихся с ДНК молекул белка. Аналогичные результаты были зарегистрированы при увеличении температуры до 70°C и 75°C. Однако не удалось зарегистрировать агрегаты молекул, имеющих радиус в области 1000 нм, как в случае чистого белка при действии аналогичной температуры (Рис. 40В). Вследствие чего была предпринята попытка найти температурный предел, при котором можно наблюдать необратимую денатурацию Dps в составе нуклеопротеидного комплекса.

Повышение температуры до 80°C (Рис. 41D) привело к формированию частиц размером около 10,99 нм, на долю которых приходилось 43,3% от всех частиц в растворе, а также к уменьшению размера более крупных частиц до 135,7 нм. Аналогичная тенденция наблюдалась и при 85°C, тогда как повышение температуры до 90°C привело к уменьшению фракции частиц размером 10,8 нм и формированию небольшого количества частиц размером 43,8 нм, а также значительного числа частиц размером 479,6 нм. Их появление можно объяснить агрегацией белка в составе нуклеопротеидов за счёт белок-белковых взаимодействий. Однако размер этих агрегатов почти в два раза меньше, чем при тепловой денатурации нативного белка при 70°C, что свидетельствует о том, что часть модулей Dps, участвующих в агрегации, были заняты молекулами ДНК.

Для более полного изучения конформационных изменений самой молекулы Dps, а также в составе нуклеопротеидного комплекса было проведено исследование при помощи метода флуоресцентной спектроскопии в диапазоне различных температур (Рис. 42). Как и ожидалось, растворы фрагментов ДНК обладали очень низким уровнем флуоресценции (примерно в 10 раз) и интерпретировать их было практически невозможно, поэтому сравнение проводили между кривыми испускания растворов чистого белка и нуклеопротеидного комплекса.

Для формирования нуклеопротеидных комплексов было выбрано несколько типов фрагментов ДНК (H, S и Y5-Y6-Y7), отличающихся структурой и нуклеотидным составом. Измерения проводились при длине волны возбуждения 280 нм, трёхкратном усилении и размере щели 8x5 в диапазоне температур 20–80°C с шагом в 5°C. Как было отмечено выше (см. раздел 3.2), максимум флуоресценции раствора белка Dps при комнатной температуре находится в области 332 нм, что характеризует положение остатков триптофана в белковой глобуле как в поверхностных слоях, так и во внутренней части молекулы.

Дальнейшее поэтапное нагревание образца до 55°C вызывает постепенное снижение интенсивности флуоресценции, что согласуется с представлением о температурном тушении флуоресценции. Однако при последующем повышении температуры резко снижается интенсивность флуоресценции, что, вероятно, вызвано тепловой денатурацией белковой молекулы Dps (Рис. 42). Полученные данные согласуются с результатами экспериментов по изучению конформации Dps при различных температурах методом динамического светорассеяния. Они свидетельствуют о том, что необратимая денатурация молекул нативного белка Dps наступает при температуре выше 55°C (Рис. 40).

Спектры флуоресценции, зарегистрированные для нуклеопротеидных комплексов в таком же диапазоне температур, имели некоторые отличия. Интенсивность флуоресценции нуклеопротеида из Dps и линейного фрагмента ДНК H была больше по сравнению с прочими комплексами. Максимум был сдвинут в сторону коротковолновой области, характерной для триптофанов, локализованных на поверхности белка. Повышение температуры также приводило к снижению интенсивности флуоресценции, но характер этого процесса отличался от такового для нативного белка. Тем не менее, при дальнейшем нагревании их формы и интенсивности спектров флуоресценции были достаточно похожи (Рис. 42).

Спектр, зарегистрированный для нуклеопротеидного комплекса, состоящего из Dps и линейного фрагмента S, при комнатной температуре имел интенсивность и форму, идентичную спектру, зарегистрированному для нативного белка (Рис. 42).

Однако при повышении температуры до 45°C его интенсивность резко снижалась, но при достижении 50°C снова наблюдалось увеличение интенсивности спектра. Такой перепад интенсивности флуоресценции может быть обусловлен высвобождением части олигомеров белка из нуклеопротеидного комплекса Dps-ДНК(S) или за счёт разрыва связей, стабилизирующих нуклеопротеид. Однако стоит отметить, что интенсивность флуоресценции данного комплекса при 80 градусах выше, чем у прочих образцов, что вместе с особенностями формы графика, а именно, наличием точки экстремума в области 40–50°C, вероятно, может говорить о большем сродстве данного фрагмента к белку Dps.

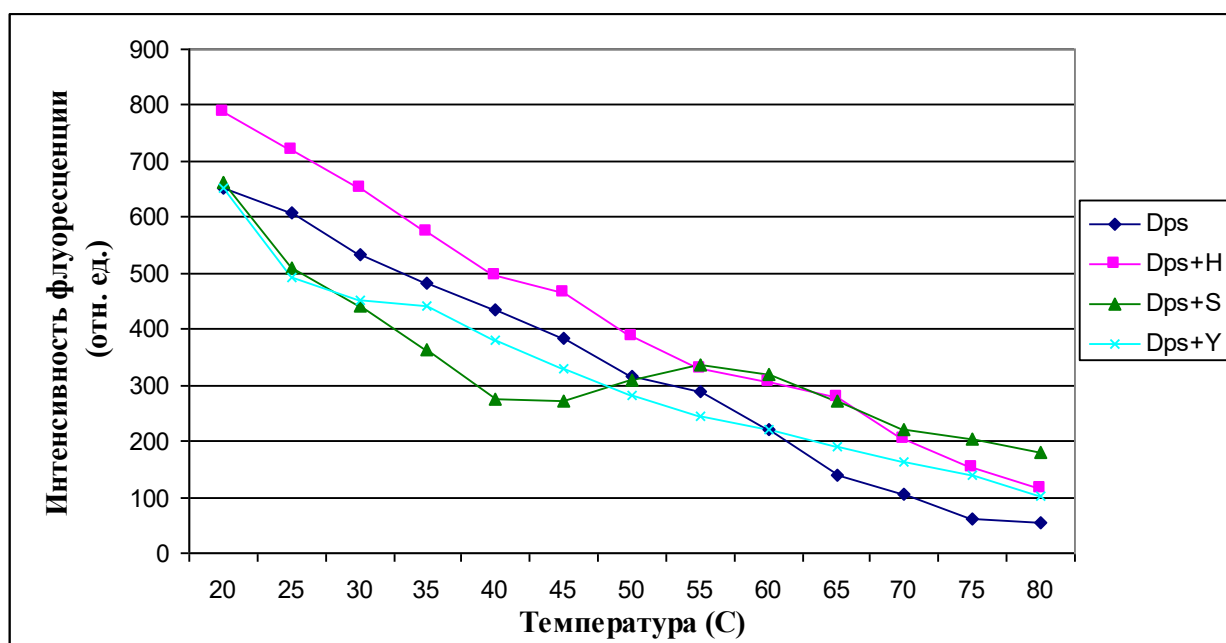


Рис. 42. Спектры флуоресценции белка Dps и его нуклеопротеидных комплексов при действии различных температур

Спектр, зарегистрированный для нуклеопротеидного комплекса Dps с искусственной самособирающейся ДНК Y5-Y6-Y7, при 20°C также имел максимум интенсивности, близкий к таковому у нативного белка, однако не имел чётко выраженного плато и был смещён в сторону коротковолновой области. Дальнейшее повышение температуры не приводило к резкому снижению интенсивности флуоресценции, но пропорциональность тушения флуоресценции в зависимости от температуры была выше.

Основываясь на полученных результатах, можно сделать вывод о том, что при формировании нуклеопротеидных комплексов Dps с различными по структуре и организации молекулами ДНК происходят неравнозначные конформационные изменения белковой глобулы. Это, скорее всего, связано с различными областями белковой молекулы, задействованными в формировании белок-белковых и ДНК-белковых контактов. Если это так, то и энергия связей, стабилизирующих нуклеопротеидный комплекс, будет отличаться. Поэтому на следующем этапе была предпринята попытка оценить константы связывания молекул Dps с линейными и искусственными молекулами ДНК при помощи метода поверхностного плазмонного резонанса.

Поскольку наиболее выраженные отличия в спектрах флуоресценции были зарегистрированы для нуклеопротеидных комплексов, полученных с линейным фрагментом ДНК Н и искусственной ДНК-структурой, собранной на основе олигонуклеотидов Y5-Y6-Y7, то в дальнейшем оценку констант связывания при формировании нуклеопротеидного комплекса с белком Dps проводили с использованием этих фрагментов ДНК. В Табл. 3 представлены полученные в этом отношении результаты.

Табл. 3. Результаты исследования кинетики формирования нуклеопротеидных комплексов

Образец	Концентрация аналита	Константа прямой реакции $k_{on} (s^{-1}M^{-1})$	Константа обратной реакции $k_{off} (s^{-1})$	Константа диссоциации $K_D (M)$	Критерий согласия χ^2
Dps-ДНК(Y5-Y6-Y7)	50 нМ	2,99E+5	4,43E-5	1,48E-10	4,98
DPS-ДНК(H)	30 нМ	3,49E+4	3,38E-4	9,70E-9	4,77

Результаты, полученные при помощи поверхностного плазмонного резонанса, свидетельствуют о том, что итоговые значения констант диссоциации отличаются на порядок и составляют: $1,48 \cdot 10^{-10}$ для разветвлённого фрагмента ДНК и $9,70 \cdot 10^{-9}$ для линейного фрагмента ДНК. При этом значение критерия согласия Пирсона χ^2 для этих экспериментов составляло 4,98 и 4,77 для разветвлённых и линейных фрагментов ДНК, соответственно.

Таким образом, аппроксимацию данных можно считать удовлетворительной для интерпретации полученных результатов. Графическое отображение полученных данных приведено на Рис. 43. Видно, что величина отклика для нуклеопротеидного комплекса, полученного с использованием разветвлённого фрагмента ДНК, более чем в 4 раза ниже, чем для нуклеопротеида, сформированного с линейной ДНК. При этом время достижения максимального значения отклика обеих реакционных систем практически одинаково. Тем не менее, после достижения максимального значения резонансный отклик нуклеопротеидного комплекса с линейными молекулами ДНК монотонно снижается, тогда как для комплекса Dps с разветвлённым фрагментом ДНК он остаётся практически неизменным, что, вероятно, говорит о большей энергетической стабильности последнего.

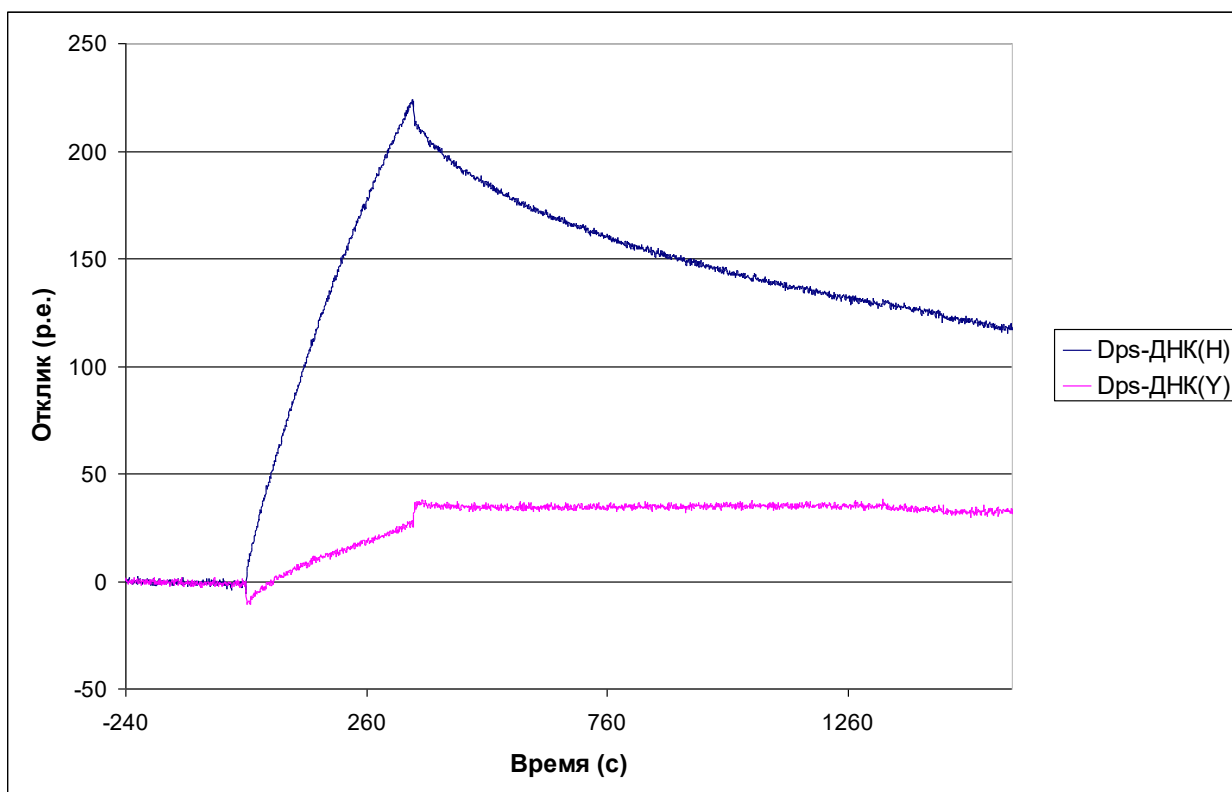


Рис. 43. Сенсограммы для комплексов Dps-ДНК(H), Dps-ДНК(Y5-Y6-Y7), полученные методом плазмонного резонанса; р.е. – резонансная единица

Сопоставление полученных результатов позволяет сделать вывод о том, что стабильность нуклеопротеидного комплекса, образованного Dps с разветвлённым фрагментом ДНК Y5-Y6-Y7, обладает большей стабильностью по сравнению с нуклеопротеидным комплексом, в состав которого входит линейный фрагмент ДНК(H).

Данные результаты достаточно хорошо согласуются с результатами, полученными нами ранее в экспериментах по оценке конформационных особенностей нуклеопротеидных комплексов белка Dps при воздействии температуры, а также с результатами, полученными методом атомно-силовой микроскопии. Это означает, что количество контактов, образованных белковой глобулой Dps с разветвлённым фрагментом ДНК, может быть больше, чем с линейным фрагментом.

Считается, что ДНК-связывающие области Dps [31], содержащие остатки лизина на N-конце каждого мономера, сгруппированы в триплеты

мономеров, а, следовательно, на поверхности белковой глобулы таких ДНК-связывающих областей может быть четыре. Таким образом, полученные результаты можно объяснить тем, что в отличие от линейных фрагментов ДНК, Y-подобная структура может быть более предпочтительной, так как в этом случае может сформироваться не два, а три точечных электростатических контакта, что обуславливает большую термодинамическую стабильность нуклеопротеидного комплекса.

Двадцать одна аминокислота N-концевого участка каждой субъединицы Dps неструктурирована, поэтому их положение не может быть чётко зафиксировано. Однако тринадцать аминокислотных остатков N-концевых участков мономеров Dps были идентифицированы с помощью рентгеноструктурного анализа [68] (Рис. 44В).

Таким образом, с одной стороны, очевидно, что неструктурированные N-концы Dps имеют достаточную протяжённость и гибкость для формирования электростатических взаимодействий как с отрицательно заряженной ДНК, так и с отрицательно заряженной поверхностью соседних молекул белка. С другой стороны, они могут находиться в близком контакте с поверхностью собственной белковой глобулы за счёт действия этих же сил, как это наблюдалось, например, для Dps *A. tumefaciens* [32], вследствие чего их невозможно идентифицировать в кристаллической структуре белка.

Однако способность Dps агрегировать и образовывать олигомерные структуры возрастает в присутствии ДНК, что сопровождается формированием крупных надмолекулярных структур. Размер таких нуклеопротеидных комплексов, как правило, достаточно велик для того, чтобы они были зарегистрированы в условиях электрофоретического фракционирования [12, 20, 60, 152, 159, 172].

Было высказано предположение, что случайное взаимодействие молекул Dps с ДНК ограничивает его подвижность в клетке, и, таким образом, способствует увеличению его количества в области локализации бактериальной ДНК, что, в свою очередь, стимулирует формирование белок-

белковых контактов. Это хорошо объясняет образование крупных агрегатов, зарегистрированных с помощью АСМ [12], но не может объяснить образование высокоупорядоченных двумерных структур, имеющих форму соты [71] и низкую способность свободных молекул Dps агрегировать между собой даже в очень высокой концентрации. Полученные результаты подчёркивают важность трёхсторонней симметрии в додекамере Dps.

Кроме того, можно предположить, что в отсутствие ДНК N-концевые участки Dps не полностью свободны и случайным образом закреплены на отрицательно заряженной поверхности белковой молекулы, а в присутствии ДНК они вовлекаются в формирование электростатических контактов. Для проверки такой возможности было проведено моделирование распределения электростатического потенциала на поверхности додекамера Dps с использованием программы Swiss-PdbViewer [70] (Рис. 44С).

При пороговых значениях -12 , $-1,5$ и 0 эВ поверхность молекулы была практически полностью отрицательно заряжена, что согласуется с литературными данными. Однако использование пороговых значений -12 , $-4,8$ и 0 эВ выявило три области на поверхности молекулы Dps, обладающих положительным зарядом (Рис. 44С).

При этом они были расположены на расстоянии, достаточном для снижения вероятности формирования случайных электростатических контактов между N-концевыми участками одной белковой глобулы, формируя, тем самым, идеальную платформу для электростатических взаимодействий с окружающими молекулами.

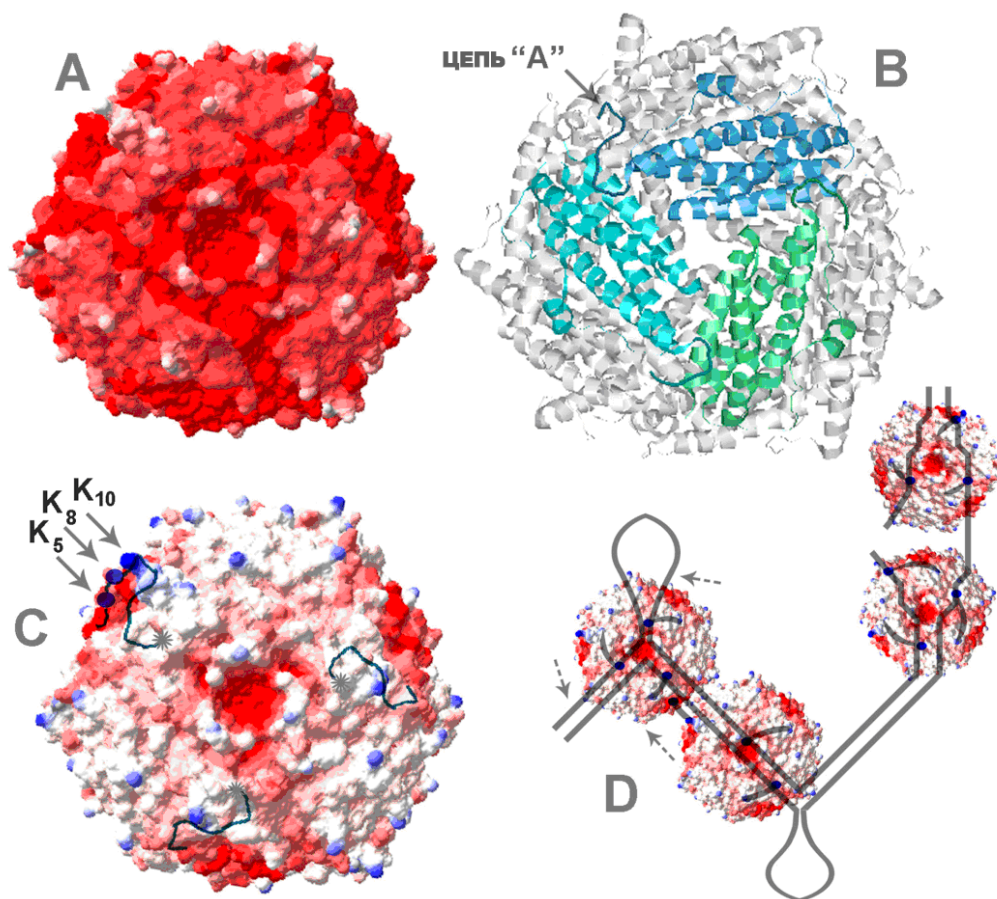


Рис. 44. Структура Dps, распределение электростатического потенциала и возможные способы формирования контактов Dps-ДНК и Dps-Dps. А – распределение электростатического потенциала на поверхности Dps, рассчитанное для пороговых значений -12 (красный цвет), $-1,5$ (белый цвет) и 0 эВ (синий цвет); С – распределение электростатического потенциала, рассчитанное для пороговых значений -12 (красный цвет), $-4,8$ (белый цвет) и 0 эВ (синий цвет); K_5 , K_8 , K_{10} – область локализации остатков лизина; серые звёздочки соответствуют концам неструктурированных участков полипептидных цепей; В – кристаллическая структура Dps [68], отражающая расположение центральной поры, сформированной из трёх мономеров Dps; D – схематическое изображение различных способов взаимодействия Dps с ДНК (петли, одноцепочечные разрывы) и ДНК-опосредованную димеризацию молекул Dps

В присутствии ДНК одна, две или три вершины, в которых локализованы триплеты мономеров, могут высвобождать

неструктурированные аминокислотные последовательности, содержащие аминокислотные остатки лизина, и, соответственно, несущие положительный заряд для формирования контакта с поверхностью соседних молекул Dps. При этом одним из необходимых условий является нахождение таких молекул на доступном расстоянии. Схематичное изображение таких способов взаимодействия приведено на Рис. 44D. Следовательно, можно сделать вывод о том, что присутствие ДНК стимулирует формирование белок-белковых взаимодействий за счёт перераспределения электростатического потенциала на поверхности глобулы Dps, что приводит к освобождению не связанных с ДНК N-концевых участков, богатых лизином.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Белок Dps является основным архитектурным фактором бактериального нуклеоида, который обеспечивает его конденсацию на стационарной фазе роста и защищает ДНК от воздействия различных стрессовых факторов. Это означает, что понимание механизмов, лежащих в основе его взаимодействия с ДНК, представляет собой важную фундаментальную задачу. Помимо этого, его способность окислять и накапливать ионы металлов, в частности железа, даёт возможность рассматривать Dps как перспективную молекулу наноразмерного диапазона.

Все использованные в работе фрагменты ДНК проявляли способность взаимодействовать с Dps, но эффективность этого взаимодействия оказалась неодинаковой, хотя считается, что Dps не содержит в своей структуре классических ДНК-связывающих модулей, способных распознавать конкретные нуклеотидные последовательности.

Для всех исследованных типов ДНК с помощью АСМ были зарегистрированы нуклеопротеидные комплексы с Dps и выявлены два новых способа взаимодействия: с концевыми участками ДНК и взаимодействие с точкой ветвления молекулы ДНК. При взаимодействии с линейными фрагментами ДНК, полученными в ПЦР (Рис. 36) или с плазмидными ДНК (Рис. 39), обработанными никазой, молекулы Dps обычно располагались либо на концах двойной спирали, либо в области одноцепочечного разрыва. Это, вероятно, указывает на то, что сродство к таким участкам у Dps выше, чем к внутренним участкам молекулы ДНК. Тем не менее, с помощью электрофоретического фракционирования смеси, полученной при самосборке искусственных разветвлённых ДНК, было выявлено, что Dps более эффективно взаимодействует с их триплексами, а не дуплексами (Рис. 38, дорожка 1–3). При этом анализ морфологии поверхности таких нуклеопротеидов с помощью АСМ выявил, что Dps преимущественно локализован на внутренней части таких Y-подобных

частиц ДНК (Рис. 37). Таким образом, можно предположить, что обе эти структуры имеют особенность, обеспечивающую повышенное сродство Dps к ним. Такой результат вполне закономерен, так как в додекамере Dps ДНК-связывающие N-концевые участки мономеров группированы в триплеты (Рис. 44В), следовательно, наличие трёх ветвей в структуре ДНК является стехиометрически более выгодным для формирования устойчивого нуклеопротеидного комплекса.

Способность Dps распознавать разветвлённые ДНК может иметь большее биологическое значение, чем взаимодействие с линейными ДНК. В настоящее время известна только одна система в *E.coli*, которая распознаёт разветвлённые Х-подобные структуры – «Структуры Холидея». Эти структуры формируются при рекомбинации и репарации ДНК и устраняются системой из трёх белков: RuvA, RuvB и RuvC [80]. При этом Y-подобные структуры могут формироваться практически в любом сегменте ДНК, содержащей как минимум два прямых нуклеотидных повтора [73], которые способны сформировать петли (Рис. 44D). Кроме того, в бактериальных геномах существуют тысячи таких мест, включая кластеры CRISPR, принадлежащие бактериальной «иммунной системе», и тандемные сайты связывания факторов транскрипции. В промоторной области самого гена *dps*, например, существуют четыре пары коротких прямых нуклеотидных повторов, два из которых перекрываются с первичным сайтом связывания Dps (Рис. 34).

Структурное состояние областей генома, содержащих тандемные повторы, должно быть под специальным контролем клеточных регуляторных систем. Однако специальных механизмов, эволюционно адаптированных под эти задачи, на сегодняшний день у бактерий не обнаружено, так что белок Dps может рассматриваться как один из участников данного процесса в клетке. Его сродство к Y-подобным, разветвлённым ДНК и способность вызывать конформационные перестройки двойной спирали (Рис. 37А, Рис. 39Е и Рис. 43) являются весомыми аргументами в пользу такого

предположения. Однако способность Dps агрегировать, которая весьма важна для конденсации генома в условиях стресса, может мешать точной работе, необходимой для контроля архитектуры в активном транскрибируемом геноме.

Существует ещё один аспект исследования закономерностей формирования нуклеопротеидных комплексов белком Dps с разветвлёнными структурами ДНК, на который стоит обратить внимание. Если в формировании наиболее прочного нуклеопротеида действительно участвуют три ветви ДНК, то при таком взаимодействии должно произойти максимальное приближение генетического материала к порам Dps, ведущим во внутреннюю полость белка, где содержится железо (Рис. 44С). В таком случае даже малейшая утечка токсичных ионов железа может быть опасна для целостности генома. Такая опасность действительно существует, так как полученные нами данные с использованием XANES-спектроскопии свидетельствуют о наличии во внутренней полости Dps ионов железа в различном зарядовом состоянии, что указывает на более сложный состав его неорганического ядра. Поэтому, вероятно, помимо защиты ДНК от различных повреждающих агентов и удаления токсичных ионов железа от генома Dps может участвовать в структурно-специфическом разрушении нуклеиновых кислот.

В любом случае, полученные данные свидетельствуют о том, что очищенный белок Dps из *E. coli* представляет собой стабильный додекамер с некоторой примесью более мелких олигомеров. Взаимодействуя с ДНК, Dps демонстрирует повышенное сродство к концевым участкам линейной молекулы ДНК, а в случае искусственных Y-подобных – высокое сродство к их точке ветвления. Если учитывать электростатическую природу взаимодействия Dps с ДНК, то нет причин исключать возможность образования им комплексов ещё и с РНК, при этом оказывая влияние на их функциональные характеристики. Например, было показано, что структуры, наподобие «коралловых рифов», сформированные белком Dps2 *M.*

Smegmatis, могут быть разрушены действием РНКазы А [66]. Таким образом, перечень выполняемых Dps функций может в данном случае быть даже шире, чем считается на сегодняшний день.

Наличие у Dps сродства к определённым ДНК-участкам имеет не только важную биологическую роль, но также и прикладную. Как видно из подглавы 1.6 данной работы, возможность насыщать ферритины, в частности Dps, самыми различными материалами, а также модифицировать его поверхность, находит самое разнообразное применение в технологии: при создании квантовых точек транзисторов, нанобатарей, в качестве реакторов для получения гомогенных частиц, а также в медицинских целях. Специфичность белка к определённым ДНК-участкам позволит создавать структуры на основе нуклеопротеидных комплексов с заданным расположением молекул. В рамках данной работы показана возможность проектирования элементарных двумерных самособирающихся структур ДНК и описаны особенности локализации Dps на поверхности таких молекул ДНК. Более глубокое понимание механизмов взаимодействия Dps с фрагментами ДНК позволит в перспективе создавать трёхмерные искусственные нуклеопротеидные конструкции с заданными свойствами.

ВЫВОДЫ

1. Впервые показано, что белок Dps обладает неодинаковым сродством к участкам ДНК различного нуклеотидного состава, что обусловлено их разной термодинамической стабильностью, а, следовательно, способностью к адаптивной изомеризации.

2. Выявлены два новых способа взаимодействия Dps с ДНК: с концевыми участками линейных ДНК и с точкой ветвления молекулы Y-подобной ДНК.

3. Разработана и впервые апробирована методика подготовки биологического образца для проведения сверхвысоковакуумных синхротронных исследований в области мягкого рентгеновского излучения.

4. Доказано присутствие в составе неорганического ядра Dps *E.coli* ионов железа с различным зарядовым состоянием Fe^{3+} и Fe^{2+} в тетра- и октаэдрическом окружении атомами кислорода.

5. Предложена методика создания элементарных искусственных самособирающихся разветвлённых структур ДНК, позволяющих управляемо иммобилизовать на них молекулу белка Dps.

6. Исследованы кинетические параметры нуклеопротеидных комплексов, сформированных Dps с различными структурами ДНК, и установлено, что комплексы Dps с Y-подобными структурами ДНК более прочные.

7. Предложена модель взаимодействия белка Dps с разветвлёнными участками бактериального генома, учитывающая возможность формирования максимального числа контактов олигомера Dps с ДНК.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антипов С.С., Курганов К.В., Чемерис Н.К., Озолинь О.Н. Бактериоферритин как биосенсор и наноструктура // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2007 – т.3. – с. 40–44.
2. Веденкина Н.С. Триптофановая флуоресценция белков в растворах. Положение максимума спектра флуоресценции // Молекулярная биология. – 1970. – т. 4 (5). – с. 743–748.
3. Никадоров В.В. Неорганические полупроводники в биологических и биохимических системах: биосинтез, свойства и фотохимическая активность // Успехи биологической химии. – 2000. – т.40. – с. 357–396.
4. Покусаева В.О., Антипов С.С., Швырева У.С., Тутукина М.Н., Озолинь О.Н. Суперпродукция, выделение и очистка функционально активного бактериоферритина Dps *E.Coli* // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2012. – т.12(6). – с.1011–1017.
5. Пучков Е. О. Флуоресцентные репортёры и их репортажи // Химия и жизнь - XXI век. – 2014. – № 9. – с. 8–13.
6. Сотников Д. В., Жердев А.В., Дзантиев Б. Б. Детекция межмолекулярных взаимодействий, основанная на регистрации поверхностного плазмонного резонанса // Успехи биологической химии. – 2015. – т.55. – с. 391–420.
7. Статическая Магнитно-Силовая Микроскопия [<http://www.ntmdt-si.ru/spm-principles/view/dc-mfm>]
8. Тутукина М. Н., Шавкунов К. С., Масулис И. С., Озолинь О. Н. Антисмысловая транскрипция в локусе hns *Escherichia coli* // Молекулярная биология. – 2010. – т. 44. – с. 497–506.
9. Alaleona F., Franceschini, S., Ceci P., Iari A. and Chiancone E. *Thermosynechococcus elongatus* DpsA binds Zn(II) at a unique three histidinecontaining ferroxidase center and utilizes O₂ as iron oxidant with very

high efficiency, unlike the typical Dps proteins // *The FEBS Journal*. – 2010. – 277(4). – p. 903–917.

10. Allen M., Willits D., Young M., Douglas T. Constrained synthesis of cobalt oxide nanomaterials in the 12-subunit protein cage from *Listeria innocua* // *Inorganic Chemistry*. – 2003. – Vol. 42(20). – p. 6300–6305.

11. Allen M., Willits D., Mosolf J., Young M., Douglas T. Protein cage constrained synthesis of ferrimagnetic iron oxide nanoparticles // *Advanced Materials*. – 2002. – Vol. 14(21). – p. 1562–1565.

12. Almiron M., Link A. J., Furlong D. and Kolter R. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli* // *Genes & Development*. – 1992. – №6. – p. 2646–2654.

13. Altuvia S., Almiron M., Huisman G., Kolter R., Storz G. The *dps* promoter is activated by OxyR during growth and by IHF and σ^S in stationary phase // *Molecular Microbiology*. – 1994. – Vol. 13(2). – p. 265–272.

14. Andrews S. C., Robinson A. K., Rodriguez-Quinones F. Bacterial iron homeostasis // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2003. – №27. – p. 215–237.

15. Andrews S.C. Iron storage in bacteria // *Advances in Microbial Physiology*. – 1998. – Vol. 40. – p. 281–351.

16. Andrews S. C. The ferritin-like superfamily: evolution of the biological iron storeman from a rubrerythrin-like ancestor // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2010. – Vol. 1800(8). – p. 691–705.

17. Arnold A.R., Barton J. K. DNA protection by the bacterial ferritin Dps via DNA charge transport // *Journal of the American Chemical Society*. – 2013. – Vol. 135(42). – p. 15726–15729.

18. Azam T.A., Hiraga S., Ishihama A. Two types of localization of the DNA-binding proteins within the *Escherichia coli* nucleoid // *Genes to Cells*. – 2000. – Vol. 5(8). – p.613–626.

19. Azam T.A., Ishihama A. Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli* // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – Vol. 274(46). – p. 33105 – 33113.

20. Azam T.A., Iwata A., Nishimura A., Ueda S., Ishihama A. Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid // *Journal of Bacteriology*. –1999. – Vol. 181(20). – p. 6361–6370.
21. Bellapadrona G., Ardini M., Ceci P., Stefanini S. and Chiancone E. Dps proteins prevent Fenton-mediated oxidative damage by trapping hydroxyl radicals within the protein shell // *Free Radical Biology & Medicine*. – 2010. – 48(2). – p. 292–297.
22. Bellapadrona G., Stefanini S., Zamparelli C., Theil E. C., Chiancone E. Iron translocation into and out of *Listeria innocua* Dps and size distribution of the protein-enclosed nanomineral are modulated by the electrostatic gradient at the 3-fold “ferritin-like” pores // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2009. –Vol. 284(28). – p. 19101–19109.
23. Bou-Abdallah F. The iron redox and hydrolysis chemistry of the ferritins // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2010. – Vol. 1800, p. 719–731.
24. Bozzi M., Mignogna G., Stefanini S., Barra D., Longhi C., Valenti P., Chiancone E. A novel non-heme iron-binding ferritin related to the DNA-binding proteins of the Dps family in *Listeria innocua* // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1997. – Vol. 272(6). – p. 3259–3265.
25. Bsat N., Chen L., Helmann J. D. Mutation of the *Bacillus subtilis* alkyl hydroperoxide reductase (ahpCF) operon reveals compensatory interactions among hydrogen peroxide stress genes // *Journal of Bacteriology*. – 1996. – Vol. 178(22). – p. 6579–6586.
26. Bui H., Onodera C., Kidwell C., Tan Y., Graugnard E., Kuang W., Lee J., Knowlton W.B., Yurke B., Hughes W.L. Programmable periodicity of quantum dot arrays with DNA origami nanotubes // *Nano Letters*. – 2010. – Vol. 10(9). – p. 3367–3372.
27. Bulte J. W. M., Douglas T., Mann S., Frankel R. B., Moskowitz B. M., Brooks R. A., Baumgarner C. D., Vymazal J., Frank J. A. Magnetoferritin: characterization of a novel superparamagnetic MR contrast agent // *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. – 1994. – Vol. 4(3). – p. 497–505.

28. Calhoun L. N., Kwon Y. M. Structure, function and regulation of the DNA-binding protein Dps and its role in acid and oxidative stress resistance in *Escherichia coli*: a review // Journal of Applied Microbiology. – 2011. – Vol. 110(2). – p. 375–386.
29. Calhoun L.N., Kwon Y.M. The ferritin-like protein Dps protects *Salmonella enterica serotype Enteritidis* from the Fenton-mediated killing mechanism of bactericidal antibiotics // International Journal of Antimicrob Agents. – 2011. – Vol. 37(3). – p. 261–5.
30. Carrondo M. Ferritins, iron uptake and storage from the bacterioferritin viewpoint // The EMBO Journal. – 2003. – Vol. 22(9). – p. 1959–1968.
31. Ceci P., Cellai S., Falvo E., Rivetti C., Rossi G. L., Chiancone E. DNA condensation and self-aggregation of *Escherichia coli* Dps are coupled phenomena related to the properties of the N-terminus // Nucleic Acids Research. – 2004. – Vol. 32(19). – p. 5935–5944.
32. Ceci P., Ilari A., Falvo E., Chiancone E. The Dps protein of *Agrobacterium tumefaciens* does not bind to DNA but protects it toward oxidative cleavage: x-ray crystal structure, iron binding, and hydroxyl-radical scavenging properties // The Journal of Biological Chemistry. – 2003. – Vol. 278(22). – p. 20319–20326.
33. Ceci P., Ilari A., Falvo E., Giangiacomo L., Chiancone E. Reassessment of protein stability, DNA binding, and protection of *Mycobacterium smegmatis* Dps // The Journal of Biological Chemistry. – 2005. – Vol. 280(41). – p. 34776–34785.
34. Ceci P., Mangiarotti L., Rivetti C., Chiancone, E. The neutrophil-activating Dps protein of *Helicobacter pylori*, HP-NAP, adopts a mechanism different from *Escherichia coli* Dps to bind and condense DNA // Nucleic Acids Research. – 2007. – Vol. 35(7). – p. 2247–2256.
35. Ceolin M., Galvez N., Dominguez-Vera J.M. Thermal induced phase transitions and structural relaxation in apoferritin encapsulated copper nanoparticles // Physical Chemistry Chemical Physics. – 2008. – Vol. 10(29). – p. 4327–4332.

36. Chen J., Seeman N.C. Synthesis from DNA of a molecule with the connectivity of a cube // *Nature*. – 1991. – Vol. 350(6319). – p. 631–633.
37. Chen L., Helmann J.D. *Bacillus subtilis* MrgA is a Dps(PexB) homologue: evidence for metalloregulation of an oxidative-stress gene // *Molecular Microbiology*. – 1995. – №18(2). – p. 295–300.
38. Chiancone E., Ceci P., Ilari A., Ribacchi F. and Stefanini S. Iron and proteins for iron storage and detoxification // *BioMetals*. – 2004. – №17, p. 197–202.
39. Chiancone E., Ceci P. The multifaceted capacity of Dps proteins to combat bacterial stress conditions: detoxification of iron and hydrogen peroxide and DNA binding // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2010. – Vol. 1800(8). p. 798 – 805.
40. Chu S. H, Choi S. H., Kim J. W., Lillehei P. T., Park Y., King G. C., Elliott J. R. Multilayer Ferritin Array for Bionanobattery // US Patent. – US 2007/0134552 A1. – 2007.
41. Crichton R.R., Declercq J.P. X-ray structures of ferritins and related proteins // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2010. – Vol. 1800. p. 706–718.
42. Cooksley C., Jenks P.J., Green A., Cockayne A., Logan R.P., Hardie K.R. NapA protects *Helicobacter pylori* from oxidative stress damage, and its production is influenced by the ferric uptake regulator // *Journal of Medical Microbiology*. – 2003. – Vol.52(6). – p. 461–469.
43. Cvetkovic A., Menon A. L., Thorgersen M. P., Scott J. W., Poole II F. L., Jenney Jr, F. E., Lancaster W. A., Praissman J. L., Shanmukh S., Vaccaro B. J. et al. Microbial metalloproteomes are largely uncharacterized // *Nature*. – 2011. – Vol. 466(7303). – p. 779–782.
44. Davis B.J. Disc electroforesis II. Method and application to human serum protein // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1964. – Vol. 121. – p. 404–427.
45. Delius M., Leigh D. A. Walking molecules // *Chemical Society Reviews*. – 2011. – Vol. 40(7). – p. 3656–3676.

46. Dersch P., Schmidt K., Bremer E. Synthesis of the *Escherichia coli* K-12 nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS is subjected to growth-phase control and autoregulation // *Molecular Microbiology*. – 1993/ – Vol. 8(5). – p. 875–889.
47. Diederich F., Gomes-Lopez M. Supramolecular fullerene chemistry // *Chemical Society Reviews*. – 1999. – Vol. 28. – p. 263–277.
48. Domashevskaya E.P., Storozhilov S.A., Turishchev S.Y., Kashkarov V.M., Terekhov V.A., Stognej O.V., Kalinin Y. E., Molodtsov S.L. XANES and USXES investigations of interatomic interaction at the grain boundaries in nanocomposites $(\text{Co}_{41}\text{Fe}_{39}\text{B}_{20})_x(\text{SiO}_2)_{1-x}$ // *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*. – 2007. – Vol. 156. – p. 180 – 185.
49. Dorman C.J., Kane K.A. DNA bridging and antibridging: a role for bacterial nucleoid-associated proteins in regulating the expression of laterally acquired genes // *FEMS microbiology reviews*. – 2009. – Vol. 33(3). – p. 587–92.
50. Dorman C.J. Nucleoid-associated proteins and bacterial physiology // *Advances in Applied Microbiology*. – 2009. – Vol .67. – p. 47–64.
51. Douglas T., Bulte J. W. M., Dickson D. P. E., Frankel R. B., Pankhurst Q. A., Moskowitz B. M., Mann S. Inorganic-protein Interactions in the Synthesis of a Ferrimagnetic Nanocomposite // *American Chemical Society*. – 1995. – Vol. 585(3). – p. 19–28.
52. Douglas T., Stark V.T. Nanophase cobalt oxihydroxide mineral synthesized within the protein cage of ferritin // *Inorganic Chemistry*. – 2000. – Vol. 39(8). – p. 1828–1830.
53. Douglas T., Dickson D.P.E., Betteridge S., Charnock J., Garner C.D., Mann S. Synthesis and structure of and iron(III) sulfide–ferritin bioinorganic nanocomposite // *Science*. – 1995. – Vol. 269(5220). – p.54–57.
54. Durham K. A., Bullerjahn G. S. Immunocytochemical localization of the stress-induced DpsA protein in the cyanobacterium *Synechococcus sp. strain PCC 7942* // *Journal of Basic Microbiology*. – 2002. – 42(6). – p. 367–372.

55. Endo M., Sugiyama H. Chemical approaches to DNA nanotechnology // *ChemBioChem*. – 2009. – Vol. 10(15). – p. 2420–2443.
56. Ensign D., Young M., Douglas T. Photocatalytic synthesis of copper colloids from Cu(II) by the ferrihydrite core of ferritin // *Inorganic Chemistry*. – 2004. – Vol. 43(11). – p. 3441–3446.
57. Erben C. M., Goodman R. P., Turberfield A. J. Single-molecule protein encapsulation in a rigid DNA cage // *Angewandte Chemie*. – 2006. – Vol. 45(44). – p. 7417–7417.
58. Erbil A., Cargill III G.S., Frahm R., Boehme R.F. Total-electron-yield current measurements for near-surface extended x-ray-absorption fine structure // *Physical review B: condensed matter*. – 1988. – Vol. 37(5). – p. 2450 – 2464.
59. Franceschini S., Ceci P., Alaleona F., Chiancone E., Ilari A. Antioxidant Dps protein from the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongates* // *The FEBS Journal*. – 2006. – Vol. 273(21). – p. 4913-4928.
60. Frenkiel-Krispin D., Minsky A. Nucleoid organization and the maintenance of DNA integrity in *E. coli*, *B. subtilis* and *D. radiodurans* // *Journal of Structural Biology*. – 2006. – Vol. 156(2). – p. 311–319.
61. Frenkiel-Krispin D., Ben-Avraham I., Englander J., Shimoni E., Wolf S.G., Minsky A. Nucleoid restructuring in stationary-state bacteria // *Molecular Microbiology*. – 2004. – Vol. 51(2). – p. 395–405.
62. Frenkiel-Krispin D., Levin-Zaidman S., Shimoni E., Wolf S.G., Wachtel E.J., Arad T., Finkel S.E., Kolter R., Minsky A. Regulated phase transitions of bacterial chromatin: a non-enzymatic pathway for generic DNA protection // *The EMBO Journal*. – 2001. – Vol. 20(5). – p. 1184–1191.
63. Gaastra W. Chemical cleavage (Maxam and Gilbert) for DNA sequence determination // *Methods on molecular biology (Clifton N.J.)*. – 1985. – Vol. 2. – p. 333–341.
64. Galvez N., Fernandez B., Valero E., Sanchez P., Cuesta R., Dominguez-Vera J.M. Apoferritin as a nanoreactor for preparing metallic nanoparticles // *Comptes Rendus Chimie*. – 2008. – Vol. 11(10). – p. 1207–1212.

65. Galvez N., Sanchez P., Dominguez-Vera J.M., Soriano-Portillo A., Clemente-Leon M., Coronado E. Apoferritin-encapsulated Ni and Co superparamagnetic nanoparticles // *Journal of Materials Chemistry* – 2006. – Vol. 16. – p. 2757–2761.
66. Ghatak P., Karmakar K., Kasetty S., Chatterji D. Unveiling the role of Dps in the organization of mycobacterial nucleoid // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6(1). – e16019.
67. Goodman R.P., Berry R.M., Turberfield A.J. The single-step synthesis of a DNA tetrahedron // *Chemical Communications*. – 2004. – №12. – p. 1372–1373.
68. Grant R. A., Filman D. J., Finkel S. E., Kolter R. and Hogle, J. M. The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA // *Nature Structural Biology*. – 1998. – Vol. 5. – p. 294–303.
69. Grunwaldt J.D., Baiker A. *In situ* spectroscopic investigation of heterogeneous catalysts and reaction media at high pressure // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2005. – Vol. 20. – p. 3526–3539.
70. Guex N., Peitsch M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling // *Electrophoresis*. – 1997. – Vol. 18(15). – p. 2714–2723.
71. Gupta S., Chatterji D. Bimodal protection of DNA by *Mycobacterium smegmatis* DNA-binding protein from stationary phase cells // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278. – p. 5235–5241.
72. Haikarainen T., Tsou C. C., Wu J. J., Papageorgiou A. C. Structural characterization and biological implications of di-zinc binding in the ferroxidase center of *Streptococcus pyogenes* Dpr // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2010. – 398(3). – p. 361–365.
73. Halsey T.A., Vazquez-Torres A., Gravidahl D.J., Fang F.C., Libby S.J. The ferritin-like Dps protein is required for *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* oxidative stress resistance and virulence // *Infection and Immunity*. – 2004. – Vol. 72(2). – p. 1155–1158.

74. Harrison P. M., Hempstead P. D., Artymiuk P. J. Andrews S. C. Structure-function relationships in the ferritins // *Metal Ions in Biological Systems*. – 1998. – Vol. 35. – p. 435–477.
75. Harrison P.M., Arosio P. The ferritins, molecular properties, iron storage and cellular regulation // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1996. – Vol. 1275(3). – p. 161–203.
76. Hemmilä I., Mikkala V. M. Time-resolution in fluorometry technologies, labels, and applications in bioanalytical assays // *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. – 2001. – Vol. 38(6). – p. 441–519.
77. Hikono T., Uraoka Y., Fuyuki T., Yamashita I. Novel method for making nano-dot arrays using a cage-like protein // *Japanese Journal of Applied Physics*. – 2003. – Vol. 42(L398).
78. Ilari A., Ceci P., Ferrari D., Rossi G. L., Chiancone E. Iron incorporation into *Escherichia coli* Dps gives rise to a ferritin-like microcrystalline core // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Vol. 277(40). – p. 37619–37623.
79. Ilari A., Stefanini S., Chiancone E. and Tsernoglou D. The dodecameric ferritin from *Listeria innocua* contains a novel intersubunit iron-binding site // *Nature Structural Biology*. – 2000. – №7. p. 38–43.
80. Ingleston S.M., Dickman M.J., Grasby J.A., Hornby D.P., Sharples G.J., Lloyd R.G. Holliday junction binding and processing by the RuvA protein of *Mycoplasma pneumoniae* // *European Journal of Biochemistry*. – 2002. – Vol. 269(5). – p. 1525 – 1533.
81. Ishikawa T., Mizunoe Y., Kawabata S., Takade A., Harada M., Wai S.N., Yoshida S. The iron-binding protein Dps confers hydrogen peroxide stress resistance to *Campylobacter jejuni* // *Journal of Bacteriology*. – 2003. – Vol. 185(3). – p. 1010–1017.
82. Iwahori K., Yoshizawa K., Muraoka M., Yamashita I., Fabrication of ZnSe nanoparticles in the apoferritin cavity by designing a slow chemical reaction system // *Inorganic Chemistry*. – 2005. – Vol. 44(18). – p. 6393–6400.

83. Iwahori K, Yamashita I. Size-controlled one-pot synthesis of fluorescent cadmium sulfide semiconductor nanoparticles in an apoferritin cavity // *Nanotechnology*. – 2008. – Vol. 19(49).
84. Jääskeläinen A., Soukka T., Lamminmäki U., Korpimäki T., Virta M. Development of a Denaturation/ Renaturation-Based Production Process for Ferritin Nanoparticles // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2009. – Vol. 102(4). – p. 1012–1024.
85. Jeong K. C., Hung K. F., Baumler D. J., Byrd J. J., Kaspar C. W. Acid stress damage of DNA is prevented by Dps binding in *Escherichia coli* O157:H7 // *BMC Microbiology*. – 2008. – №8. – p. 181.
86. Jeong G. H., Yamazaki A., Suzuki S., Yoshimura H., Kobayashi Y., Homma Y. Cobalt-filled apoferritin for suspended single-walled carbon nanotube growth with narrow diameter distribution // *Journal of the American Chemical Society*. – 2005. – Vol. 127(23). – p. 8238-8239.
87. Kanekiyo M., Wei C., Yassine H., McTamney P., Boyington J., Whittle J., Rao S., Kong W., Wang L., Nabel G. Self-assembling influenza nanoparticle vaccines elicit broadly neutralizing H1N1 antibodies // *Nature*. – 2013. – Vol. 499(7456). – p. 102–106.
88. Kang S., Jolley C., Liepold L., Young M., Douglas T. From metal binding to nanoparticle formation: monitoring biomimetic iron oxide synthesis within protein cages using mass spectrometry // *Angewandte Chemie*. – 2009. – Vol. 48(26). – p. 4772–4776.
89. Kang S., Lucon J., Varpness Z., Liepold L., Uchida M., Willits D., Young M., Douglas T. Monitoring Biomimetic Platinum Nanocluster Formation Using Mass Spectrometry and Cluster-Dependent H₂ Production // *Angewandte Chemie*. – 2008. – Vol. 47(41). – p. 7845–7848.
90. Katz E., Willner I. Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: synthesis, properties, and applications // *Angewandte Chemie*. – 2004. – Vol. 43(45). – p. 6042–6108.

91. Kaur A. P., Wilks A. Heme inhibits the DNA binding properties of the cytoplasmic heme binding protein of *Shigella dysenteriae* (ShuS) // *Biochemistry*. – 2007. – Vol. 46(11). – p. 2994–3000.
92. Kim J.W., Choi S., Lillehei P. T. Electrochemically controlled reconstitution of immobilized ferritins for bioelectronics applications // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2006. – Vol. 601 (1). – p. 8–16.
93. Kim J.W., Yoshimura S.H., Hizume K., Ohniwa R.L., Ishihama A., Takeyasu K. Fundamental structural units of the *Escherichia coli* nucleoid revealed by atomic force microscopy // *Nucleic Acids Research*. – 2004. – Vol. 32(6). – p. 1982–1992.
94. Kirimura H., Uraoka Y., Fuyuki T., Okuda M., Yamashita I. // Study of lowtemperature crystallization of amorphous Si films obtained using ferritin with Ni nanoparticles // *Appl. Phys. Lett.* – 2005. – Vol. 86(28).
95. Klem M.T., Mosolf J., Young M., Douglas T. Photochemical mineralization of europium, titanium, and iron oxyhydroxide nanoparticles in the ferritin protein cage // *Inorganic Chemistry*. – 2008. – Vol. 47(7). – p. 2237–2239.
96. Kramer R.M., Sowards L.A., Pender M.J., Stone M.O., Naik R.R. Constrained iron catalysts for single-walled carbon nanotube growth // *Langmuir*. – 2005. – Vol. 21(18). – p. 8466–8470.
97. Kramer R.M., Li C., Carter D.C., Stone M.O., Naik R.R. Engineered protein cages for nanomaterial synthesis // *Journal of the American Chemical Society*. – 2004. – Vol. 126(41). – p. 13282–13286.
98. Kumagai S., Yoshii S., Yamada K., Matsukawa N., Iwahori K., Yamashita I. Electrostatic placement of nanodots onto silicon substrate using ferritin protein supramolecules with control of electrostatic Interaction in solution // *Japanese Journal of Applied Physics*. – 2006. – Vol. 45(10B). – p. 8311–8316.
99. Kumagai S., Yoshii S., Yamada K., Matsukawa N., Fujiwara T., Iwahori K., Yamashita I. Electrostatic placement of single ferritin molecules // *Applied Physics Letters*. – 2006. – Vol. 88.

100. Kumagai S., Ono T., Yoshii S., Kadotani A., Tsukamoto R., Nishio K., Okuda M., Yamashita I. Position-controlled vertical growths of individual carbon nanotubes using a cage-shaped protein // *Applied Physics Express*. – 2010. – Vol. 3(1).
101. Lacour S., Landini P. Sigma S-dependent gene expression at the onset of stationary phase in *Escherichia coli*: function of sigma S-dependent genes and identification of their promoter sequences // *Journal of Bacteriology*. – 2004. – Vol. 186(21). – p. 7186–7195.
102. Lawson D.M., Artymiuk P.J., Yewdall S.J., Smith J.M., Livingstone J.C., Treffry A., Luzzago A., Levi S., Arosio P., Cesareni G. et al. Solving the structure of human H ferritin by genetically engineering intermolecular crystal contacts // *Nature*. – 1991. – Vol. 349(6309). – p. 541–544.
103. Lewin A., Moore G.R., Le Brun N.E. Formation of protein-coated iron minerals // *Dalton Transactions*. – 2005. – Vol. 22. – p. 3597–3610.
104. Li M., Wong K.K., Mann S. Organization of inorganic nanoparticles using Biotin-Streptavidin connectors // *Chemistry of Materials*. – 1999. – Vol. 11(1). – p. 23–26.
105. Li Y., Kim W., Zhang Y., Rolandi M., Wang D., Dai H. Growth of single-walled carbon nanotubes from discrete catalytic nanoparticles of various sizes // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2001. – Vol. 105(46). – p. 11424–11431.
106. Lin X., Xie J., Niu G., Zhang F., Gao H., Yang M., Quan Q., Aronova M., Zhang G., Lee S., Leapman R., Chen X. Chimeric ferritin nanocages for multiple function loading and multimodal imaging // *Nano Letters*. – 2011. – Vol. 11(2). – p. 814–819.
107. Lin X., Xie J., Zhu L., Lee S., Niu G., Ma Y., Kim K., Chen X. Hybrid Ferritin Nanoparticles as Activatable Probes for Tumor Imaging // *Angewandte Chemie*. – 2011. – Vol. 50(7). – p. 1569–1572.
108. Liu D., Wang M., Deng Z., Walulu R., Mao C. Tensegrity: Construction of rigid DNA triangles with flexible four-arm DNA junctions // *Journal of the American Chemical Society*. – 2004. – Vol. 126(8). – p. 2324–2325.

109. Liu G., Wu H., Dohnalkova A., Lin Y. Apoferritin-templated synthesis of encoded metallic phosphate nanoparticle tags // *Analytical Chemistry*. – 2007. – Vol. 79(15). – p. 5614–5619.
110. Liu H., Liu D. DNA nanomachines and their functional evolution // *Chemical Communications*. – 2009. – Vol. 19. – p. 2625–2639.
111. Liu J., Geng Y., Pound E., Gyawali S., Ashton J.R., Hickey J., Woolley A.T., Harb J.N. Metallization of branched DNA origami for nanoelectronic circuit fabrication // *ACS Nano*. – 2005. – Vol. 5(3). – p. 2240–2247.
112. Liu X., Theil E. C. Ferritins: dynamic management of biological iron and oxygen chemistry // *Accounts of Chemical Research*. – 2005. – Vol. 38(3). – p. 167–175.
113. Liu Y., Lin C., Li H., Yan H. Aptamer-directed self-assembly of protein arrays on a DNA nanostructure // *Angewandte Chemie*. – 2005. – Vol. 24(48). – p. 4333–4338.
114. Lund K., Liu Y., Lindsay S., Yan, H. Self-assembling a molecular pegboard // *Journal of American Chemical Society*. – 2005. – Vol. 137(50). – p. 17606–17607.
115. Machulin A.V., Deriusheva E.I., Iunusova A.K., Zheleznaia L.A., Serdiuk I.N. Investigation of site-specific DNA binding with nicking endonuclease Nt.BspD6I at single molecule level by atomic force microscopy // *Biophysics*. – 2012. – Vol. 57(3). – p. 314–317.
116. Mackle P., Charnock J. M., Garner C. D., Meldrum F. C., Mann S. Characterisation of the Manganese Core of Reconstituted Ferritin by X-ray Absorption Spectroscopy // *Journal of American Chemical Society*. – 1993. – Vol. 115(18). – p. 8471–8472.
117. Majzlan J., Navrotsky A., Schwertmann U. Thermodynamics of iron oxides: part III. Enthalpies of formation and stability of ferrihydrite ($\sim\text{Fe}(\text{OH})_3$), schwertmannite ($\sim\text{FeO}(\text{OH})_{3/4}(\text{SO}_4)_{1/8}$), and $\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$ // *Geochimica et Cosmochimica Acta*. – 2004. – Vol. 68(5). – p. 1049–1059.

118. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual // New York. Cold Spring Harbor Laboratory. – 1982. – pp. 545.
119. Mann S. Molecular tectonics in biomineralization and biomimetic materials chemistry // Nature. – 1993. – Vol. 365(6446). – p. 499–505.
120. Marken F., Patel D., Madden C. E., Millward R. C., Fletcher S. The direct electrochemistry of ferritin compared with the direct electrochemistry of nanoparticulate hydrous ferric oxide // New Journal of Chemistry. – 2002. – Vol. 26(2). – p. 259–263.
121. Martinez A., Kolter R. Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps // Journal of Bacteriology. – 1997. – Vol. 179(16). – p. 5188–5194.
122. Massover W.H. Ultrastructure of Ferritin and Apoferritin: A Review // Micron. – 1993. – Vol. 24. – p. 389–486.
123. Mathieu F., Liao S., Kopatsch J., Wang T., Mao C., Seeman N.C. Six-helix bundles designed from DNA // Nano Letters. – 2005. – Vol. 5(4). – p. 661–665.
124. Matzanke B. F., Ecker D. J., Yang T. S., Huynh B. H., Muller G., Raymond K. N. *Escherichia coli* iron enterobactin uptake monitored by Mössbauer spectroscopy // Journal of Bacteriology. – 1986. – Vol. 167(2). – p. 674–680.
125. Matzanke B. F., Muller G. I., Bill E., Trautwein A. X. Iron metabolism of *Escherichia coli* studied by Mössbauer spectroscopy and biochemical methods // European Journal of Biochemistry. – 1989. – Vol. 183(2). – p. 371–379.
126. Maune H. T., Han S., Barish R.D., Bockrath M., Goddard III W.A., Rothmund P.W.K., Winfree E. Self-assembly of carbon nanotubes into two-dimensional geometries using DNA origami templates // Nature Nanotechnology. – 2010. – Vol. 5. – p. 61–66.
127. Meldrum F.C., Heywood B.R., Mann S., Magnetoferritin: in vitro synthesis of a novel magnetic protein // Science. – 1992. – Vol. 257(5069). – p. 522–523.
128. Meldrum F.C., Douglas T., Levi S., Arosio P., Mann S. Reconstitution of manganese oxide cores in horse spleen and recombinant ferritins // Journal of Inorganic Biochemistry. – 1995. – Vol. 58(1). – p. 59–68.

129. Meldrum F.C., Wade V.J., Nimmo D.L., Heywood B.R., Mann S. Synthesis of inorganic nanophase materials in supramolecular protein cages // *Nature*. – 1991. – Vol. 349(6311). – p. 684–687.
130. Minsky A., Shimoni E., Frenkiel-Krispin D. Stress, order and survival // *Nature reviews. Molecular cell biology*. – 2002. – Vol. 3(1). – p. 50–60.
131. Mirkin C. A., Letsinger R. L., Mucic R. C., Storhoff, J. J. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials // *Nature*. – 1996. – Vol. 382. – p. 607–609.
132. Miura A., Uraoka Y., Fuyuki T., Kumagai S., Yoshii S., Matsukawa N., Yamashita I. Bionanodot monolayer array fabrication for nonvolatile memory application // *Surface Science Letters*. – 2007. – Vol. 601(15). – p. L81–L85.
133. Miura A., Hikono T., Matsumura T., Yano H., Hatayama T., Uraoka Y., Fuyuki T., Yoshii S., Yamashita I. Floating nanodot gate memory devices based in biomineralized inorganic nanodot array as a storage node // *Japanese Journal of Applied Physics*. – 2005. – Vol. 45(1).
134. Miura A., Uraoka Y., Fuyuki T., Yoshii S., Yamashita I. Floating nanodot gate memory fabrication with biomineralized nanodot as charge storage node // *Journal of Applied Physics*. – 2008. – Vol. 103(7).
135. Miura A., Tsukamoto R., Yoshii S., Yamashita I., Uraoka Y., Fuyuki T. Non-volatile flash memory with discrete bionanodot floating gate assembled by protein template // *Nanotechnology*. – 2008. – Vol. 19(25).
136. Miura A., Tanaka R., Uraoka Y., Matsukawa N., Yamashita I., Fuyuki T. The characterization of a single discrete bionanodot for memory device applications // *Nanotechnology*. – 2009. – Vol. 20(12).
137. Morikawa K., Ohniwa R. L., Kim J., Takeshita S. L., Maruyama A., Inose Y., Takeyasu K., Ohta, T. Biochemical, molecular genetic, and structural analyses of the staphylococcal nucleoid // *Microscopy and Microanalysis*. 2007. – Vol. 13(1). – p. 30–35.

138. Nair S., Finkel S.E. Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase // *Journal of Bacteriology*. – 2004. – Vol. 186(13). – p. 4192–4198.
139. Niemeyer C. M., Mirkin C. A. *Nanobiotechnology: Concepts, Applications and Perspectives* // Wiley-VCH, Weinheim. – 2004. – 492 p.
140. Okuda M., Iwahori K., Yamashita I., Yoshimura H. Fabrication of nickel and chromium nanoparticles using the protein cage of apoferritin // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2003. – Vol. 84(2). – p. 187–193.
141. Omabegho T., Sha R., Seeman N.C. A bipedal DNA brownian motor with coordinated legs // *Science*. – 2009. – Vol. 324(5923). – p. 67–71.
142. Panja S., Woodson S. Hexamer to monomer equilibrium of *E.Coli* Hfq in solution and its impact on RNA annealing // *Journal of Molecular Biology*. – 2012. – Vol. 417(5). – p. 406–412.
143. Papinutto E., Dundon W.G., Pitulis N., Battistutta R., Montecucco C., Zanotti G. Structure of two iron-binding proteins from *Bacillus anthracis* // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Vol. 277(17). p. 15093–15098.
144. Park S. H. Yin P., Liu Y., Reif J.H., LaBean T.H., Yan H. Programmable DNA self-assemblies for nanoscale organization of ligands and proteins // *Nano Letters*. – 2005. –Vol. 5(4). – p. 729–733.
145. Pead S., Durrant E., Webb B., Larsen C., Heaton D., Johnson J., Watt G. D. Metal ion binding to apo, holo, and reconstituted horse spleen ferritin // *Journal of Inorganic Biochemistry*. – 1995. – Vol. 59(1). – p. 15–27.
146. Peña M.M., Bullerjahn G.S. The DpsA protein of *Synechococcus sp. Strain PCC7942* is a DNA-binding hemoprotein. Linkage of the Dps and bacterioferritin protein families // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1995. – Vol. 270(38). – p. 22478 – 22482.
147. Perriman A.W., Cölfen H., Hughes R.W., Barrie C.L., Mann S. Solvent-free protein liquids and liquid crystals // *Angewandte Chemie*. – 2009. – Vol. 48(34). – p. 6242–6246.

148. Pesek J., Buchler R., Albrecht R., Boland W., Zeth, K. Structure and mechanism of iron translocation by a Dps protein from *Microbacterium arborescens* // The Journal of Biological Chemistry. – 2011. – Vol. 286(40). – p. 34872–34882.
149. Ping L., Platzer M., Wen G., Delaroque N. Coevolution of aah: a dps-like gene with the host bacterium revealed by comparative genomic analysis // ScientificWorldJournal. – 2012. – Vol. 2012(504905).
150. Pinheiro A.V., Han D., Shih W.M., Yan H. Challenges and opportunities for structural DNA nanotechnology // Nature Nanotechnology. – 2011. – Vol. 6(12). – p. 763–772.
151. Pulliainen A.T., Haataja S., Kahkonen S. and Finne J. Molecular basis of H₂O₂ resistance mediated by *Streptococcal* Dpr. Demonstration of the functional involvement of the putative ferroxidase center by site-directed mutagenesis in *Streptococcus suis* // The Journal of Biological Chemistry. – 2003. – Vol. 278(10). – p. 7996–8005.
152. Purtov Y.A., Glazunova O.A., Antipov S.S., Pokusaeva V.O., Fesenko E.E., Preobrazhenskaya E.V., Shavkunov K.S., Tutukina M.N., Lukyanov V.I., Ozoline O.N. Promoter islands as a platform for interaction with nucleoid proteins and transcription factors // Journal of bioinformatics and computational biology. – 2014. – Vol. 12(2).
153. Reindel S., Schmidt C. L., Anemuller S., Matzanke, B. F. Characterization of a non-haem ferritin of the *Archaeon Halobacterium salinarum*, homologous to Dps (starvation-induced DNA-binding protein) // Biochemical Society Transactions. – 2002. – Vol. 30(4). – p. 713–715.
154. Reindel S., Schmidt C. L., Anemuller S., Matzanke, B. F. Expression and regulation pattern of ferritin-like DpsA in the archaeon *Halobacterium salinarum* // Biometals. – 2006. – Vol. 19(1). – p. 19–29.
155. Ren B., Tibbelin G., Kajino T., Asami O., Ladenstein R. The multi-layered structure of Dps with a novel di-nuclear ferroxidase center // Journal of Molecular Biology. – 2003. – Vol. 329(3). – p. 467–477.

156. Regan T. J., Ohldag H., Stamm C., Nolting F., Lüning J., Stöhr J. Chemical effects at metal/oxide interfaces studied by x-ray-absorption spectroscopy // *Physical Review B*. – 2001– Vol. 64(21).
157. Rothemund P.W. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns // *Nature*. – 2006. – Vol. 440(7082). – p. 297–302.
158. Roy S., Gupta S., Das S., Sekar K., Chatterji D., Vijayan M. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of *Mycobacterium smegmatis* Dps // *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*. – 2003. – №59. – p. 2254–2256.
159. Roy S., Saraswathi R., Chatterji D., Vijayan M. Structural studies on the second *Mycobacterium smegmatis* Dps: invariant and variable features of structure, assembly and function // *Journal of Molecular Biology*. – 2008. – Vol. 375(4). – p. 948–959.
160. Saccà, B. Meyer R., Erkelenz M., Kiko K., Arndt A., Schroeder H., Rabe K.S., Niemeyer C.M. Orthogonal protein decoration of DNA origami // *Angewandte Chemie*. – 2010. – Vol. 49(49). – p. 9378–9383.
161. Schreiber R., Kempter S., Holler S., Schüller V., Schiffels D., Simmel S.S., Nickels P.C., Liedl T. DNA origami-templated growth of arbitrarily shaped metal nanoparticles // *Small*. – 2011. – Vol. 7(13). – p. 1795–1799.
162. Seeman N.C. Construction of three-dimensional stick figures from branched DNA // *DNA and Cell Biology*. – 1991. – Vol. 10(7). – p. 475–486.
163. Seeman N.C. DNA in material world // *Nature*. – 2003. – Vol. 421(6921). – p. 427–431.
164. Seeman N.C. Nucleic acid junctions and lattices // *Journal of Theoretical Biology*. – 1982. – Vol. 99(2). – p. 237–247.
165. Seeman N.C. The design and engineering of nucleic acid nanoscale assemblies // *Current Opinion in Structural Biology*. – 1996. – Vol. 6(4). – p. 519–526.

166. Sharma, J., Ke Y., Lin C., Chhabra R., Wang Q., Nangreave J., Liu Y., Yan H. DNA-tile-directed self-assembly of quantum dots into two-dimensional nanopatterns // *Angewandte Chemie*. – 2008. – Vol. 47(28). – p. 5157–5159.
167. Shavkunov K. S., Masulis I. S., Tutukina M. N., Deev A. A., Ozoline O. N. Gains and unexpected lessons from genome-scale promoter mapping // *Nucleic Acids Research*. – 2009. – Vol. 37(15). – p. 4919–4931.
168. Sherman W.B., Seeman N.C. A precisely controlled DNA biped walking device // *Nano Letters*. – 2004. – Vol. 4(7). – p. 1203–1207.
169. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels // *Analytical Chemistry*. – 1996. – Vol. 68(5). – p. 850–858.
170. Shevchenko E. V., Talapin D. V., Kotov N. A., Brien S. O., Murray C. B., Structural diversity in binary nanoparticle superlattices // *Nature*. – 2006. – Vol. 439. – p. 55 – 59.
171. Shih W.M., Quispe J.D., Joyce G.F. A 1.7-kilobase single-stranded DNA that folds into a nanoscale octahedron // *Nature*. – 2004. – Vol. 427(6975). – p. 618–621.
172. Shvyreva U. S., Tutukina M. N., Ozoline O. N. Bacterioferritin: Properties, structural and functional organization of the *dps* gene regulatory region // *Biophysics*. – 2011. – Vol. 56(5). – p. 795–802.
173. Stephanopoulos, N. Liu M., Tong G.J., Li Z., Liu Y., Yan H., Francis M.B. Immobilization and one-dimensional arrangement of virus capsids with nanoscale precision using DNA origami // *Nano Letters*. – 2010. – Vol. 10(7). – p. 2714–2720.
174. Su M., Cavallo S., Stefanini S., Chiancone E., Chasteen N. D. The so-called *Listeria innocua* ferritin is a Dps protein. Iron incorporation, detoxification, and DNA protection properties // *Biochemistry*. – 2005. – Vol. 44(15). – p. 5572–5578.
175. Suzuki M., Abe M., Ueno T., Abe S., Goto T., Toda Y., Akita T., Yamadae Y., Watanabe Y. Preparation and catalytic reaction of Au/Pd bimetallic

- nanoparticles in Apo-ferritin // *Chemical Communications*. – 2009. – p. 4871–4873.
176. Takagi D., Yamazaki A., Otsuka Y., Yoshimura H., Kobayashi Y., Homma Y. Goldfilled apo-ferritin for investigation of single-walled carbon nanotube growth on substrate // *Chemical Physics Letters*. – 2007. – Vol. 445(4). – p. 213–216.
177. Takeyasu K., Kim J., Ohniwa R. L., Kobori T., Inose Y., Morikawa K., Ohta T., Ishihama A., Yoshimura S. H. Genome architecture studied by nanoscale imaging: analyses among bacterial phyla and their implication to eukaryotic genome folding // *Cytogenetic and Genome Research*. – 2004. – Vol. 107(1-2). – p. 38–48.
178. Terekhov V.A., Kashkarov V.M., Manukovskii E.Y., Schukarev A.V., Domashevskaya E.P. Determination of the phase composition of surface layers of porous silicon by ultrasoft X-ray spectroscopy and X-ray photoelectron spectroscopy techniques // *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*. – 2001. – Vol. 114. – p. 895–900.
179. Thieme D. Grass G. The Dps protein of *Escherichia coli* is involved in copper homeostasis // *Microbiological Research*. – 2010. – Vol. 165(2). – p. 108–115.
180. Tikhomirov T., Hoogland S., Lee P.E., Fischer A., Sargent E.H., Kelley S.O. DNA-based programming of quantum dot valency, self-assembly and luminescence // *Nature Nanotechnology*. – 2011. – Vol. 6. – p. 485–490.
181. Tsukamoto R., Iwahori K., Muraoka M., Yamashita M.I. Synthesis of Co_3O_4 nanoparticles using the cage-shaped protein, apoferritin // *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. – 2005. – Vol. 78(11). – p. 2075–2081.
182. Turishchev S.Y., Terekhov V. A., Kashkarov V.M., Domashevskaya E.P., Vyalykh D. V. Investigations of the electron energy structure and phase composition of porous silicon with different porosity// *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*. – 2007. – Vol. 156. – p. 445–451.

183. Turishchev S.Y., Terekhov V.A., Nesterov D.N., Koltygina K.G., Sivakov V.A., Domashevskaya E.P. Atomic and electronic structure peculiarities of silicon wires formed on substrates with varied resistivity according to ultrasoft X-ray emission spectroscopy // *Technical Physics Letters*. – 2015. – Vol. 41(4). – p. 344–347.
184. Uchida M., Flenniken M.L., Allen M., Willits D.A., Crowley B.E., Brumfield S., Willis A.F., Jackiw L., Jutila M., Young M.J., Douglas T. Targeting of Cancer Cells with Ferrimagnetic Ferritin Cage Nanoparticles // *Journal of the American Chemical Society*. – 2006. – Vol. 128(51). – p. 16626–16633.
185. Uchida M., Kang S., Reichhardt C., Harlen K. and Douglas, T. The ferritin superfamily: supramolecular templates for materials synthesis // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2010. – Vol. 1800. – p. 834–845.
186. Ueno T., Suzuki M., Goto T., Matsumoto T., Nagayama K., Watanabe Y. Size-selective olefin hydrogenation by a Pd nanocluster provided in an apo-ferritin cage // *Angewandte Chemie*. – 2004. – Vol. 43(19). – p. 2527–2530.
187. Ueshima J., Shoji M., Ratnayake D.B., Abe K., Yoshida S., Yamamoto K., Nakayama K. Purification, gene cloning, gene expression, and mutants of Dps from the obligate anaerobe *Porphyromonas gingivalis* // *Infection and Immunity*. – 2003. – Vol.71(3). – p. 1170–1178.
188. Vlahoviček K., Kajan L., Pongor S. DNA analysis servers: plot.it, bend.it, model.it and IS // *Nucleic Acids Research*. – 2003. – Vol. 31 (13). – p. 3686–3687.
189. Wang G., Alamuri P., Maier R. J. The diverse antioxidant systems of *Helicobacter pylori* // *Molecular Microbiology*. – 2006. – Vol. 61(4). – p. 847–860.
190. Warne B., Kasyutich O. I., Mayes E. L., Wiggins J. A. L., Wong K. K. W. Self Assembled Nanoparticulate Co : Pt for Data Storage Applications // *IEEE Transactions on Magnetics*. – 2000. – Vol. 36(5). – p. 3009–3011.
191. Watt G. D., Kim J. W., Zhang B., Miller T., Harb J. N., Davis R. C., Choi S. H. A Protein-Based Ferritin Bio-Nanobattery // *Journal of Nanotechnology*. – 2012. – Vol. 2012.

192. Wiedenheft B., Mosolf J., Willits D., Yeager M., Dryden K. A., Young M., Douglas, T. An archaeal antioxidant: characterization of a Dps-like protein from *Sulfolobus solfataricus* // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2005. – Vol. 102(30). – p. 10551–10556.
193. Wilchek M., Bayer E.A. Foreword and introduction to the book streptavidin-biotin system // Biomolecular Engineering. – 1999. – Vol. 16(1–4).
194. Williams B. A. R. Lund K., Liu Y., Yan H., Chaput J.C. Self-assembled peptide nanoarrays: an approach to studying protein-protein interactions // Angewandte Chemie. – 2007. – Vol. 46(17). – p. 3051–3054.
195. Wolf S. G., Frenkiel D., Arad T., Finkel S. E., Kolter R., Minsky A. DNA protection by stress-induced biocrystallization // Nature. – 1999. – №400. – p. 83–85.
196. Wong K. K. W., Mann S. Biomimetic synthesis of cadmium sulfide-ferritin nanocomposites // Advanced Materials. – 1996. – Vol. 8(11). – p. 928–932.
197. Wong K. K. W., Whilton N.T., Cölfen H., Douglas T., Mann S. Hydrophobic proteins: synthesis and characterisation of organic-soluble alkylated ferritins // Chemical Communications. – 1998. – Vol. (16). – p. 1621–1622.
198. Yamada K., Yoshii S., Kumagai S., Miura A., Uraoka Y., Fuyuki T., Yamashita I. Effects of dot density and dot size on charge injection characteristics in nanodot array produced by protein supramolecules // Japanese Journal of Applied Physics. – 2007. – Vol. 46 (11). – p. 7549–7553.
199. Yamashita I. Biosupramolecules for nano-devices: biomineralization of nanoparticles and their applications // Journal of Materials Chemistry. – 2008. – Vol. 18. – p. 3813–3820.
200. Yamashita I., Hayashi J., Hara M. Bio-template synthesis of uniform CdSe nanoparticles using cage-shaped Protein, Apoferritin // Chemistry Letters. – 2004. – Vol. 33(9). – p. 1158–1159.
201. Yamashita I. Fabrication of a two-dimensional array of nano-particles using ferritin molecule // Thin Solid Films. – 2001. – Vol. 393(1). – p. 12–18.

202. Yamashita I., Iwahori K., Kumagai S. Ferritin in the field of nanodevices // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2010. – Vol. 1800(8). – p. 846–857.
203. Yan H., Park S.H., Finkelstein G., Reif J.H., LaBean T.H. DNA-templated self-assembly of protein arrays and highly conductive nanowires // *Science*. – 2003. – Vol. 301(5641) . – p. 1882–1884.
204. Yan R., Gargas D., Yang, P. Nanowire photonics // *Nature Photonics*. – 2009. – Vol. 3. – p . 569–576.
205. Yoshii S., Kumagai S., Nishio K., Kadotani A., Yamashita I., Electrostatic self-aligned placement of single nanodots by protein supramolecules // *Applied Physics Letters*. – 2009. – Vol. 95(133702).
206. Yoshii S., Yamada K., Matsukawa N., Yamashita I. Making monolayer of inorganic nanoparticles on silicon substrate // *Japanese Journal of Applied Physics*. – 2005. – Vol. 44(3).
207. Yunusova A.K., Rogulin E.A., Artyukh R.I., Zheleznaya L.A., Matvienko N.I. Nickase and a protein encoded by an open reading frame downstream from the nickase *BspD6I* gene form a restriction endonuclease complex // *Biochemistry*. – 2006. – Vol. 71(7). – p. 815-20.
208. Zadegan R.M., Norton M.L. Structural DNA Nanotechnology: From Design to Applications // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2012. – Vol. 13(6). – p. 7149–7162.
209. Zanotti G., Papinutto E., Dundon W.G., Battistutta R., Seveso M., Del Giudice G., Rappuoli R., Montecucco C. Structure of the neutrophil-activating protein from *Helicobacter pylori* // *Journal of Molecular Biology*. – 2002. – Vol. 323(1). – p. 125–130.
210. Zapien D. C., Johnson M. A. Direct electron transfer of ferritin adsorbed at bare gold electrodes // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2000. – Vol. 494(2). – p. 114–120.
211. Zborowski M., Bor Fur C., Green R., Baldwin N. J., Reddy S., Douglas T., Mann S., Chalmers J. J. Immunomagnetic isolation of magnetoferritin-labeled cells in a modified ferrograph // *Cytometry*. – 1996. – Vol. 24(3). – p. 251–259.

212. Zeth K. Dps biomineralizing proteins: multifunctional architects of nature // *The Biochemical Journal*. – 2012. – Vol. 445(3). – p. 297–311.
213. Zeth K., Offermann S., Essen L. O., Oesterhelt D. Iron-oxo clusters biomineralizing on protein surfaces: structural analysis of *Halobacterium salinarum* DpsA in its low- and high-iron states // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2004. – Vol. 101(38). – p. 13780–13785.
214. Zhang B., Harb J. N., Davis R. C. Choi S., Kim J.W., Miller T., Chu S.H., Watt G. D. et al. Electron exchange between Fe(II) – horse spleen ferritin and Co(III)/Mn(III) reconstituted horse spleen and *Azotobacter vinelandii* ferritins // *Biochemistry*. – 2006. – Vol. 45(18). – p. 5766–5774.
215. Zhang F., Jiang S., Wu S., Li Y., Mao C., Liu Y., Yan H. Complex wireframe DNA origami nanostructures with multi-arm junction vertices // *Nature Nanotechnology*. – 2015. – Vol. 10(9). – p. 779–784.
216. Zhang Y., Fu J., Chee S. Y., Ang E. X., Orner B. P. Rational disruption of the oligomerization of the mini-ferritin *E. coli* DPS through protein–protein interface mutation // *Protein Science*. – 2011. – Vol. 20. – p. 1907–1917.
217. Zhang Y., Orner B. P. Self-Assembly in the Ferritin Nano-Cage Protein Superfamily // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2011. – Vol. 12(8). – p. 5406–5421.
218. Zhao G., Ceci P., Ilari A., Giangiacomo L., Laue T.M., Chiancone E., Chasteen N.D. Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells. A ferritin-like DNA-binding protein of *Escherichia coli* // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Vol. 277(31). – p. 27689–27696.
219. Zhen Z., Tang W., Chen H., Lin X., Todd T., Wang G., Cowger T., Chen X., Xie J. RGD Modified Apoferritin Nanoparticles for Efficient Drug Delivery to Tumors // *ACS Nano*. – 2013. – Vol. 7(6). – p. 4830–4837.

220. Zheng J., Birktoft J.J., Chen Y., Wang T., Sha R., Constantinou P.E., Ginell S.L., Mao C., Seeman N.C. From molecular to macroscopic via the rational design of a self-assembled 3D DNA crystal // *Nature*. – 2009. – Vol. 461. – p. 74–77.