

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«Воронежский государственный университет»

На правах рукописи

Антипов Сергей Сергеевич

Структурно-функциональные характеристики белка Dps в условиях различного
микроокружения и комплексования с ДНК

03.01.02 – Биофизика

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук

Научные консультанты: д.б.н., проф. Артюхов В.Г.
д.б.н., проф. Озолин О.Н.

Воронеж– 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1 Бактериальный нуклеоид, его компоненты и архитектура.....	16
1.2 Основные функциональные свойства белка Dps и их характеристика.....	30
1.3 Dps и суперсемейство белков – ферритинов.....	32
1.4 Структура белка Dps и его олигомеров.....	33
1.4.1. Структура мономера Dps.....	33
1.4.2. Специфика формирования олигомеров мономерами Dps.....	35
1.5 Особенности строения ферроксидазного центра Dps и каналов транслокации ионов железа.....	38
1.6 Модели взаимодействия Dps с ДНК.....	40
1.7 Клеточные процессы с возможным участием Dps.....	45
1.7.1 Dps как регуляторный белок.....	45
1.7.2 Роль Dps в обеспечении стрессовой устойчивости клеток <i>E.coli</i>	46
1.8 Перспективы прикладного использования металлсодержащего белка Dps и его нуклеопротеидных комплексов.....	49
1.8.1 Биореакторы для получения молекулярных сплавов.....	50
1.8.2 Полупроводниковые приборы.....	52
1.8.3 Источники питания.....	55
1.8.4 Перспективы проектирования и создания макромолекулярных.....	57
конструкций с применением методики «ДНК-оригами».....	57
Обобщение литературных данных и постановка проблемы.....	61
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	65
2.1 Объект исследования.....	65
2.2 Используемые в работе бактериальные штаммы.....	65
2.3 Суперпродукция, выделение и очистка рекомбинантного белка Dps.....	66
2.4 Электрофоретическое фракционирование белков в.....	68
денатурирующих условиях.....	68
2.5 Электрофоретическое фракционирование молекул Dps.....	69
в нативных условиях.....	69

2.6 Амплификация фрагментов ДНК	69
2.7 Экстрагирование фрагментов ДНК из ПААГ	73
2.8 Оценка эффективности взаимодействия линейных фрагментов ДНК с Dps методом задержки нуклеопротеидных комплексов в полиакриламидном геле (EMSA)	74
2.9 Окрашивание гелей нитратом серебра.....	74
2.10 Идентификация олигомерных форм Dps в растворе с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC).....	75
2.11 Оценка константы седиментации белка Dps	76
2.12 Определение нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК по Максаму-Джилберту	76
2.13 Идентификация сайтов взаимодействия белка Dps с ДНК радиоавтографическим методом.....	77
2.14 Проектирование комплекса, формирующего Y-образную структуру.....	79
из трёх частично комплементарных олигонуклеотидов	79
2.15 Приготовление образцов ДНК с одноцепочечными разрывами двойной спирали	81
2.16 Исследование методом атомно-силовой микроскопии отдельных молекул белка, ДНК и их нуклеопротеидных комплексов	82
2.17 Исследование изменений флуоресценции свободных молекул Dps и в составе нуклеопротеидного комплекса.....	83
2.18 Оценка гидродинамического радиуса молекул нативного Dps и в составе нуклеопротеида методом динамического светорассеяния	84
2.19 Изучение кинетики формирования нуклеопротеидных комплексов молекулами Dps с линейными и разветвлёнными фрагментами ДНК методом поверхностного плазмонного резонанса.....	85
2.20 Моделирование способности фрагментов ДНК формировать анизотропные изгибы с использованием программы «DNATool»	87
2.21 Получение первичных анти-Dps антител	88
2.22 Приготовление хроматина и его иммунопреципитация	88
2.23 Приготовление и секвенирование библиотек ДНК иммунопреципитированного хроматина	90
2.24 Обработка данных, полученных методом иммунопреципитации хроматина (Chip-Seq)	91

2.25	Биоинформатический анализ данных о сайтах связывания Dps в бактериальной хромосоме	93
2.26	Поиск доминирующей нуклеотидной последовательности сайтов связывания белка Dps	95
2.27	Анализ экспрессии генов с использованием ПЦР в реальном времени.....	95
2.28	Анализ экспрессии генов с использованием системы репортерной детекции на базе белка GFP	96
2.29	Подготовка образца, содержащего Dps, и регистрация XANES-спектров в сверхвысоковакуумных условиях с использованием синхротронного излучения в мягком рентгеновском диапазоне.....	97
2.30	Регистрация Мёссбауэровских спектров концентрированного раствора белка Dps	98
2.31	Анализ размеров неорганических частиц, входящих в..... состав олигомеров Dps, с применением просвечивающей электронной микроскопии	99
2.32	Моделирование процессов взаимодействия лигандов различной природы с олигомерами белка Dps методом последовательного молекулярного докинга ...	100
2.33	Поиск сайтов связывания для факторов транскрипции <i>in silico</i> в геноме <i>E.coli</i>	101
ГЛАВА III. ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ		102
3.1	Ферритин-подобный белок Dps как биосенсор и наноструктура	103
3.2	Исследование физико-химических характеристик рекомбинантного..... белка Dps	105
3.3	Синхротронные исследования в мягком рентгеновском диапазоне зарядового состояния ионов железа в составе неорганического ядра белка Dps <i>E.coli</i>	112
3.4	Увеличение концентрации ионов железа стабилизирует додекамерную форму Dps	116
3.5	Неорганические ядра во внутренней полости молекул Dps имеют не одинаковый размер.....	121
3.6	Мёссбауэровская спектроскопия подтвердила присутствие Fe ₃ O ₄ в неорганическом ядре Dps	123
3.7	Молекулярное моделирование структуры белка Dps в присутствии FeO и Fe ₂ O ₃ выявило потенциальные области связывания только для Fe ₂ O ₃	126

3.8 Изучение эффективности образования нуклеопротеидных комплексов с участием белка Dps в зависимости от физико-химических свойств ДНК.....	128
3.9 Исследование эффективности взаимодействия белка Dps с фрагментами ДНК « <i>промоторных островков</i> ».....	137
3.10 Особенности взаимодействия Dps с короткими линейными фрагментами ДНК.....	145
3.11 Влияние гексуронатов на олигомерную форму Dps и его способность взаимодействовать с линейными фрагментами ДНК.....	147
3.12 Самособирающиеся Y-подобные разветвлённые структуры ДНК как наиболее оптимальная мишень для взаимодействия с Dps	156
3.13 Исследование возможности формирования одноцепочечных участков в нативной ДНК с участием Dps	163
3.14 Оценка термодинамических и конформационных свойств Dps в составе нуклеопротеидного комплекса, включающего фрагменты ДНК с различной структурной организацией	165
3.15 Белок Dps распределён по бактериальной ДНК случайным образом	178
3.16 Сайты связывания Dps обогащены инвертированными повторами.....	187
3.17 Структурный белок нуклеоида обладает повышенным сродством к областям генома, содержащим REP-элементы и « <i>промоторные островки</i> ».....	189
3.18 Нуклеотидные последовательности, которыми обогащены сайты связывания Dps, обладают общим мотивом с консенсусами других белков нуклеоида	194
3.19 Отсутствие молекул Dps в бактериальной клетке по-разному влияет на экспрессию генов	195
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	205
ВЫВОДЫ	213
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	215
БЛАГОДАРНОСТИ	391
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	392
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	393

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Структурная организация и функционирование генетического материала всех живых организмов являются важной фундаментальной задачей, которая на сегодняшний день активно изучается на всех уровнях организации живого. Одним из важнейших её аспектов является вопрос поддержания оптимальной, функционально активной конформации генома в различных условиях роста клеток, а также его защита от воздействия внешних факторов. У высших организмов эту функцию выполняют структурные белки-гистоны. Эти белки не способны распознавать конкретные нуклеотидные последовательности и взаимодействуют с ДНК за счет электростатических взаимодействий, обеспечивая адаптацию генома к воздействию внешних факторов путем конденсации или релаксации определённых геномных локусов. Бактериальный геном отличается по своей структуре от генома эукариот. В нем отсутствует оформленное ядро, а генетический материал в комплексе с белками формирует нуклеоид, который представляет собой компартмент неправильной формы внутри бактериальной клетки. Помимо этого, прокариотические клетки не содержат классических гистонов, их функцию выполняют гистон-подобные белки, которые принято также называть белками нуклеоида. Выделяют двенадцать основных бактериальных гистон-подобных белков: Dps, IHF, Fis, HU, StpA, H-NS, CbpB, CbpA, DnaA, Lrp, IciA и иногда Hfq [18, 19]. Эти белки обеспечивают поддержание функционально-активного состояния генома и его защиту на протяжении всего жизненного цикла бактерий. Некоторые белки нуклеоида способны распознавать конкретные нуклеотидные последовательности или особенности укладки двойной спирали бактериальной ДНК. Возможно также их взаимодействие с ДНК аналогичное гистонам. Общее количество молекул гистон-подобных белков в клетках *E.coli*, принимающих участие в поддержании конформации генома на экспоненциальной фазе роста, составляет около 170000, а во время стационарной фазы роста их количество

увеличивается до 290000. При этом меняется не только их общее количество, но и пропорциональное соотношение основных белков нуклеоида. Во время экспоненциальной фазы роста преобладает белок Fis, но при переходе в условия ограниченного количества питательных веществ его уровень значительно снижается, в то время как количество молекул белка Dps возрастает [19]. Механизм взаимодействия белка Fis с ДНК на сегодняшний день достаточно хорошо изучен. Известна его функционально-активная форма и нуклеотидные последовательности, которые он способен распознавать. При этом соответствующих данных о способах и особенностях взаимодействия Dps с ДНК, для всестороннего понимания механизмов его функционирования недостаточно. Принято считать, что основной олигомерной формой белка Dps является додекамер, который не содержит каких-либо модулей в своей структуре предназначенных для распознавания конкретных нуклеотидных последовательностей. Взаимодействие с отрицательно заряженным сахаро-фосфатным остовом ДНК осуществляется за счет формирования электростатических связей с положительно заряженными остатками аминокислот, локализованных в области N-концевого участка мономеров Dps [11, 18, 19, 30]. Тем не менее, остается до конца не ясным, каким образом осуществляется контроль упорядоченной компактизации бактериальной хромосомы на стационарной фазе роста.

Помимо того, что Dps играет главную роль в поддержании конформации ДНК на стационарной фазе роста, он выполняет еще несколько важных функций. Одной из них является способность окислять токсичные для клетки ионы двухвалентного железа с использованием пероксида водорода. Как правило, эту функцию у высших организмов выполняют специальные белки – ферритины. Они представляют собой олигомерные белки, состоящие, как правило, из 24 идентичных или сходных субъединиц молекулярной массой ~19 кДа, формирующих полость внутри белковой глобулы. В этой полости происходит накопление ионов железа в виде нетоксичных для клетки ферригидридов ($5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$), формирующих неорганическое ядро. Внешний

диаметр молекул белка составляет 12-13 нм, в то время как диаметр внутренней полости, содержащей до 4500 ионов железа, не превышает 8 нм. Ферритины играют исключительно важную роль в поддержании внутриклеточного гомеостаза ионов железа и широко распространены среди живых организмов [218]. Для *E.coli* известно три белка, способных выполнять такую функцию: FtnA, Vfr и Dps. Белки FtnA и Vfr структурно гомологичны ферритинам высших организмов, в то время как Dps имеет ряд значимых отличий. Он состоит из 12 идентичных субъединиц [215, 71] с молекулярной массой 18,712 кДа [67]. Каталитические центры каждой из субъединиц окисляют 2 иона Fe^{2+} до Fe^{3+} с использованием одной молекулы H_2O_2 , снижая тем самым продукцию токсичных активных форм кислорода в клетке. После окисления железо проникает во внутреннюю полость белка, формируя его неорганическое ядро, содержащее до 450 атомов железа [215]. Таким образом, Dps *E.coli* имеет меньший размер по сравнению с другими ферритинами, а, помимо способности накапливать железо, может еще и формировать прочные нуклеопротеидные комплексы с ДНК, что предполагает возможность его участия не только в экранировании ДНК от воздействия неблагоприятных факторов, но и возможность его участия в регуляции экспрессии генов. Однако белки, участвующие в генной регуляции, как правило, обладают способностью распознавать конкретные нуклеотидные последовательности или особенности укладки двойной спирали, но подобная информация о Dps на сегодняшний день отсутствует. Более того, обнаружено, что делеция гена *dps* в клетках *E.coli* приводит к значительным изменениям в профиле синтезируемых белков [11], а анализ результатов, полученных с использованием кДНК-микрочипов, выполненный для таких мутантов *S.enteritidis* [28], выявил значительное количество генов с *dps*-зависимой транскрипцией. Все эти факты предполагают наличие сродства Dps к определенным геномным областям, сведения о которых также отсутствуют.

Наличие ионов металла во внутренней полости ферритинов, и Dps в частности, предполагает наличие магнитных свойств. Следовательно, эти

молекулы можно рассматривать как естественные биосенсоры электромагнитного излучения. Однако только Dps способен передавать полученный сигнал на ДНК [1, 219]. Участие Dps в депонировании ионов железа является его уникальной особенностью, отличающей его от других белков нуклеоида. Именно поэтому Dps является чрезвычайно перспективным в качестве основы для создания логических элементов нового поколения, ячеек памяти с супервысокой плотностью хранения информации, квантовых электронных приборов, биомедицинских нанороботов, биосенсоров высокой чувствительности, многослойных бионанобатарей и биореакторов для получения необычных сплавов, например CoPt. При этом высокое сродство Dps к ДНК в перспективе позволяет иммобилизовать его на формообразующих ДНК-матрицах, то есть в режиме самосборки создавать в пространстве любое, заранее заданное, распределение молекул белка. Однако вопрос о том, на какие физико-химические свойства и параметры может повлиять наличие или отсутствие ионов железа, или других компонентов микроокружения остается открытым. Более того, необходимо иметь подробное представление о составе и структуре неорганического ядра Dps, данные о котором не однозначны, а иногда и противоречивы. Считается, что неорганическое ядро формируется из продуктов окисления ионов Fe^{2+} в ферроксидазных центрах белка и его основным компонентом должны быть оксиды трехвалентного железа. Однако возможность минерализации ионов Fe^{2+} в анаэробных условиях *in vitro* допускает более сложный состав неорганического ядра. Поэтому информация об атомном и электронном строении, фазовом составе и особенностях взаимодействия молекул Dps, представляющих собой гибридные биоорганические частицы, с окружающей средой является ключевой как с фундаментальной точки зрения, так и с позиции успешного использования его молекул в качестве основы для наноматериалов.

Таким образом, изучение физико-химических и биоорганических свойств Dps, особенностей формирования нуклеопротеидных комплексов с его участием, расширение понимания фундаментальных основ реализации его

главных и вспомогательных функций, в частности участие в регуляции экспрессии генов, являются актуальной фундаментальной задачей. Помимо этого, понимание структурно-функциональных особенностей Dps как гибридной биоорганической наночастицы позволяет рассматривать его применение для решения конкретных прикладных задач.

Цель исследования: Изучить закономерности, лежащие в основе конденсации бактериальной ДНК с участием белка Dps в зависимости от природы компонентов микроокружения, выявить факторы, влияющие на них, и охарактеризовать механизм распределения этого белка по бактериальной хромосоме.

Задачи исследования:

1. Выявить и оценить наиболее значимые физико-химические характеристики как отдельных молекул рекомбинантного белка Dps, так и его концентрированных растворов в различных условиях;
2. Осуществить поиск потенциальных ДНК-мишеней, выявить их наиболее важные характеристики, обеспечивающие сродство Dps к ним и оценить способ формирования нуклеопротеидных комплексов;
3. Выявить компоненты, присутствующие в бактериальной клетке, способные оказать влияние на олигомерную форму белка и на способность Dps формировать нуклеопротеидные комплексы;
4. Оценить сродство Dps к линейным и разветвленным структурам ДНК природного и искусственного происхождения;
5. Проанализировать термодинамические и конформационные особенности нуклеопротеидных комплексов, содержащих Dps, и оценить энергию их формирования;
6. Выявить области бактериальной хромосомы, обладающие высоким сродством к Dps, и провести анализ закономерностей, лежащих в основе его распределения в геноме *E.coli*;

Научная новизна и практическая значимость работы

Результаты диссертационной работы расширяют понимание физико-химических и структурно-функциональных особенностей основного архитектурного фактора бактериального нуклеоида – белка Dps *E.coli*, реализующихся как на уровне отдельных макромолекул или их компонентов, так и на уровне его концентрированных растворов. В частности, предложена и впервые апробирована методика подготовки образцов, содержащих молекулы Dps для регистрации XANES-спектров в сверхвысоковакуумных условиях, неразрушающих олигомер. С использованием XANES- и Мёссбауэровской спектроскопии выявлено, что неорганическое ядро ферритин-подобного белка Dps содержит атомы железа как в трехвалентном, так и в двухвалентном состояниях, причем в тетра- и октаэдрическом окружении атомов кислорода. Доказано, что присутствие ионов двухвалентного железа влияет на олигомерную форму белка и вызывает формирование его додекамерной формы за счет дополнительных межсубъединичных контактов. Экспериментально доказано, что наблюдаемый эффект не опосредован изменением ионной силы раствора. При этом установлено влияние клеточных компонентов сахарной природы (D-галактуронат, D-глюкуронат) на олигомерную форму Dps и особенности формирования нуклеопротеидных комплексов с его участием.

На основании результатов оценки термодинамических параметров доказано неодинаковое сродство Dps к фрагментам ДНК различного нуклеотидного состава. Выявлены два новых способа взаимодействия Dps с линейными и разветвленными участками ДНК, что предполагает его участие в контроле областей генома, содержащих тандемные повторы и способных формировать Y-подобные структуры в бактериальной ДНК. Результаты оценки термодинамических параметров нуклеопротеидных комплексов, сформированных Dps с линейными и разветвленными фрагментами ДНК, выявили более высокую энергетическую стабильность нуклеопротеидов, содержащих разветвленные самособирающиеся Y-подобные структуры ДНК. На основании полученных данных предложена модель, расширяющая

представления о механизмах взаимодействия белка Dps с участками ДНК различной конфигурации и способах её упорядоченной компактизации. Спроектированы также элементарные, самособирающиеся Y-подобные конструкции наноразмерного диапазона для решения прикладных задач в области материаловедения, полупроводниковой техники, медицины и биотехнологии за счет управляемой иммобилизации молекул Dps в структуре нуклеопротеидного комплекса. Проектирование и создание объектов наноразмерного диапазона на основе гибридных биоорганических материалов представляет большой научный и практический интерес в различных областях науки и техники. Такие молекулы обладают рядом уникальных свойств. Так, с одной стороны, они имеют фиксированный внутренний объем, что позволяет эффективно контролировать размерный фактор неорганического ядра частицы, с другой стороны, наличие органической оболочки препятствует двухстороннему обмену кислородом, в результате чего сохраняются свойства исходного материала. При этом создание упорядоченных или одиночных структур размером менее 10 нм традиционными методами является труднореализуемой задачей. Наиболее перспективными для таких целей являются биомакромолекулы, на основе которых можно создавать не только двумерные конструкции, но и развитые в пространстве структуры с заданными характеристиками и свойствами. Наиболее яркими примерами в этой области могут служить ферритин-подобные белки и Dps в частности, способные аккумулировать ионы различных металлов и их соединения внутри своей полости. Их использование может затрагивать самые разные прикладные направления нанoeлектроники, спинтроники, биотехнологии и медицины. На их базе вполне реалистично создание биореакторов для получения молекулярных сплавов, создание квантовых электроприборов, проектирование полупроводников, компактных устройств аккумулирования электроэнергии, логических элементов, а также систем адресной, биосовместимой доставки веществ в клетке.

Проведен полногеномный поиск сайтов связывания Dps, в результате которого установлено их неравномерное распределение по бактериальной хромосоме на экспоненциальной фазе роста *E.coli*. Анализ выявленных нуклеотидных последовательностей свидетельствует о том, что сайты связывания Dps в хромосоме *E.coli* перекрываются с нуклеотидными последовательностями других белков нуклеоида; защита ДНК от различных типов стресса может осуществляться за счет способности Dps модулировать транскрипционную активность. Эта защита может быть реализована путем снижения интенсивности биосинтеза РНК некоторых генов из-за его конкуренции с РНК-полимеразой или повышения уровня экспрессии генов вследствие конкуренции с ингибиторами активации их транскрипции. Другими словами, получено подтверждение роли Dps как регуляторного белка.

Апробация работы

Результаты работы были представлены на 14 международных и всероссийских конференциях, опубликованы в соответствующих сборниках трудов, в том числе: «VI Съезд биофизиков России», (Нижний Новгород, Россия, 2012), «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине «Postgenome-2012» (Казань, Россия, 2012); «Экспериментальная и теоретическая биофизика 2013» (Пушино, Россия, 2013); «Proceedings of the International Summer School on Application of Scanning Probe Microscopy in Life Sciences, Soft Matter and Nanofabrication» (Ольборг, Дания, 2013); «МССМВ-2013» (Москва, Россия, 2013); «Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы» (Воронеж, Россия, 2013); «Биология – наука XXI века» (Пушино, Россия, 2013, 2014); «STRANN '14» (Санкт-Петербург, Россия, 2014); «V Съезд биофизиков России» (Ростов-на-Дону, Россия, 2015); «Физико-химические процессы в конденсированных средах и на межфазных границах, ФАГРАН - 2015» (Воронеж, Россия, 2015); «Ломоносов - 2017» (Москва, Россия, 2017); «The 17th European conference on applications of surface and interface analysis», Montpellier, France, 2017); «МССМВ 2017» (Москва, Россия, 2017)

Публикации. По материалам диссертации опубликована 31 работа, из которых 11 в периодических отечественных и международных научных журналах из перечня Высшей аттестационной комиссии Министерства образования и науки Российской Федерации, а так же индексируемые базами данных Scopus и Web of Science, 4 статьи в сборниках международных конференций, 2 монографии. Оформлены две патентных заявки: «Способ оценки биотропного проявления электромагнитного излучения сверхвысокой частоты, интегрированного под контроль гена *dps*» заявка на полезную модель № 2015144938 от 19.10.2015г.; «Молекулярная самособирающаяся конструкция наноразмерного диапазона на основе искусственной Y-подобной ДНК-матрицы и белка *Dps*» заявка на полезную модель №2016150507 от 22.12.2016 г.

Личный вклад автора. Проведение экспериментов, обработка, анализ и интерпретация полученных данных, а также подготовка научных статей, апробация результатов исследования осуществлялись лично автором, либо при его непосредственном участии.

Объём и структура работы. Диссертационная работа изложена на 425 страницах машинописного текста; состоит из введения, обзора литературы, методической части, результатов с обсуждениями, заключения и выводов, приложений, а также списка литературы. Диссертация включает 7 таблиц и 64 рисунка. Список литературы содержит 334 источника.

Положения, выносимые на защиту:

1. Предложена и впервые апробирована методика подготовки образцов, содержащих молекулы *Dps* для регистрации XANES-спектров в сверхвысоковакуумных условиях, неразрушающих олигомерную структуру данного белка. С использованием ядерно-физических и рентгеноспектральных методов установлено присутствие в неорганическом ядре *Dps* атомов железа в двух- и трехвалентном состояниях.

2. Присутствие ионов двухвалентного железа способствует формированию додекамеров *Dps* за счет образования дополнительных межсубъединичных контактов; D-глюкуронат, из исследуемых сахаров (D-

глюкоза, D-галактуронат, D-глюкуронат), оказывает модулирующее воздействие на ДНК-связывающую активность Dps.

3. Охарактеризованы два новых способа взаимодействия белка Dps с линейными и разветвленными участками молекулы ДНК. Спроектированы элементарные, самособирающиеся Y-подобные конструкции ДНК наноразмерного диапазона, обеспечивающие управляемую иммобилизацию молекул Dps в структуре нуклеопротеидного комплекса для решения прикладных задач.

4. Анализ термодинамических характеристик нуклеопротеидных комплексов, сформированных Dps с линейными и разветвленными фрагментами ДНК, выявил более высокую энергетическую стабильность нуклеопротеидов, содержащих разветвленные самособирающиеся Y-подобные структуры ДНК.

5. Полногеномный поиск сайтов связывания Dps позволил установить их неравномерное распределение в бактериальной хромосоме на экспоненциальной фазе роста *E.coli*. Установлено, что сайты связывания Dps перекрываются с таковыми для других белков нуклеоида. Максимальное превышение размера общих нуклеотидных последовательностей при этом обнаружено для белка Fis.

6. Выявлено высокое сродство белка Dps к областям бактериальной хромосомы, содержащим REP-элементы, «*промоторные островки*» и участки ДНК, обогащенные инвертированными повторами.

7. Установлено, что делеция гена *dps* влияет на уровень экспрессии ряда генов, что указывает на способность белка Dps выполнять регуляторную функцию за счет интерференции с другими белками, участвующими в этом процессе.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Бактериальный нуклеоид, его компоненты и архитектура

Нуклеоидом принято называть компартмент неправильной формы, локализованный внутри бактериальной клетки и состоящий из бактериальной ДНК и ассоциированных с ней белков. Белки бактериального нуклеоида играют ключевую роль в поддержании архитектуры, репликации, репарации и контроле экспрессии генов бактериальной хромосомы. Некоторые белки нуклеоида также участвуют в инициации транскрипции конкретных промоторов и функционируют совместно с транскрипционными факторами, регулируя экспрессию генов в соответствии с фазой роста или изменения окружающей среды. Несмотря на различия в клеточной организации эукариот, бактерий и архей, важно помнить, что для всех этих групп важнейшей задачей является хранение и реализация генетической информации, а белки, ассоциированные с ДНК, обеспечивают максимальную эффективность данных процессов. Для эукариотических организмов эту функцию выполняют гистоны, механизм функционирования которых на современном этапе изучен достаточно хорошо. У бактерий существуют белки, выполняющие сходные функции, которые были названы «гистон-подобными белками». Однако этот термин на сегодня не совсем корректен, так как выявлен целый ряд отличий таких бактериальных белков от гистонов. Более уместным считается использовать название «белки нуклеоида», которое более точно отражает их клеточное расположение и не подчеркивает структурное сходство с гистонами. Эта группа белков многочисленна, разнообразна и неравнозначно изучена, а количество ее представителей может быть увеличено (Таблица 1). Большинство белков нуклеоида обладает ДНК-связывающей активностью и способны изменять конформацию молекулы ДНК, изгибая ее, накручивая ее вокруг себя, или формируя перемычки между её соседними цепями. Кроме того, многие белки

этой группы способны активировать или ингибировать транскрипцию за счет снижения синтеза рРНК оперона [220].

Таблица 1. Характеристики белков нуклеоида
Грамм-положительных и Грамм-отрицательных бактерий

Название белка или группы белков	Тип влияния на ДНК			Распознаваемый мотив	Молекулярная масса, кДа	Олигомерная форма
	Накручивание	Соединение	Изгибание			
Грамм-положительные бактерии						
HU	+	-	+	АТ-богатые или изогнутые участки ДНК	~ 9	Гетеродимер (например, HU α -HU β)
Lrp	+	+	-	(T/C)AG(A/T/C)A(A/T)ATT(A/T)T(A/T/G)CT(A/G)	~ 18	Гомодимер
MukB	-	+	-	-	~ 175	Гомодимер
Fis	+	+	+	A ₆ треки и АТ треки	~ 11	Гомодимер
H-NS	-	+	-	АТ-богатые участки ДНК и TCGATAAATT	~ 15	Гомо- или гетеродимер (H-NS-StrA)
IHF	-	-	+	(A/T)ATCAANNNTT(A/G)	~ 11	Гетеродимер (IHF α -IHF β)
StrA	-	+	-	АТ-богатые участки ДНК	~ 15	Гомо- или гетеродимер (StrA-H-NS)
CbpA	-	-	-	Изогнутые участки ДНК	~ 33	Гомо- или гетеродимер (CbpA-CbpM)
CbpB	-	-	-	Изогнутые участки ДНК	~ 33	Мономер
EbfC	-	Предполагается	-	GTNAC	~ 11	Гомодимер
Dps	-	-	-	-	~ 19	Мономер или додекамер
Грамм-отрицательные бактерии						
MukB	-	+	-	Одноцепочечные участки ДНК	~ 130	Гомодимер
Lrp	+	+	-	-	~ 17	Гомодимер
HU	-	-	+	-	~ 10	Гомодимер
Lsr2	-	+	-	АТ-богатые участки ДНК	~ 12	Гомодимер
Hlp	-	-	-	-	~ 21	Мономер
MrgA	-	-	-	-	~ 17	Додекамер

Экспериментальные данные свидетельствуют о хорошей корреляции между транскрипционной активностью, количеством и стабильностью доменов ДНК, формирующих петли [221, 222, 223]. При этом известно, что транскрипционная активность зависит от физиологического состояния клетки. Быстрорастущие бактерии более активно транскрибируют гены, кодирующие

компоненты рибосом и других частей трансляционного аппарата, которые несут большее количество доменов ДНК, содержащих петли. В начале стационарной фазы или при наступлении условий недостатка питательных веществ происходит замедление роста бактериальной культуры и снижение эффективности транскрипции, что влечет за собой релаксацию петель ДНК.

Согласно генетическим и биоинформатическим данным, некоторые белки нуклеоида, особенно те, которые способны формировать сшивки между цепями ДНК, обладают способностью отмечать начало и конец петель, например H-NS, Fis [224, 225]. То есть, наличие мишени для обоих этих белков в генах рРНК может свидетельствовать о том, что формируемая ими структура нуклеоида необходима для поддержания высокой интенсивности транскрипции в бактериальных клетках. Однако бактерии с маленьким содержанием белков нуклеоида, включая H-Ns и Fis, могут поддерживать необходимую конформацию нуклеоида [226]. Это противоречит предположению о том, что белки нуклеоида выполняют структурную роль и требует дополнительного всестороннего изучения. В ходе оценки потенциального участия белков нуклеоида в структурировании бактериальной ДНК и регуляции экспрессии генов необходимо учитывать их физическое воздействие на ДНК, с которой они взаимодействуют. С использованием мономолекулярных методик было показано, что белок H-NS *in vitro* формирует олигомеры вдоль цепи ДНК, а в присутствии 10 мМ MgCl₂ он формирует мостики или сшивки ДНК-белок-ДНК в местах, с которыми были связаны его олигомеры [237]. Образование таких структур может управлять транскрипцией за счет того, что они могут захватывать РНК-полимеразу или вытеснять её из промоторов, тем самым нейтрализуя соответствующие гены. Кроме того, имеются экспериментальные данные свидетельствующие, что сайты локализации H-NS и РНК-полимеразы перекрываются на бактериальных промоторах, что согласуется с механизмом её захвата [224, 238]. Считается, что мостики ДНК-белок-ДНК репрессируют транскрипцию и должны быть разрушены для эффективной экспрессии генов. Таким образом, формированию таких структур должен препятствовать целый

набор специальных механизмов, каждый из которых основан на особенностях взаимодействия с ДНК [239, 240]. Формирование такого механизма, реализующегося через изгибание двойной спирали или её наматывание, могут осуществлять большинство белков бактериального нуклеоида (Таблица 1).

Функционально белки, входящие в состав нуклеоида, могут быть отнесены к следующим группам: ДНК полимеразы, белки осуществляющие рекомбинацию и репарацию ДНК, РНК полимеразы и факторы транскрипции. Как правило, эти белки влияют не только на конформацию нуклеоида, но и на такие функции, как репликация, рекомбинация, репарация и транскрипция за счет своего внутриклеточного содержания и локализация на ДНК [227, 228, 229, 230, 231]. Более того, каждый белок нуклеоида может сочетать выполнение сразу нескольких функций. В связи с этим представляет интерес рассмотреть более детально функциональные характеристики основных белков нуклеоида.

Hfq - был первично охарактеризован как фактор репликации РНК фага Q_β. Однако позднее была выявлена его способность взаимодействовать как с РНК, так и с ДНК [252]. Его молекулярная масса составляет около 11 кДа, а функционально-активной формой является гексамер, который взаимодействует с мРНК и выполняет функцию шаперона для этих молекул. Основная часть молекул Hfq в клетке находится в цитоплазме в виде комплексов с рибосомными белками L7/L12 или RMF, а также ассоциирована с рибосомами [17]. Поэтому не все авторы относят его к группе основных белков бактериального нуклеоида. Его максимальная концентрация составляет 55000 молекул на клетку и приходится на экспоненциальную фазу, но при переходе к стационарной фазе роста его содержание снижается примерно в три раза и составляет около 18 000 молекул на клетку [18]. Наблюдаемое изменение его внутриклеточного содержания хорошо коррелирует с общим снижением продукции мРНК на этой стадии роста бактерий. Ген *hfq* транскрибируется с трех промоторов, два из которых распознаются σ^{70} , а один - σ^{32} . Транскрипция гена *hfq* с промотора, который распознается σ^{32} свидетельствует о том, что

шаперонная функция Hfq, безусловно, востребована во время теплового шока. Способ белковой регуляции экспрессии гена *hfq* так же, как механизм взаимодействия Hfq с ДНК, пока до конца не установлен.

DnaA – основной функцией этого белка является участие в репликации бактериальной хромосомы, но иногда его относят к белкам бактериального нуклеоида [17]. Он способен активировать или подавлять транскрипцию ряда генов, в том числе собственного, а также является антагонистом белка IciA. Молекулярная масса DnaA составляет 52.3 кДа. Активность транскрипции гена *dnaA* зависит от белка ArgP, который тоже относится к белкам нуклеоида. Максимальное внутриклеточное содержание этого белка приходится на среднюю экспоненциальную фазу и составляет 2700 молекул на клетку. При этом при переходе клеток к стационарному росту его количество снижается не значительно и составляет около 2100 молекул на клетку [18].

IciA(ArgP) (**I**nhibitor of **C**hromosome **I**nitiation или **A**rginine transport regulatory **P**rotein)- является представителем группы факторов транскрипции LysR, которую обычно не включают в группу белков нуклеоида. Молекулярная масса его мономера составляет около 33.3 кДа, но функционирует он в виде димера. Он способен распознавать три повторяющихся мотива в ДНК длиной 13 нуклеотидов, которые обычно локализованы вблизи сайта начала репликации *oriC* и способен ингибировать инициацию репликации ДНК [232]. Помимо этого участвует в управлении транскрипцией двух оперонов, в том числе содержащего ген *dnaA*. Экспрессия гена *iciA(argP)* зависит от активатора PhoB, являющегося регулятором белков транспорта и утилизации фосфатов. Количественно IciA(ArgP) является наименее представленным из всех белков нуклеоида. Его максимальное количество приходится на экспоненциальную фазу роста и составляет примерно 800 молекул (или 400 димеров) на клетку. При переходе к стационарному росту его количество снижается до 500 молекул, а во время поздней стационарной фазы снижается до ~270 молекул на клетку [18].

ИНФ (**I**ntegration **H**ost **F**actor) Первично был идентифицирован как белок, необходимый для рекомбинации ДНК фага λ . Функционально-активная конформация представляет собой гетеродимер, состоящий из двух различных субъединиц с молекулярной массой 11.2 кДа и 10.5 кДа, гомологичных субъединицам белка HU по аминокислотному составу. Однако, в отличие от HU, он способен распознавать высоко консервативные мотивы ДНК и вызывать повороты двойной спирали на 180° относительно их расположения [233]. Белок нуклеоида ИНФ участвует в регуляции большого числа генов *E.coli* [234], в результате чего его иногда рассматривают в качестве глобального регулятора генной экспрессии. Дополнительно ИНФ обладает некоторыми свойствами фактора транскрипции и способен оказывать влияние на доступность σ^{54} -субъединицы РНК-полимеразы для промоторов [235]. Его способность формировать повороты ДНК может оказывать влияние на эффективность транскрипции, способствуя формированию контактов между регуляторными белками и РНК-полимеразой [236]. Однако позднее были описаны и другие механизмы. Тем не менее, основной ролью ИНФ является структурное ремоделирование бактериальной хромосомы за счет формирования поворотов двойной спирали. Количественное содержание этого белка имеет зависимость от фазы роста бактерии. На экспоненциальной фазе содержится около 12 000 мономеров этого белка. Однако при выходе на стационарную фазу роста его количество заметно увеличивается и достигает 55 000 на одну клетку. При этом, углубление в стационарную фазу роста приводит к почти двукратному снижению его внутриклеточного содержания [18].

HU (**H**eat-stable nucleoid protein) – ассоциированный с ДНК белок. Представляет собой гетеродимер, состоящий из двух сходных субъединиц молекулярной массой 9.4 и 9.1 кДа соответственно [241]. Этот белок включает две субъединицы (HU α и HU β), которые на 70% гомологичны по своей аминокислотной последовательности. В *E.coli* HU может находиться как в форме гомодимера, так и в форме гетеродимера, в зависимости от стадии роста бактерии [242]. Считается, что он ограничивает суперспирализацию ДНК

аналогично эукариотическим гистонам. Этот белок имеет высокую гомологию с гистоном эукариот, что встречается достаточно редко среди белков бактериального нуклеоида [243]. Сам по себе HU не обладает специфичностью к какой-либо нуклеотидной последовательности в ДНК, а формирование нуклеопротеидных комплексов с этим белком индуцирует изгибы двойной спирали ДНК. На экспоненциальной фазе роста количество молекул HU составляет от 30 000 до 55 000 на клетку, что свидетельствует о том, что HU, совместно с Fis, вносят основной вклад в поддержание оптимальной конформации нуклеоида бактериальных клеток во время экспоненциальной фазы роста. При этом его количество снижается перед выходом на стационарную фазу роста, а при углублении в неё падает до 10 000-18 000 молекул на клетку [19].

Fis (**F**actor of **I**nversion **S**timulation) – один из самых универсальных белков бактериального нуклеоида и представляет собой относительно небольшую молекулу, обладающую молекулярной массой около 11 кДа. При этом его количество является преобладающим на экспоненциальной фазе роста бактерий. Во время экспоненциального роста Fis может формировать нуклеопротеидные комплексы с ДНК через каждые 200-300 пар нуклеотидов, но сайты для взаимодействия с ним на геномной ДНК расположены нерегулярно и отличаются большим содержанием А/Т-пар. Взаимодействие Fis с ДНК приводит к появлению или увеличению изгиба на 40-90° [228], поэтому Fis можно рассматривать как структурообразующий фактор. Функциональной формой белка является гомодимер. Изначально он был идентифицирован как фактор сайт-специфической рекомбинации ДНК *E.coli* [244]. Он взаимодействует с консенсусной последовательностью ДНК в виде гомодимера. Это последовательность, как правило, имеет длину 17 п.н. и содержит большое количество АТ-пар за исключением положений 2 и 16, где обычно располагаются остатки гуанина или цитозина [245]. Димер Fis изгибает ДНК в области его сайта связывания [246], что позволяет каждому мономеру взаимодействовать со специфическими мотивами двойной спирали [247]. Как и

некоторые другие ДНК-связывающие белки, Fis участвует во многих процессах, связанных с ДНК, таких как транскрипция, репликация и репарация [248]. С использованием методов биоинформатики были выявлены потенциальные сайты связывания для Fis на протяжении всего генома *E.coli*, а данные, полученные с помощью иммунопреципитации хроматина, подтвердили, что он действительно связывается со многими областями бактериальной ДНК, в том числе в межгенных областях [224]. Fis может подавлять или активировать промоторы в зависимости от расположения сайта его связывания относительно сайта связывания РНК-полимеразы либо за счет её вытеснения с целевого промотора, либо за счет влияния непосредственно на транскрипционный комплекс. Такое воздействие повышает порог активации транскрипции и делает её старт маловероятным [249, 48]. Но он также может активировать транскрипцию, осуществляя физический контакт с РНК-полимеразой [250].

Существует корреляция между активностью Fis и генами регулона строгого контроля - «*stringent response regulon*», которые суммируют сложные метаболические изменения в клетке в ответ на недостаток свободных аминокислот [251]. Однако активность Fis не ограничивается генами данного регулона, и он может влиять на транскрипцию опосредованно в рамках всего генома как минимум двумя способами [245, 246]. Во-первых, за счет прямого взаимодействия с сайтами, расположенными перед промоторами, во-вторых, косвенно, супрессируя промоторы генов, кодирующих А- и В- субъединицы ДНК-гиразы, что приводит к релаксации ДНК. Активация транскрипции самого гена *fis* зависит от другого белка нуклеоида - IHF и глобального регулятора транскрипции cAMP-CRP. При этом ингибирование осуществляется его собственным белковым продуктом. Внутриклеточная концентрация Fis на экспоненциальной фазе составляет ~ 60 000 молекул на клетку, а на стационарной фазе снижется практически до нуля [19].

Crp (**C**yclic **A**MP **R**egulatory **P**rotein) - традиционно считается обычным транскрипционным фактором [223]. Он функционирует в виде димера и

связывается с консервативной ДНК-последовательностью, местоположение которой находится возле промоторов и позволяет белку действовать как репрессору или как активатору транскрипции. Также он необходим как кофактор cAMP. Он был одним из первых детально исследованных белков-регуляторов транскрипции, в том числе *lac*-оперона *E.coli*, что позднее было подтверждено с использованием метода Chip-on-Chip. Выявлены сотни областей на хромосоме *E.coli*, с которыми взаимодействует Ctr [267], таким образом, этот белок был отнесен к группе белков нуклеоида. Подобно другим белкам нуклеоида, Ctr эффективно ремоделирует ДНК за счет введения в её структуру изгиба величиной около 90° в области сайта его связывания.

CbpA (Curved DNA Binding Protein) – обеспечивает выживание бактериальных клеток при действии высоких и низких температур. Помимо этого, он необходим для нормального деления клеток. Он образует комплекс с белком CbpM, который является модулятором шаперонов и ингибирует активность CbpA. При этом в отсутствие CbpA происходит протеолиз CbpM под действием белков Lon и ClpAP. Транскрипция CbpA находится под контролем белков Lrp и RpoS [254]. Структурно этот белок является гомологом шаперона DnaJ, но отнесен к белкам нуклеоида, так как в отличие от DnaJ, способен взаимодействовать с изогнутыми участками ДНК [18, 253]. Он функционирует в виде гомо- или гетеродимера, молекулярная масса мономера которого составляет около 34.3 кДа. Взаимодействие с CbpA с ДНК происходит за счет N-концевого домена, отделенного от остальных частей мономера гибкими линкерами. Транскрипция CbpA осуществляется с промотора, распознаваемого σ^{70} и σ^{38} . Его внутриклеточное содержание было зарегистрировано только на поздней стационарной фазе роста *E.coli* и составляло около 15 000 молекул [18], а активация его синтеза CbpA была зарегистрирована в условиях фосфатного голодания [255].

CbpB (Curved DNA Binding Protein) – является идентичным белку Rob, регулирующему инициацию репликации. Функционально-активной формой CbpB является мономер, молекулярная масса которого составляет ~ 33 кДа.

Первоначально CbpV был выявлен при скрининге белков, ассоциированных с анизотропно-изогнутыми фрагментами ДНК [256]. Транскрипция гена *cbpV* активируется белком MarA, при этом сам белок CbpV является позитивным регулятором транскрипции ряда оперонов. Максимальное внутриклеточное содержание данного белка приходится на экспоненциальную фазу роста и составляет ~ 10 000 молекул. На стационарной фазе снижается на 60% от максимального количества [18].

Lrp (**L**euцин responsive **R**egulatory **P**rotein) - изначально был описан как регулятор белков-транспортёров разветвленных аминокислот. Молекулярная масса его мономеров составляет 18.7 кДа, которые, как правило, формируют гомодимеры. На сегодняшний день известно, что Lrp регулирует экспрессию примерно 10% генов *E.coli*, причем в зависимости от регулируемого гена, его активность может модулироваться присутствием молекул лейцина [245]. Регулон Lrp включает гены, вовлеченные в поглощение питательных веществ и метаболизм аминокислот. Этот белок дополнительно принимает участие в формировании микробной вирулентности, участвуя в регуляции генов, кодирующих структурные элементы бактериальных пилей. Взаимодействие с ДНК осуществляется в области, содержащей вырожденную консенсусную последовательность [257], и оказывает сильное влияние на архитектуру ДНК [258]. Позитивную регуляцию гена *lrp* осуществляет белок GadE, а собственный белковый продукт гена *lrp* является репрессором синтеза его собственной мРНК. Максимальное содержание белка Lrp показано на экспоненциальной фазе роста и составляет 1200 – 1300 димеров на клетку. На стационарной фазе его количество снижается примерно в десять раз [18].

StpA (**S**uppressor of **T**4 **P**hage mutant) – первоначально был описан как белок, восстанавливающий способность клеток поддерживать развитие бактериофага T4 [259]. Он является паралогом еще одного белка нуклеоида – H-NS, гомологичен ему на 58%. Молекулярная масса его мономера составляет около 15.4 кДа, который способен формировать гетеродимерные комплексы с H-NS [260]. Отсутствие H-NS приводит к образованию StpA олигомеров более

высокого порядка. Присутствие H-NS в составе гетеродимера придает комплексу повышенную резистентность к протеолизу. На экспоненциальной фазе роста в клетках *E.coli* может содержаться до 25000 молекул StpA, а при переходе в стационар его внутриклеточное содержание снижается до 8000 молекул [18]. Негативным регулятором синтеза StpA является H-NS, а позитивным регулятором – Lgp [261].

H-NS (Histon-like Nucleoid Structuring protein) – активная форма этого белка представляет собой гомо- или гетеродимер. Масса его мономера составляет 15.4 кДа. Для этого белка характерно наличие полярно расположенных ДНК-связывающих доменов, что позволяет ему одновременно взаимодействовать с двумя участками ДНК расположенными на доступном расстоянии и формировать, таким образом, структуру ДНК-H-NS-ДНК. В настоящее время зарегистрировано более 250 мест специфического связывания этого белка, а учитывая оперонную организацию бактериальной хромосомы, это число может увеличиться до 1000 [225]. Активаторами его транскрипции являются белки Fis, CspA и GadX, а ингибирование синтеза его мРНК происходит за счет собственного белкового продукта. Максимальное количество молекул H-NS зарегистрировано на экспоненциальной фазе роста бактерий и составляет около 20 000 молекул на клетку. Снижается до 8 000 молекул при переходе к стационарной фазе роста [18]. Большая часть этого белка в клетке ассоциирована с ДНК и распознает АТ-богатые участки, либо сайты, содержащие мотив TCGATAAATT. В любом случае взаимодействие с ним является важнейшим фактором, определяющим конденсацию геномной ДНК в компактный нуклеоид экспоненциально растущих клетках. Помимо взаимодействия с ДНК, H-NS может связываться с флагеллярным белком FliG. В результате этого взаимодействия изменяется скорость движения флагеллы и, соответственно, подвижность бактериальных клеток [262].

Dps (DNA-binding Protein of Starved cells) – первоначально был описан как белок, ассоциированный с ДНК в «голодающих» клетках или в клетках, находящихся на стационарной фазе роста. Обычно его относят к группе белков

нуклеоида, но подтверждение его непосредственного участия в регуляции транскрипции на сегодня недостаточно. Выделенный белок Dps из клеток *E. coli* обладает ДНК-связывающей активностью [11]. Как правило, максимальный уровень его внутриклеточного содержания наблюдается на стационарной фазе или при необходимости максимальной защиты ДНК от повреждений.

Экспрессия гена *dps* контролируется 5 регуляторными белками. Белки OxyR и MntR являются специфическими регуляторами, которые распознают определённые нуклеотидные последовательности в геномной ДНК. Они активируют (OxyR) или ингибируют (MntR) экспрессию гена *dps* в ответ на внешние стимулы. Для OxyR таким стимулом является окислительный стресс, для MntR – избыток Mn^{2+} . Три остальных белка, так же, как Dps, играют роль архитектурных факторов генома. Два из них, (Fis и H-NS) функционируют во время экспоненциального роста, а при переходе к стационарной фазе их количество в бактериальных клетках падает (Рис. 1).

Оба этих белка селективно ингибируют транскрипцию гена *dps*, опосредованную σ^{70} , не влияя на инициацию синтеза РНК с участием σ^{38} . Fis фиксирует σ^{70} -субъединицу РНК-полимеразы на промоторе *dps*, а H-NS вытесняет ее. На экспоненциальной фазе роста экспрессия гена ингибирована совместным действием этих двух белков нуклеоида, а на фазе стационарного роста, когда отсутствует Fis и сильно снижена концентрация H-NS, освобождается блокированная σ^{70} -субъединица РНК-полимеразы и предоставляется место для присоединения РНК-полимеразы, содержащей σ^{38} -субъединицу (Рис. 1).

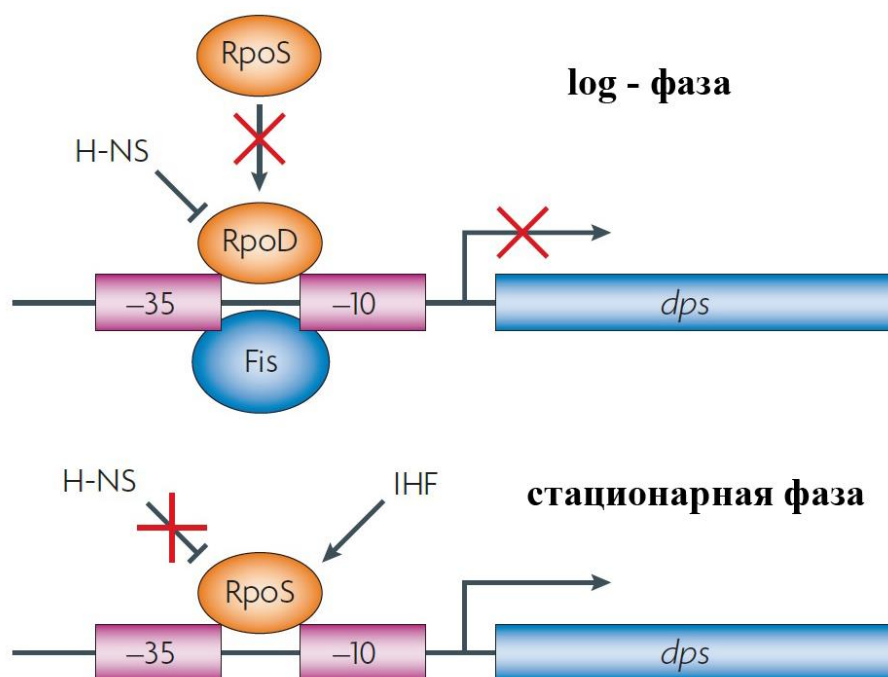


Рис. 1. Схема механизма регуляции промотора гена *dps*

При взаимодействии с ДНК белок IHF изгибает двойную спираль, что облегчает образование транскрипционного комплекса. Его количество во время экспоненциального роста составляет ~6000 молекул на клетку (сопоставимо с Dps), и возрастает в 10 раз при переходе на стационарную фазу, что вносит определённый вклад в индукцию Dps. Долгое время считалось что экспрессия гена *dps* осуществляется с единственного промотора P_{dps} , распознаваемого двумя σ -факторами, σ^{70} и σ^{38} . Однако с помощью алгоритма PlatProm [165] в регуляторной области гена *dps* было предсказано 4 дополнительных промотора (P_1, P'_1, P_2 и P_3), способных инициировать синтез мРНК Dps, и 3 промотора с антисмысловой ориентацией (P_{a1}, P_{a2} и P_{a3}). Они потенциально контролируют синтез регуляторных РНК. Было установлено, что все дополнительные промоторы смыслового направления могут начинать биосинтез РНК, хотя и с меньшей эффективностью, чем P_{dps} [219].

Нативной конформацией Dps является додекамер, а молекулярная масса его мономера составляет около 18.6 кДа. Способность Dps к взаимодействию с ДНК впервые была показана *in vitro* методом задержки в геле нуклеопротеидных комплексов (EMSA). Его внутриклеточное содержание

зависит от фазы роста бактериальной культуры и составляет на экспоненциальной фазе роста (Рис. 2) около 6000 молекул на клетку. Однако при переходе к стационарному росту или при недостатке источников питания внутриклеточное содержание Dps многократно увеличивается и может достигать 180000 молекул [18].

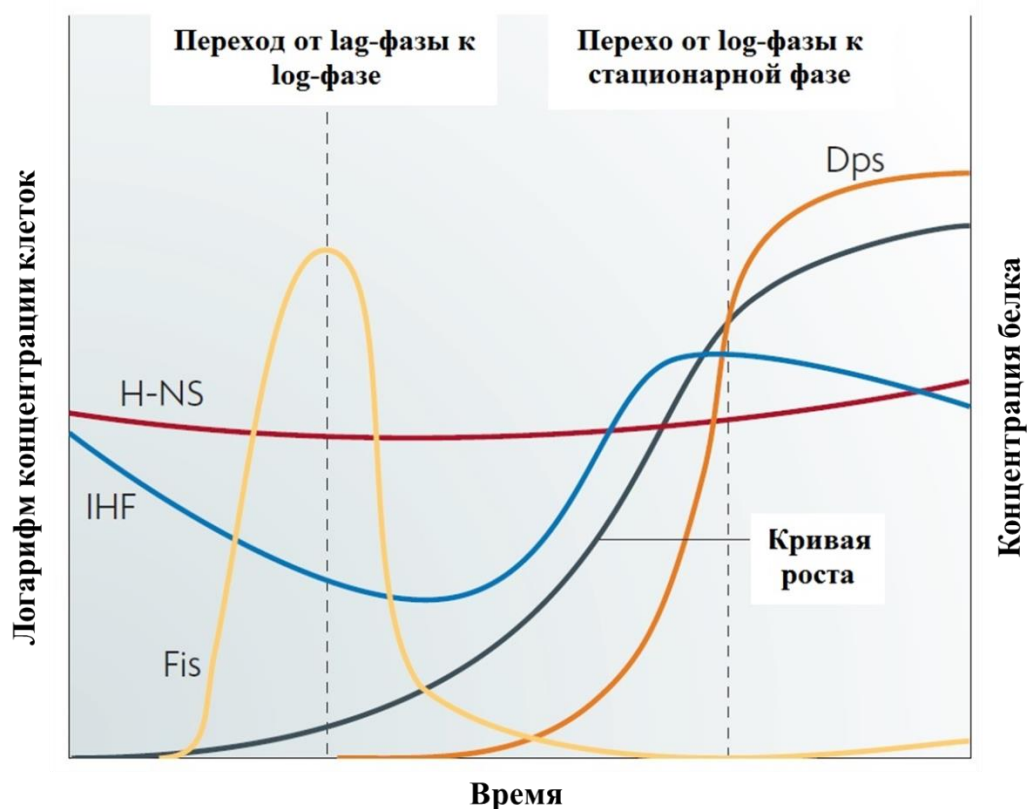


Рис. 2. Среднее значение внутриклеточного содержания четырех основных белков нуклеоида Fis, H-NS, IHF и Dps в зависимости от фазы роста бактерий. Dps – оранжевая кривая; Fis – желтая кривая; H-NS – красная кривая; IHF – синяя кривая; Типичная кривая роста бактерий – черная линия; пунктирные линии отражают этап перехода от lag-фазы к log-фазе и от log-фазы к стационарной фазе, соответственно [18]

Понятно, что белковый состав нуклеоида сильно зависит от фазы роста (Рис. 2), а входящие в него белки выполняют несколько функций, как правило, локализованы на ДНК [19]. Во время экспоненциального роста основными белками нуклеоида являются: Fis>HU>StpA>H-NS, а на стационарной фазе преобладающее количество составляют молекулы Dps. Остальные убывают в следующем порядке: IHF>CbpA>HU>StpA>H-NS>CbpB>DnaA>Lrp>IciA. Абсолютная концентрация в стационарно растущих клетках увеличивается

только для Dps, IHF и CbpA, а уменьшается для H-NS, StpA, Lrp, CbpB, Fis, Hfq, HU и IciA (ArgP).

Таким образом, основными архитектурными факторами бактериального нуклеоида на экспоненциальной фазе роста являются белки Fis и H-NS, тогда как Dps и IHF преобладают во время стационарной фазы. Следовательно, количественное содержание молекул Dps может служить в качестве индикатора функционального состояния клетки. Можно сделать вывод о том, что Dps практически единолично формирует архитектуру бактериальной ДНК на стационарной фазе роста или в условиях аминокислотного голодания. Но учитывая, что Dps может выполнять параллельно или последовательно целый ряд функций в клетке, то его структурно-функциональные характеристики стоит рассмотреть более детально с учетом их физиологической значимости.

1.2 Основные функциональные свойства белка Dps и их характеристика

Белок Dps состоит из 12 одинаковых субъединиц и способен выполнять ряд ключевых, зачастую принципиально разных функций в бактериальной клетке. С одной стороны, он способен взаимодействовать с ДНК, принимая непосредственное участие в формировании ее компактной архитектуры в условиях стационарной фазы роста бактерий, аминокислотного голодания и различных стрессов. Следовательно, этот белок может быть отнесен к белкам нуклеоида. Защита бактериальной ДНК от воздействия таких деструктивных факторов, как активные формы кислорода, химическое и радикальное повреждение ДНК, в условиях окислительного стресса, теплового шока, воздействия УФ и γ -облучения осуществляется непосредственно молекулами Dps, ассоциированными с ДНК [21, 42, 59, 73, 79, 122, 138, 148, 151, 187, 192]. С другой стороны, он способен утилизировать токсичные для клетки ионы Fe^{2+} , окисляя их до Fe^{3+} и накапливая продукты этой реакции внутри своей белковой полости. Таким образом, 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. С третьей стороны, Dps для окисления ионов Fe^{2+} , в отличие от классических ферритинов, в качестве окислителя использует молекулы H_2O_2 . Это позволяет значительно снизить эффективность свободнорадикальных процессов, идущих в клетке во время дыхания [67], которые сопровождаются выделением значительного числа как анион-радикалов, так и молекул пероксида водорода. Продукты этой реакции могут повредить железосерные кластеры ферментов, что приведёт к высвобождению дополнительного числа ионов железа Fe^{2+} . После взаимодействия с окислителями образуются свободные гидроксил-радикалы в ходе реакции Фентона [67, 74]. Таким образом, еще одной, жизненно важной функцией Dps является детоксикация бактериальной клетки, которая осуществляется за счет связывания свободных ионов двухвалентного железа ферроксидазными центрами белка, их окисления с использованием пероксида водорода до Fe^{3+} и депонирование этих ионов внутрь полости додекамера [31, 24, 77, 186, 189, 215]. Несмотря на то, что процесс распределения железа находится в стадии активного изучения [28], результаты исследований клеток *E.coli* на стационарной фазе роста, выполненные с применением Мёссбауэровской спектроскопии, показали, что большая часть железа содержится в цитохромах, бактериоферритинах или ферритин-подобных и железосерных белках [124, 125]. Также, имеются данные, свидетельствующие об участии Dps не только в метаболизме железа, но и меди [176]. Наконец, относительно недавно показано, что Dps, экстрагированный из клеток *M.arborescens*, обитающих в желудке насекомых, катализирует синтез и гидролиз N-ациламинокислот, в частности, N-ацилглутаминов. Это доказывает наличие у этого белка ещё и ферментативной функции, подчеркивающей его возможное участие в поддержании функционирования микробиомных экосистем [147, 148]. Таким образом, белок Dps является участником целого ряда ключевых клеточных процессов, связанных с метаболизмом металлов, защитой генетического материала и поддержанием архитектуры

бактериального генома. Следовательно, изучение его структурно-функциональных особенностей может расширить представления о его роли в бактериальной клетке.

1.3 Dps и суперсемейство белков – ферритинов

Ионы металлов, и в частности железа, входят в состав активных центров многих биомакромолекул и имеют важное физиологическое значение для жизнедеятельности практически всех живых организмов. Одним из основных металлов, который участвует в самых различных биохимических реакциях и входит в состав подавляющего числа белков является железо [13, 74]. Практически все ионы железа, присутствующие в клетке, находятся в связанном состоянии. Тем не менее, присутствие таких сильных окислителей как H_2O_2 , вызывает синтез токсичных для клеточных структур и биомакромолекул соединений железа. Таким образом, присутствие ионов железа, с одной стороны, является крайне необходимым, а, с другой стороны, его соединения могут быть крайне опасны. Во всех живых клетках существует система, контролирующая метаболизм ионов железа, которая в основном представлена белками, входящими в состав семейства ферритинов.

Ферритины играют ключевую роль в окислении свободных ионов двухвалентного железа и их последующем хранении. Это семейство включает достаточно большое число представителей, которых встречаются как у высших организмов, так и у бактерий. Клетки эукариот содержат только классические ферритины, тогда как в клетках прокариот присутствуют как представители классических ферритинов, так и бактериоферритины. У бактерий можно выделить несколько типов белков, выполняющих функцию окисления и хранения ионов железа: Ftn, Vfr и Dps [13, 14]. При этом ферритин Ftn и бактериоферритин Vfr в общих чертах схожи, несмотря на то, что Ftn состоит из субъединиц двух типов (H и L), а Vfr содержит субъединицы только H типа [11, 22, 38, 40, 214]. Оба эти белка содержат 24 субъединицы, образующие

сферу диаметром порядка 12-13 нм и обладают диаметром внутренней полости около 7-8 нм. Их основная биологическая роль заключается в запасании ионов железа путём окисления Fe(II) до Fe(III) и хранении их внутри своей полости [74]. Согласно имеющимся результатам исследований, неорганическое ядро ферритинов может иметь как кристаллическое, так и аморфное строение [14]. Белок Dps отличается от предыдущих двух групп структурно и функционально, но имеет гомологичные белки у некоторых представителей родственных групп прокариотов [36, 145]. Таким образом, можно сделать предположение о том, что Dps является дивергентным представителем семейства ферритинов/бактериоферритинов, что согласуется с результатами рентгеноструктурного анализа данного белка доказывающих, что Dps является аналогом ферритинов, но имеет более высокую степень родства с бактериоферритинами [67].

1.4 Структура белка Dps и его олигомеров

1.4.1. Структура мономера Dps

Первичная структура мономера Dps содержит 167 аминокислотных остатков, формирующих полипептид с молекулярной массой около 18.7 кДа. Структура мономеров Dps в целом схожа, со структурой мономеров Ftn и Vfr, и содержит высоко консервативную последовательность из четырёх спиралей [37, 67, 78]. Исключение представляют особенности структуры их N- и C-концевых участков (Рис. 3). Существует предположение, что представители группы белков Dps исходно могли относиться к гемм-содержащим или металлсвязывающим белкам, но в процессе эволюции приобрели способность взаимодействовать с ДНК [67]. В состав мономера Dps входят четыре спирали (А, В, С и D), идентичные спиральям, формирующим мономер белка Vfr (Рис. 3).

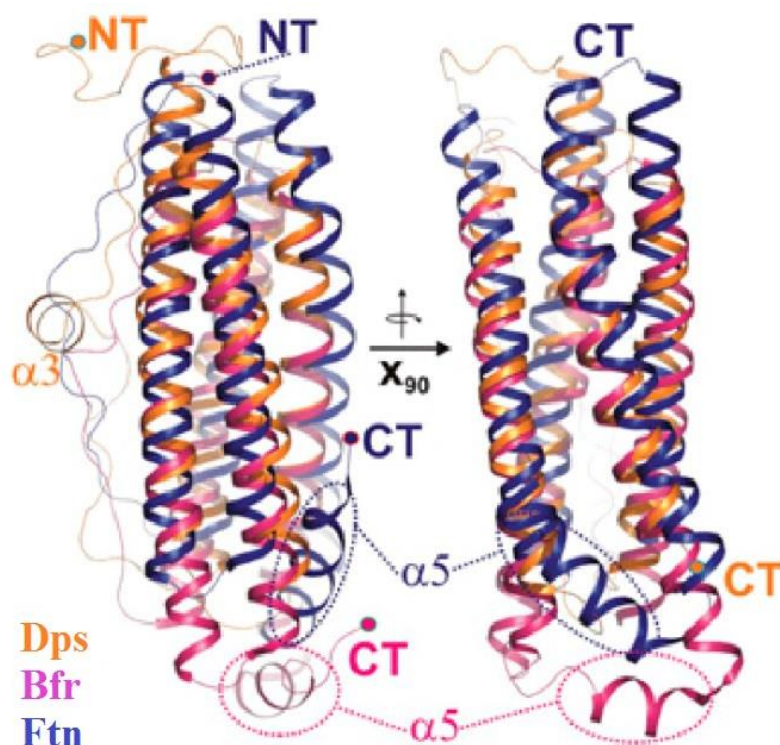


Рис. 3. Две проекции структуры мономеров ферритина, развернутые относительно друг друга на 90° : Ftn – тёмно-синий; Bfr – малиновый; Dps – оранжевый; NT – N-концевой участок мономера; CT – C-концевой участок мономера; $\alpha 3$ – расположение длинной петли, стабилизирующей пары спиральных участков мономеров; $\alpha 5$ – расположение коротких E-спиралей C-концевой области Ftn и Bfr [209]

Пары спиралей (AB и CD) связаны между собой с помощью короткой петли, а пучок, сформированный парами AB и CD, стабилизируется длинной петлёй, растянутой вдоль его поверхности от области, содержащей N-конец, до области, содержащей C-конец мономера. Длинная BC петля бактериоферритина Bfr не формирует вторичную структуру, но содержит короткую E-спираль из 5 аминокислотных остатков в области C-конца мономера. У Dps и большинства его гомологов подобная спираль отсутствует.

Изучение структурных элементов мономеров Dps и Bfr позволяет сопоставить особенности структуры и состава их ферроксидазных центров. В частности, ферроксидазный центр Bfr, расположенный в центре пучка спиралей, был впервые идентифицирован как аналог биметаллического кластера человеческого ферритина H-типа [102]. Он состоит из четырех аминокислотных остатков аспартата и двух аминокислотных остатков

гистидина, которые формируют участок молекулы со способностью связывать ионы металлов. Структурная организация ферроксидазного центра Dps имеет ряд отличий, а именно, в его состав входят один аминокислотный остаток гистидина, два остатка фенилаланина, два остатка лейцина и тирозин, которые образуют области гидрофобных взаимодействий внутри пучка спиралей.

1.4.2. Специфика формирования олигомеров мономерами Dps

Функционально активной формой Ftn и Vfr традиционно является олигомер, состоящий из 24 субъединиц, в то время как нативная молекула Dps обычно имеет додекамерную структуру, и состоит из одинаковых субъединиц (Рис. 4). В результате этого, Dps имеет меньший размер молекулы, и, соответственно, может аккумулировать в своей внутренней полости только до 450 ионов железа, в то время как Vfr накапливает до 4 500 ионов [13, 15, 73, 182].

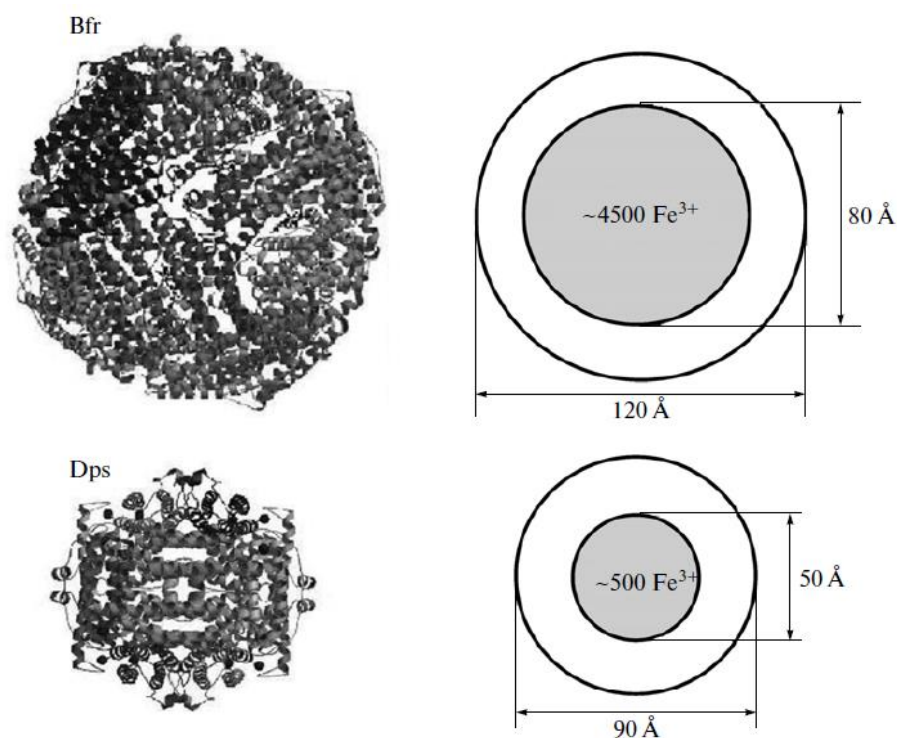


Рис. 4. Сравнение структуры Vfr и Dps [172]

Нативная молекула Dps представляет собой полуу сферу диаметром 8-9 нм, при этом размер её внутренней полости составляет 4-5 нм в диаметре [67]. Процесс сборки додекамера начинается с формирования димеров и тримеров, также как и у классических ферритинов, но дальнейший процесс имеет ряд принципиальных отличий (Рис. 5). Во-первых, наличие короткой E-спирали позволяет мономерам Ftn и Vfr сформировать тетрамер. Во-вторых, ферритины и бактериоферритины обладают симметрией 4-3-2 в отличие от Dps, который имеет 2-3 тип симметрии. В результате таких отличий олигомеры Ftn и Vfr структурно одинаковы с фронтальной и тыльной стороны. В результате наличия такого типа симметрии субъединицы Dps могут иметь более плотную упаковку (Рис. 5с) в составе олигомера и формируют поры меньшего размера, выстланные гидрофобными или гидрофильными аминокислотами (Рис. 5b и 5с).

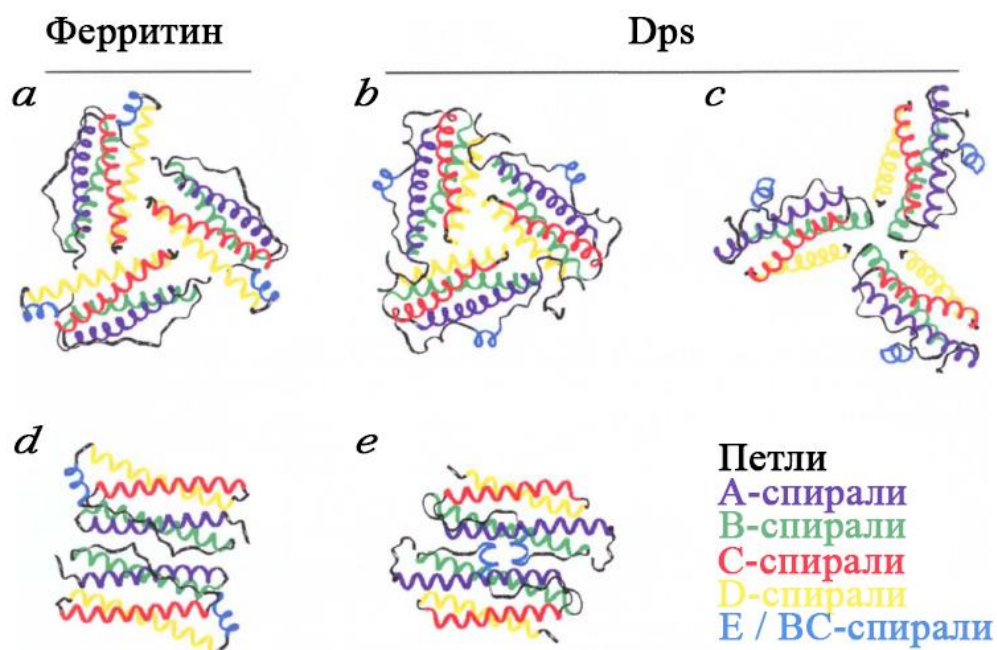


Рис. 5. Схематичное изображение способов сборки мономеров Dps и Vfr. (a) – тримерный участок 24-субъединичного Vfr; (b) – тример Dps, обладающий гидрофильной порой; (c) – тример Dps, обладающий гидрофобной порой меньшего размера; (d) – сборка димера из мономеров в Vfr; (e) – сборка димера из мономеров в Dps [67]

Формирование додекамера Dps осуществляется путём гексамеризации димеров или тетрамеризации тримеров [70]. Несмотря на то, что додекамер Dps является достаточно прочной структурой, введение единичных точечных мутаций может дестабилизировать олигомер на уровне тримера Dps [213]. Додекамер Dps обладает суммарным отрицательным зарядом, но при более детальном анализе распределения заряда по поверхности белка были выявлены области поверхности молекулы, несущие положительный заряд (Рис. 6). Это очевидно обусловлено особенностями аминокислотного состава, а именно, наличием аминокислотных остатков лизина в N-концевых областях мономеров, которые расположены на поверхности додекамера. Считается, что именно эти положительно заряженные участки играют ключевую роль в способности Dps взаимодействовать с ДНК [67].

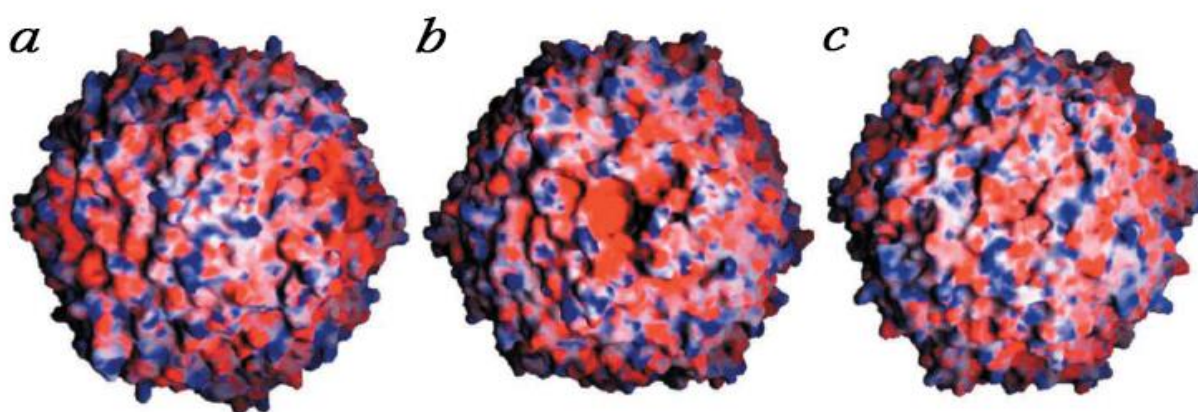


Рис. 6. (a), (b), (c) – Вид с разных проекций на распределение электростатического заряда на поверхности додекамера Dps. Красным цветом обозначены более электроотрицательные области, синим – менее электроотрицательные области на поверхности Dps [67]

Помимо этого, однородность распределения заряда характерна не только для поверхности додекамера, но и для внутренней и поверхностной части глобулы Dps, причём внутренняя поверхность заряжена более отрицательно [147]. Наличие такой разницы между поверхностью и внутренней полостью является основной движущей силой, которая обеспечивает притяжение

свободных ионов железа в клетке к областям молекулы Dps, содержащим центры транслокации и окисления металлов.

1.5 Особенности строения ферроксидазного центра Dps и каналов транслокации ионов железа

Ферроксидазные центры (ФОЦ) – называют участки белковой макромолекулы, в которых происходит окисление ионов железа Fe^{2+} до Fe^{3+} с помощью пероксида водорода, после чего окисленные ионы железа аккумулируются во внутренней полости Dps. Первоначально ФОЦ были выявлены у ферритинов, а затем и у бактериоферритинов [8, 71, 77, 78, 147, 210]. В додекамере Dps ФОЦ расположены в области контакта трех мономеров на расстоянии примерно 2 нм от поверхности макромолекулы и имеют достаточно консервативную структуру. Тем не менее, было зарегистрировано снижение сродства к ионам железа и повышение сродства к ионам цинка при замене остатка аспарагина на остаток гистидина в их структуре ФОЦ Dps из *T.elongatus*. Более того, в таком ФОЦ для окисления используются кислород, а не пероксид водорода [8], а дальнейшие модификации этих ФОЦ и их изучение показали возможность связывания ими не только цинка, но и других металлов с использованием различных окислителей [176].

Транспортировка ионов железа к ФОЦ происходит по специальным каналам, которые содержат специальные центры транслокации. Додекамер Dps обладает каналами двух типов. Они осуществляют перемещение ионов железа во внутреннюю полость и отличаются особенностями строения его олигомера. Первый тип каналов выстлан отрицательно заряженными аминокислотами, преимущественно остатками аспартатов и глутаматов, формирующих гексааквакомплексы $[Fe(H_2O)_6]^{2+}$ в процессе транслокации ионов железа [10, 11, 46, 81], и имеют длину около 2 нм (Рис. 7). Химическое окружение гексааквакомплексов изменяется по мере их продвижения вдоль канала, но их пространственная ориентация до сих пор не установлена. В структуре

додекамера Dps насчитывается 4 таких канала. Их строение характерно для белков Dps, выделенных из большинства бактерий.

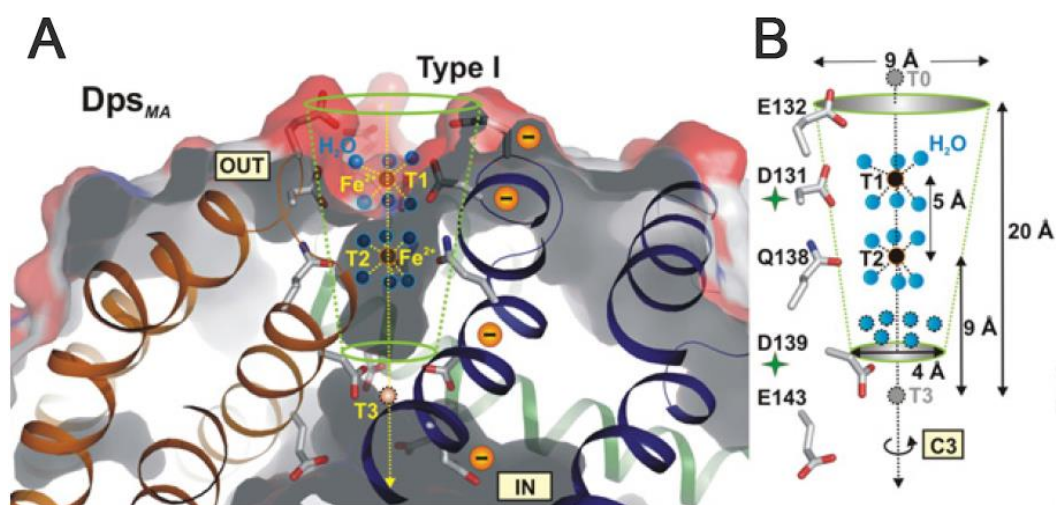


Рис. 7. А – схема среза канала первого типа белка Dps из *M.arborescens*, образованного тремя субъединицами (обозначенными синим, зелёным и оранжевым цветом). Внешний и внутренний диаметры канала равны 9 и 4 Å, соответственно. Направление движения ионов железа обозначено желтой стрелкой; В – схематичное изображение расположения остатков аминокислот, вовлечённых в процесс транслокации ионов железа [21, 209]

Каналы второго типа, также сформированы областями контакта трех субъединиц. Но в отличие от каналов первого типа, они выстланы преимущественно остатками аргинина, вследствие чего имеют меньшее сродство к ионам железа (Рис. 8). Каналы этого типа не так широко распространены и обнаружены только у Dps галобактерий *H.salinarum* [210]. В таком додекамере белка Dps насчитывается 12 таких каналов и возле каждого расположен ферроксидазный центр (Рис. 8).

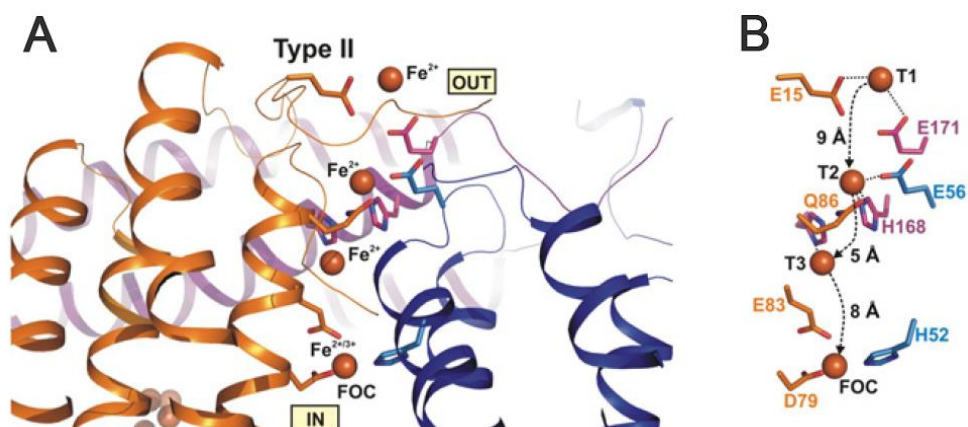


Рис. 8. А – схема среза канала белка Dps второго типа; В – схематичное изображение расположения остатков аминокислот, вовлеченных в процесс транслокации ионов железа [209]

Причина формирования каналов второго типа у галобактерий может быть обусловлена особенностями окружающей среды, в частности для этого таксона характерно наличие высокого содержания соли (до 5М) в среде обитания [151, 152]. Это требует эффективной транслокации дегидратированного железа. Не смотря на то, что эти каналы имеют меньший заряд, чем каналы первого типа, и, соответственно, эффективность их функционирования ниже, такой недостаток нивелирован за счет их большего количества и большей разности потенциалов между внутренней и внешней поверхностью додекамера, обладающего каналами второго типа. Поэтому каналы второго типа могут перемещать сопоставимое количество ионов железа. Более того, они обладают меньшим расстоянием от входа в канал до ферроксидазного центра, а в сочетании с меньшим сродством к ионам железа делает их работу более эффективной. Таким образом, отличия в структуре каналов, ведущих во внутреннюю полость белка Dps различных таксонов, может быть обусловлено особенностями питания, метаболизма и факторами окружающей среды.

1.6 Модели взаимодействия Dps с ДНК

Способность к взаимодействию с ДНК для Dps была идентифицирована как одна из основных его функций [11] Заметим, при этом, не известен ни тип оказываемого влияния на ДНК, ни особенности нуклеотидной последовательности, которая служит для Dps первичной мишенью. Более того, сам механизм формирования нуклеопротеидных комплексов с участием Dps находится в стадии интенсивного изучения. В литературе обсуждается несколько основных моделей, объясняющих механизм взаимодействия Dps с ДНК и формирование компактного нуклеоида [11, 60, 30].

Согласно одной из них, вокруг ДНК формируются два полукольца из шести мономеров Dps [11], которые образуют гексагональное кольцо диаметром 9 нм. Они формируют структуры более высокого порядка (Рис. 9). Такой механизм возможен, однако он предполагает ремоделирование глобулярной формы молекулы в торообразную. Такое изменение конформации Dps и должно сопровождаться экспонированием внутренней поверхности белка наружу. Учитывая необходимость затрат энергии на такую перестройку и стабилизацию структуры макромолекулы, этот процесс маловероятен, но полностью не может быть исключен, так как показана способность димеров Dps взаимодействовать с ДНК [68, 146].

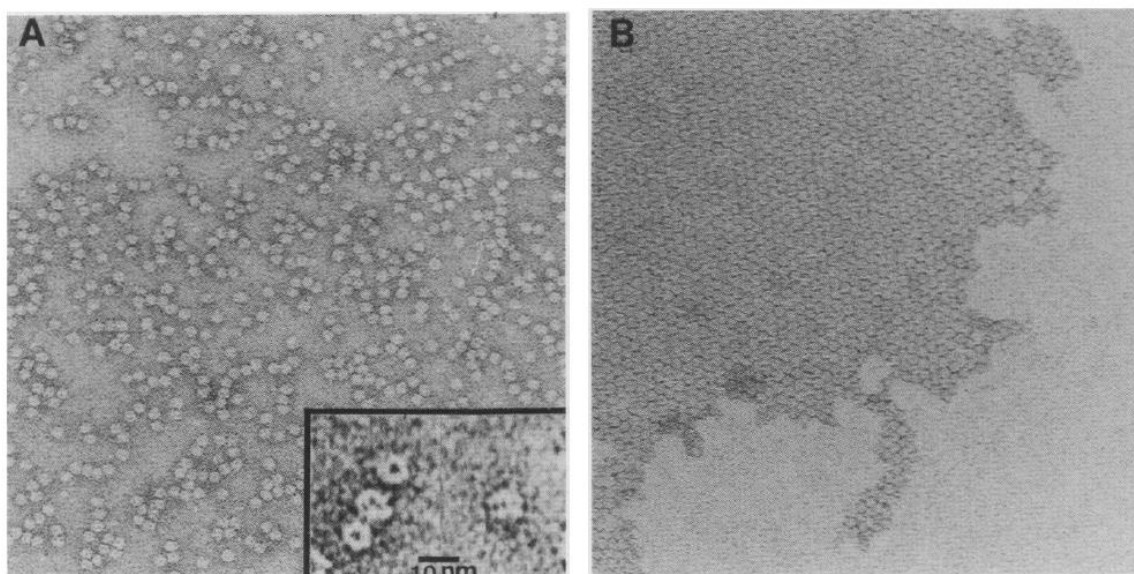


Рис. 9. Данные электронной микроскопии. А – чистый Dps, В – комплекс Dps-ДНК, формирующий гексагональные кольца [11]

На основании того, что поверхности белковой глобулы и сахарофосфатного остова ДНК имеют отрицательный заряд, вторая модель оспаривает возможность непосредственного их взаимодействия. Согласно этой модели, молекулы Dps взаимодействуют с ДНК за счет формирования ионных мостиков в присутствии Mg^{2+} [59, 60, 61]. Однако она не учитывает роль N-концевых участков мономеров Dps, несущих избыточный положительный заряд и содержащих по три аминокислотных остатка лизина и по одному остатку аргинина [122]. В додекамере Dps эти участки расположены на

поверхности белковой молекулы и являются ключевыми элементами третьей модели [60, 61, 62], согласно которой в формировании нуклеопротеидных комплексов участвуют именно эти аминокислотные остатки (Рис. 10).

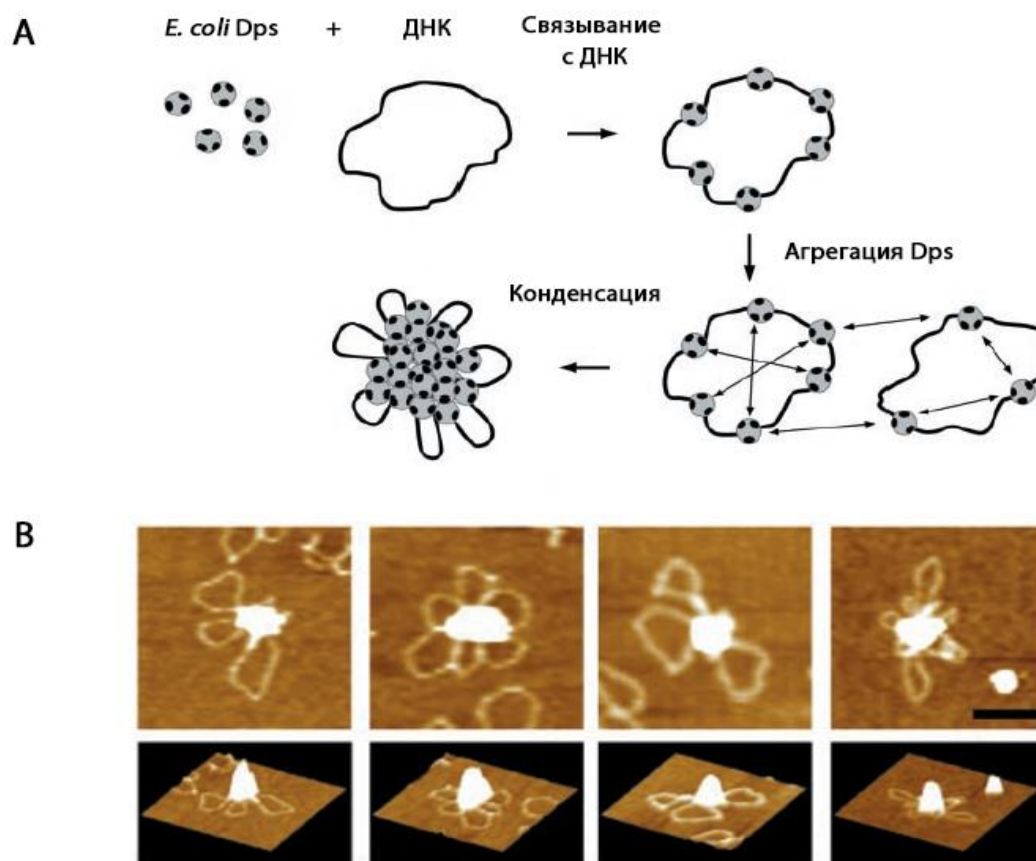


Рис. 10. А – модель конденсации бактериальной ДНК, сформированная на основании механизма самоагрегации Dps. В – данные атомно-силовой микроскопии, подтверждающие сформулированную модель [30]

Более того, роль остатков лизина подтверждается экспериментальными данными, свидетельствующими о том, что мутанты Dps, лишённые всех трех остатков лизина, так же, как и белки семейства Dps, у которых отсутствует N-концевой фрагмент, не способны взаимодействовать с ДНК [24, 32, 143, 209]. Помимо этого, было выявлено снижение эффективности взаимодействия с ДНК молекул Dps, содержащих один остаток лизина вместо трех. Важным фактом является то, что от структуры N-концевого фрагмента зависит не только способность формировать нуклеопротеидные комплексы, но и белковые агрегаты. Таким образом, было высказано предположение, о том, что оба процесса реализуются аналогичным типом межмолекулярных взаимодействий

[30], а зависимость этих процессов от присутствия солей и малых заряженных молекул является весомым подтверждением такой точки зрения [61]. В некоторых работах была зарегистрирована способность молекул Dps, не содержащих лизина в N-концевом фрагменте, формировать нуклеопротеидные комплексы с ДНК за счет других положительно заряженных участков поверхности додекамера [30, 33, 36, 38, 59, 70, 91, 136, 148, 174]. Показана возможность формирования нуклеопротеидных комплексов молекулами Dps из клеток *M. smegmatis* с использованием С-концевого участка мономера [65, 156].

Было установлено, что суперспирализованная плазмидная ДНК, линейная двухцепочечная ДНК и одноцепочечная РНК могут сокристаллизоваться с молекулами Dps [30] без видимых отличий кристаллической структуры [192] и формированием многослойных кристаллов большого размера (Рис. 11).

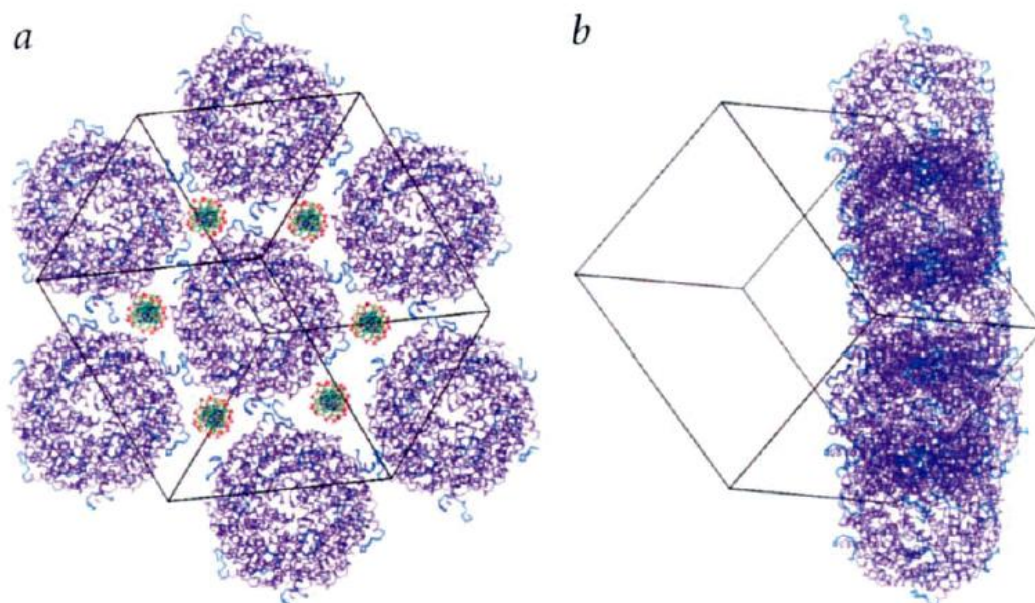


Рис. 11. Псевдо-гексагональная укладка в кристалле Dps и модель его взаимодействия с ДНК: центральная (а) и параллельная (b) проекции. Фиолетовым цветом обозначены додекамеры Dps, синим – N-концы каждого из мономеров, зеленым – двойная спираль ДНК, красным – фосфатные группы ДНК [67]

Формирование таких кристаллических структур обычно мало совместимо с реализацией биологических функций, но в случае со-

кристаллизации ДНК с Dps это может быть рассмотрено как одна из систем дополнительной защиты генетического материала на стационарной фазе роста бактерий от воздействия повреждающих агентов. В таком случае, увеличение количества молекул Dps при переходе на стационарную фазу может быть хорошим подтверждением такого предположения [20, 70, 171]. Однако остаются не понятными два момента. Во-первых, каким образом формируются упорядоченные кристаллы? А во-вторых, каким образом происходит возвращение упакованного таким образом генома в функционально-активное состояние, и какие факторы могут регулировать данные процессы?

И так, Dps является главным структурообразующим фактором нуклеоида во время стационарной фазы роста, аминокислотного голодания и воздействия повреждающих агентов. Однако полного понимания механизмов его взаимодействия с бактериальным геномом, находящимся в активном состоянии, на сегодняшний день нет, и этот вопрос изучается различными исследовательскими группами. Помимо этого остается открытым вопрос о том, каким образом хроматин, конденсированный во время аминокислотного голодания, может быть декомпактизован, особенно, учитывая прочность нуклеопротеидных комплексов образованных Dps с ДНК? Имеющиеся данные свидетельствуют о возможном сродстве Dps к определенным особенностям структуры двойной спирали ДНК, но способ их распознавания, а также закономерности распределения Dps по бактериальной хромосоме остаются не известными. Очевидно, что для всестороннего понимания данных вопросов необходимо проведение дополнительных исследований с привлечением широкого спектра методов, позволяющих провести глубокий анализ.

1.7 Клеточные процессы с возможным участием Dps

1.7.1 Dps как регуляторный белок

Физиологическая роль Dps не ограничивается только его участием в процессах конденсации ДНК и окислении ионов железа. Так, являясь структурным белком нуклеоида Dps, также как другие белки этой группы, например HU и H-NS, теоретически может дифференцированным образом влиять на экспрессию разных генов. Было установлено, что спектр белков, содержащихся в клетках дикого типа и профиль белков, содержащихся в клетках, лишенных гена *dps* после трехдневного голодания отличаются [11]. Более того, был зарегистрирован аналогичный плеiotропный эффект для клеток *E.coli*, не содержащих гена *hns*, регуляторная роль которого на сегодня не вызывает ни малейшего сомнения [249]. Эти изменения могут быть вызваны не прямым регуляторным воздействием Dps на экспрессию конкретных генов, а отсутствием его неспецифической конкуренции с настоящими факторами транскрипции за связывание с соответствующими сайтами на ДНК. Существуют данные, свидетельствующие о том, что Dps-подобные ферритины являются генетическими активаторами в клеточной культуре в условиях окислительного стресса [265]. Функционируя в бактериальной клетке, подобно гистонам эукариотических клеток, Dps может подвергаться обратимым модификациям, изменяя тем самым доступность ДНК для транскрипционного аппарата. Однако механизм, способный обеспечить избирательность таких модификаций, пока не известен. Некоторые авторы допускают возможность проявления регуляторных свойств Dps через его взаимодействие с факторами транскрипции на промоторах конкретных генов [137]. И хотя истинный механизм может оказаться совокупностью всех предполагаемых, включая регуляторную роль Dps в клетке или еще более сложные, в настоящее время нет однозначных экспериментальных данных, доказывающих способность Dps осуществлять целенаправленную регуляцию экспрессии конкретных генов.

Поэтому исследование регуляторной функции Dps через анализ генной экспрессии современными методами, также как анализ способности этого белка формировать комплексы с промоторными участками разных генов, является актуальной задачей. Особого внимания при этом заслуживает поиск мишеней регуляции в стрессовых условиях, так как жизненно важной при этом становится сохранность генетического аппарата клетки, которая обеспечивается его Dps-опосредованной компактизацией [121, 137, 215, 266].

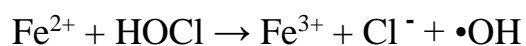
1.7.2 Роль Dps в обеспечении стрессовой устойчивости клеток *E.coli*

В неблагоприятных условиях роста в клетках *E.coli* Dps является одним из немногих белков, которые продолжают активно синтезироваться, выполняя защитную функцию при окислительном стрессе, высоком давлении, УФ и гамма облучении, температурном стрессе, повышенной концентрации ионов меди и железа [81, 85, 121, 137, 192, 266, 267, 268]. Было показано, что удаление *dps* приводит к снижению жизнеспособности клеток *E.coli* в экстремально кислых (рН 2.0) и щелочных (рН 12.0) средах [121, 137, 85, 266].

Наиболее исследованной и, по-видимому, наиболее ярко выраженной является защитная роль Dps при окислительном стрессе. Этому стрессу подвержены клетки *E.coli* благодаря барьерным механизмам, выработанным организмами-хозяевами. Так, кислотность желудочного сока составляет 1-2 единицы рН, а среда в фаголизосоме имеет рН 4.5. Такая кислотность приводит к неизбежному повреждению биологических макромолекул и остановке работы многих цитоплазматических ферментов [269]. Кислотный стресс особенно разрушителен для ДНК. Он приводит к потере пуриновых и пиримидиновых оснований, причем скорость этого процесса увеличивается с понижением рН [270]. Такие генетические изменения, как правило, сопровождаются образованием неспаренных нуклеотидов и появлением ошибок при репликации ДНК.

Для клеток *E. coli* и других подобных патогенных бактерий выделяют три основные защитные стратегии, обеспечивающие выживание в кислой среде. Во-первых, это возможность изменять состав клеточной стенки. Во-вторых, наличие специальных ферментных систем, работающих на поддержание кислотного гомеостаза внутри клетки. В-третьих, эффективное обеспечение защиты и восстановления поврежденных биологических макромолекул [271]. Связанный с ДНК Dps препятствует ее кислотному повреждению, т.е. вносит вклад в механизмы третьего типа [85, 266, 137]. Не исключено также, что Dps может выступать в роли регуляторного белка, усиливая экспрессию генов, кодирующих белки репарационных механизмов и белки, поддерживающие значения pH на физиологическом уровне. Но особое значение имеет способность Dps снижать в клетках концентрацию пероксида и других активных форм кислорода.

Кроме реакции Фентона, гидроксил радикал является побочным продуктом многих метаболических процессов. Еще одним природным фактором, приводящим к образованию гидроксил радикалов, является гипохлорная кислота (HOCl). Во время инфицирования организма хозяина *E.coli* подвергается захвату фагоцитами, после чего нейтрофилы и макрофаги высвобождают HOCl в высоких концентрациях. Этот процесс носит название «респираторный взрыв». Он происходит за счет пероксидного окисления ионов хлора. Гипохлорная кислота вызывает сильные повреждения клеточных мембран, белков и нуклеиновых кислот, которые могут стать смертельными для клетки. Кроме этого HOCl, также как пероксид водорода, приводит к образованию гидроксил радикала:



Поэтому, устойчивость к пероксиду водорода, также как гипохлорной кислоте обеспечивается по большей части одними и теми же белками, включая Dps. Они способны к детоксикации активных форм кислорода, а также белками, вовлеченными в репаративные процессы в клетке [28]. Активация экспрессии соответствующих генов является первым этапом реализации

защитных механизмов. Белок Dps, наиболее изучен, как белок стационарной фазы роста, являющийся неотъемлемой частью защитной системы клеток от окислительного стресса [12]. В это время клетки наиболее подвержены окислительному стрессу, но и более устойчивы к действию пероксида водорода, чем активно растущие клетки. Это обусловлено не только каталазной активностью Dps, но и повышенным уровнем экспрессии других белков, защищающих клетки от повреждающего действия пероксида водорода, таких как, НРП-каталазы и ферментов репарации. Несмотря на то, что эти белки важны для выживания в условиях окислительного стресса, эксперименты с клетками, содержащими мутантный ген *dps*, продемонстрировали значимость этого гена в обеспечении их устойчивости к воздействию H_2O_2 [11, 137]. Было выдвинуто предположение о том, что защитные функции Dps в условиях окислительного стресса обеспечиваются его физическим связыванием свободных участков ДНК и экранированием генетического материала от повреждающего воздействия активных форм кислорода [121]. Однако Dps не защищает ДНК от других опасных агентов, способных вызвать ее повреждение (например, алкилирующие агенты). Поэтому гипотеза о только физическом экранировании ставится под сомнение.

Было установлено, что Dps способен предупреждать разрушение макромолекул, вызванное реакцией Фентона, изолируя гидроксил радикалы внутри белковой полости [20] за счет перехода триптофана в положение 52, расположенного вблизи ферроксидазного центра, в радикальную форму. По существу, этот остаток триптофана предотвращает диффузию новообразованных гидроксил радикалов из ферроксидазного центра во внешний раствор [20, 215]. Наличие триптофанового остатка вблизи ферроксидазного центра было обнаружено у подавляющего большинства Dps-подобных белков, что свидетельствует о большом значении этой ловушки гидроксил радикалов в структуре белковой молекулы.

Также, обнаружено присутствие белка Dps в структуре наружной мембраны клеток [272, 273]. Функциональное значение такой локализации пока

до конца не понятно. С одной стороны, не исключено, что она обусловлена участием Dps в механизмах, снижающих чувствительность бактерий к антибиотикам и/или повышающих их противостояние бактериофагам. Такая роль не противоречит сложившимся представлениям о защитной функции Dps в ответ на различные стрессовые воздействия. С другой стороны, если Dps способен связывать не только ДНК, но и, например, малые РНК, не исключено, что он может участвовать в обмене генетическим материалом между бактериальными клетками.

1.8 Перспективы прикладного использования металлсодержащего белка Dps и его нуклеопротеидных комплексов

Проектирование и создание объектов наноразмерного диапазона на основе гибридных биоорганических материалов представляет большой научный и практический интерес в различных областях науки и техники [3, 209]. Такие молекулы обладают рядом уникальных свойств, так, с одной стороны, они имеют фиксированный внутренний объем, что позволяет эффективно контролировать размерный фактор неорганического ядра частицы, с другой стороны, наличие органической оболочки препятствует двухстороннему обмену кислородом. В результате этого сохраняются свойства исходного материала. При этом создание упорядоченных или одиночных структур размером менее 10 нм традиционными методами является труднореализуемой задачей. Наиболее перспективными для таких целей являются биомакромолекулы, на основе которых можно создавать не только двумерные конструкции, но и развитые в пространстве структуры с заданными характеристиками и свойствами. Наиболее яркими примерами в этой области могут служить ферритин-подобные белки и Dps в частности, способные аккумулировать ионы различных металлов и их соединения внутри своей полости (Рис. 12).

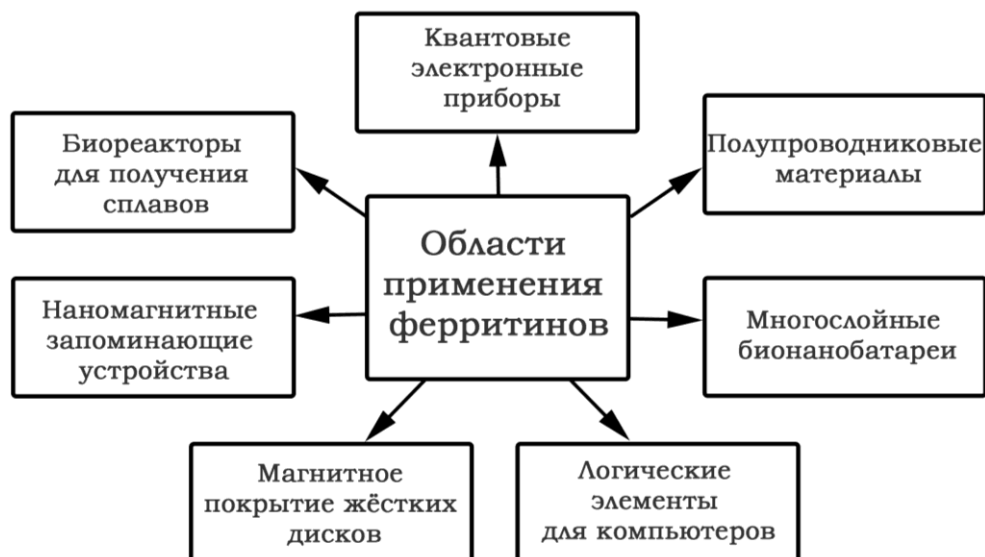


Рис. 12. Области прикладного использования результатов исследования белков-ферритинов

Их использование может затрагивать самые разные прикладные направления нанoeлектроники, спинтроники, биотехнологии и медицины. На их базе вполне реалистично создание биореакторов для получения молекулярных сплавов, создание квантовых электроприборов, проектирование полупроводников, компактных устройств аккумуляции электроэнергии, логических элементов, а также систем адресной, биосовместимой доставки веществ в клетке.

1.8.1 Биореакторы для получения молекулярных сплавов

На современном этапе развития технологических процессов производства современных устройств и механизмов, наиболее высокие требования предъявляются к гомогенности используемых материалов. При этом совершенствование таких технологических процессов уже практически невозможно с использованием стандартных химических и физических методов, традиционно используемых для решения таких задач, так как они уже достигли своих разрешающих пределов и имеют целый ряд критических недостатков, значимых в наноразмерном диапазоне. Таким образом, на текущий момент проводится активный поиск способов преодоления таких барьеров. Наиболее

перспективным в этой области является использование белковых молекул, способных модифицировать и аккумулировать ионы различных металлов в качестве реактора и контейнера для синтеза и хранения требуемых веществ [9, 51, 52, 119, 127, 128, 129, 139, 178, 182]. Для реализации такого процесса существуют два принципиально разных подхода [109].

В основе первого подхода лежит свойство белковых макромолекул к обратимой денатурации при плавном изменении рН внешнего раствора в присутствии фосфорной кислоты. Смещение величины рН в кислую область приводит к диссоциации мономеров белка из состава нативной молекулы. В таком состоянии раствор очищают от исходно ассоциированных с молекулой ферритина ионов железа с помощью диализа, после чего систему насыщают ионами нужного металла или металлов. После этого осуществляют изменение величины водородного потенциала к физиологическому значению. Остатки фосфорной кислоты и металла связываются с внутренней частью субъединиц ферритина, что приводит к их локализации внутри белковой полости после восстановления олигомерной формы белка при нормальном значении рН (Рис. 13А).

Реализация второго подхода основана на способности металлических, например CoPt , или кристаллических, например CdS , частиц диффундировать внутрь белковой полости с последующим образованием неорганического ядра (Рис. 13В). При этом важным является тот факт, что изменения концентрации одного или второго вещества позволяют влиять на размер наночастиц внутри белковой полости [187, 193]. Помимо этого необходимо принимать во внимание, что при минерализации таких наночастиц большое значение имеют характеристики внутренней полости. Различное сочетание катионов или анионов будет влиять на состав комплексного соединения, формируемого внутри белковой полости [182].

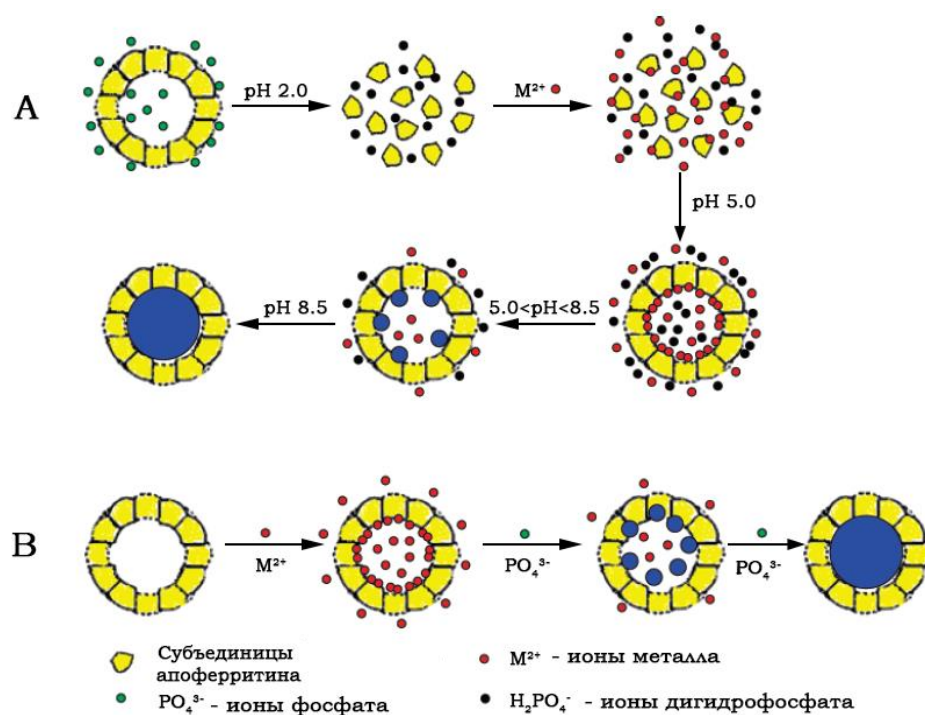


Рис. 13. Схема реализации двух подходов в создании наночастиц с использованием молекул ферритинов: А – метод обратимой денатурации белка; В – метод диффузии [109]

Полученные различными авторами данные свидетельствуют о возможности синтеза разнообразных соединений с использованием таких подходов, в том числе обладающих как металлической, так и кристаллической структурами. В частности, имеются результаты исследований, в которых показана такая возможность для наночастиц CoPt [187], Pd [183], Ag [63, 97], Cu [34, 55] Ni [63, 64], Co [63, 64], Au/Pd [172], Mn_3O_4 [128], $Co(O)OH$ и Co_3O_4 [51, 178], $Cr(OH)_3$ и $Ni(OH)_3$ [139], $Eu(O)OH$ и TiO_2 [95], а также сульфидов [193], фосфатов [109], селенидов различных металлов [82, 197]. Следует отметить, что ряд публикаций посвящен исследованию возможности использования молекул Dps для проведения такого синтеза [9, 10, 83, 88, 89].

1.8.2 Полупроводниковые приборы

Производство полупроводниковых приборов на протяжении последних пятидесяти лет производится с помощью фотолитографического метода, который позволил уменьшить их размер в несколько раз, но на сегодня этот

способ достиг предела своих возможностей [196]. Такая ситуация привела к тому, что последние несколько лет не происходит развития технологий производства устройств хранения информации, что приводит к сокращению емкости соответствующего рынка сбыта. Решение этой проблемы может быть найдено с использованием ферритинов в качестве основы для метода двумерной кристаллизации. Особенно этот метод может оказаться актуальным с учетом того, что в белковой полости ферритинов успешно синтезирован широкий спектр соединений с различными свойствами [9, 10, 34, 51, 55, 63, 64, 82, 83, 88, 89, 95, 97, 109, 128, 139, 172, 178, 183, 187, 193, 197]. Одной из областей применения этих фундаментальных научных результатов может оказаться создание таких миниатюрных полупроводниковых устройств, как одноэлектронный транзистор и транзистор с плавающим затвором [199], а также тонкоплёночный транзистор [94, 139]. Основной задачей реализации такой технологии является получение максимально упорядоченного расположения молекул белка на поверхности кремниевой подложки (Рис. 14).

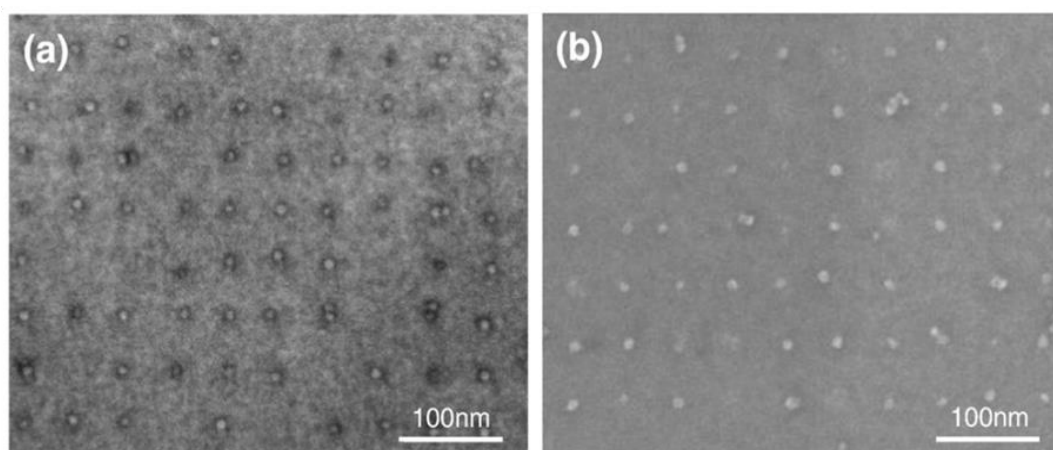
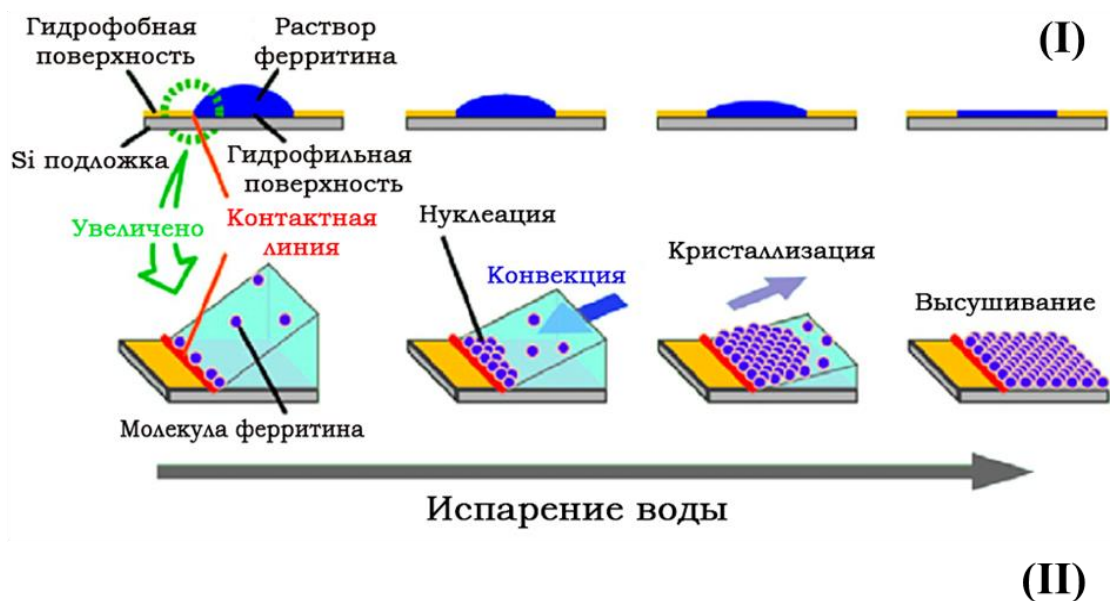


Рис. 14. (I) – Схема реализации этапов метода двумерной кристаллизации ферритина [199]; (II) –Изображения расположения ферритиновых наночастиц, полученные с использованием просвечивающей электронной микроскопии, до (a) и после (b) отжига [100]

Однако одноименный заряд поверхности белковой глобулы и подложки несколько усложняет реализацию данного процесса, но введение на поверхность подложки, например, 3-аминопропил-триэтоксисилана, снимает эту проблему [98, 99, 202]. Более того, это не единственный способ снизить или совсем исключить электростатическое отталкивание между поверхностью подложки и белка. В случае некоторых белков, используемых для таких целей, возможна модификация непосредственно их поверхности, которая приведет к активации гидрофобных взаимодействий, эффективность которых можно

контролировать в дальнейшем за счет изменения свойств и состава буферного раствора [199].

В результате реализации этапов метода, приведенного на Рис. 14-(I), происходит формирование слоя молекул, содержащих в своей внутренней полости соединения железа или других металлов. Но это не является конечным результатом. Для создания конечного изделия необходимо провести высокотемпературный отжиг, который выполняет две функции (Рис. 14-(II)). Однако, если проводить отжиг в условиях конкретной атмосферы, например в потоке водорода, то можно получить восстановленную форму металлического железа из его оксида, что является не маловажным и удобным технологическим фактором [76, 132, 133, 134, 135, 195, 203]. Однако эта методика пока не внедрена в производственный процесс, так как не обеспечивает необходимой регулярности расположения частиц на поверхности подложки, что является весьма значимым для пользовательских характеристик конечного изделия.

1.8.3 Источники питания

Возможность насыщать молекулы ферритинов или ферритин-подобных белков, позволяет не только повысить технологические характеристики полупроводниковых приборов, но и элементов питания. В частности, группой авторов была предложена и обоснована концепция создания элементов питания за счет чередующегося расположения молекул белка, содержащих разные металлические ядра для создания миниатюрных источников питания [39,188]. Данная концепция базируется на нескольких идеях, а именно: получаемые слои молекул белка должны отличаться окислительно-восстановительным потенциалом; в структуре такого элемента питания должны присутствовать анод и катод; слои молекул должны быть отделены друг от друга проницаемой для ионов мембраной; максимальная эффективность передачи электронов от ячейки к ячейке. Для формирования ячеек авторами было предложено использовать как соединения железа ($\text{Fe}(\text{OH})_2$), так и соединения кобальта или

никеля ($\text{Co}(\text{OH})_3$), ионы которых могут мигрировать через мембрану в процессе зарядки и разрядки батареи. Однако присутствие мембраны может оказаться не обязательным в случае, если соединения данных металлов прочно иммобилизованы на подложке.

Технология создания таких элементов питания заключается в нанесении молекул белка, содержащих соединения железа внутри своей полости на подложку из легированного кремния или с нанесенным золотым покрытием (Рис. 15). Далее, с противоположной стороны подложки формируется второй слой из модифицированных молекул белка, внутри которых содержатся соединения Co или Ni . По окончании формирования таких слоёв происходит закрепление анода в той части элемента питания, которая содержит соединения железа, а катода – к той части, которая содержит соединения кобальта или никеля [188].

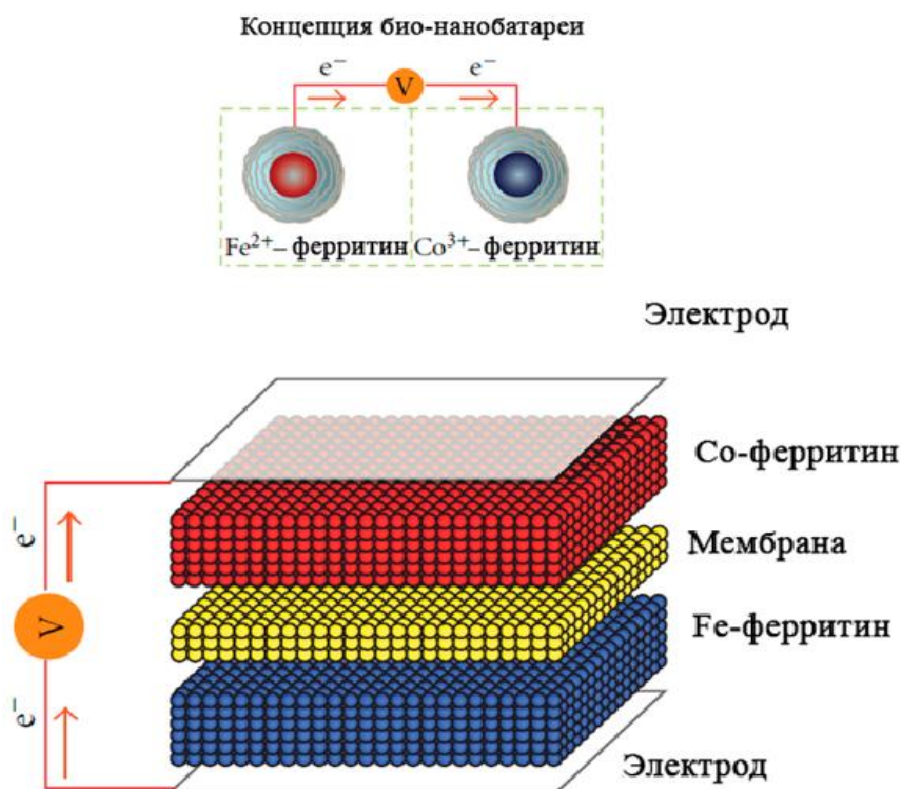
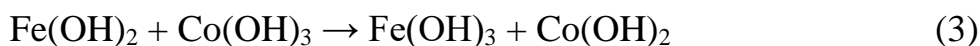
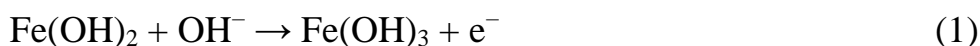


Рис. 15. Схема создания нанобатареи с использованием ферритинов

В процессе замыкания электрической цепи происходит перемещение электронов от анода к катоду по внешнему контуру. Таким образом, в ходе

работы элемента питания протекает несколько реакций, первая (1) протекает с образованием одного электрона e^- и поглощением одного иона OH^- , в ходе реакции (2) выделяется один ион и поглощается один e^- . Суммарная реакция протекания данного процесса имеет вид (3).



Лимитирующим фактором для протекания электрического тока в такой схеме будет являться диффузия молекул белка к электродам, а емкость элемента питания будет зависеть от размеров подложки и толщины напыления. В случае, когда молекулы белка присоединены к поверхности анода или катода химически, и, тем самым, достаточно прочно закреплены на их поверхности, наличие ион-проницаемой мембраны не требуется. Полученные данные свидетельствуют о том, что при использовании золота в качестве материала для изготовления анода и катода окисление неорганических ядер не зарегистрировано [92, 120, 207]. При этом было показано, что не достаточно прочная иммобилизация молекул белка и отсутствие мембраны, как правило, приводит к быстрой разрядке такого элемента питания [211].

1.8.4 Перспективы проектирования и создания макромолекулярных конструкций с применением методики «ДНК-оригами»

Значимость способности белковых молекул взаимодействовать с ДНК и формировать соответствующие нуклеопротеидные комплексы имеет огромное физиологическое значение. Тем не менее, эта способность может быть востребована и для решения конкретных прикладных задач. В частности, для создания иммобилизованных или подвижных структур на основе молекул белка и ДНК с упорядоченным расположением белковых молекул. Для этих целей разработана методика «ДНК-оригами», позволяющая создавать двух- [155, 163] и трехмерные конструкции [35, 66, 169, 217] на основе молекул ДНК с заранее

заданной пространственной конфигурации. Концепция технологии «ДНК-оригами» была предложена в начале восьмидесятых годов прошлого века и на сегодня представляет перспективное прикладное направление, сформированное на стыке химии, молекулярной биологии и биофизики, позволяющая проектировать и создавать искусственные, самособирающиеся ДНК-структуры с заданными размерами и свойствами (Рис. 16). Не смотря на то, что данное направление носит название «ДНК-оригами», в целом оно охватывает не только область применения свойств нуклеиновых кислот, но и белковых молекул и нуклеопротеидных комплексов.

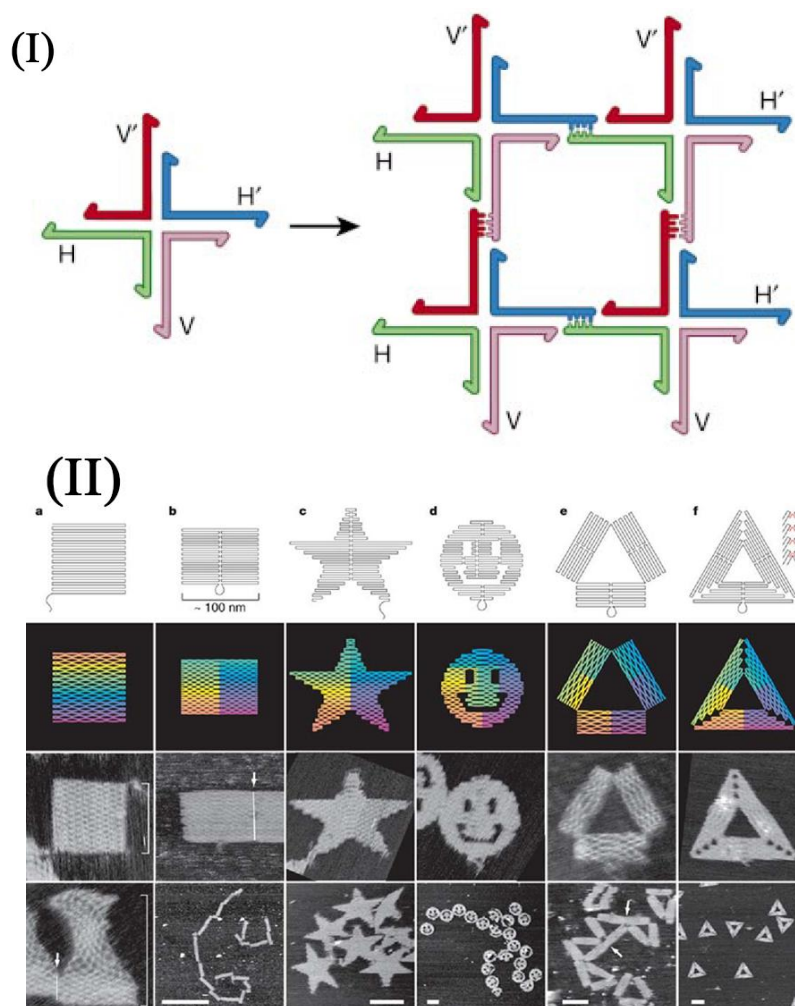


Рис. 16. (I) – Схема процесса самосборки двумерной разветвлённой ДНК-молекулы; H, H', V, V' - липкие концы ДНК-молекулы, по которым происходит лигирование с соседними молекулами. (II) – АСМ-изображения полученных двумерных ДНК-структур различной формы

Основы концепции этой технологии были сформулированы и опубликованы Н. Зиманом (Nadrian Seeman) в 1982 году [162], после чего это направление получило достаточно широкое распространение. В основе данной технологии создания макромолекулярных конструкций лежит проектирование нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК таким образом, чтобы за счет расположения комплементарных участков сайтов лигирования получить ДНК-объект заданной пространственной формы [161, 162]. На сегодня считается, что молекула ДНК является всесторонне изученным объектом как с химической, так и с физической точек зрения и может служить в роли каркаса конструкции, в который вмонтированы молекулы белка, обладающие сродством к той или иной нуклеотидной последовательности или способные распознавать тот или иной элемент пространственной структуры ДНК. Особенности химической структуры этих молекул позволяют проектировать конструкцию, с одной стороны, хорошо поддающуюся адаптивной изомеризации, а с другой - отличающуюся высоким уровнем контроля расположения ее элементов [205].

С начала XX-века спроектировано и создано достаточно большое количество структур с использованием технологии «ДНК-оригами» за счёт совершенствования как самих способов проектирования с использованием специализированного программного обеспечения, так и за счет способов аттестации конечной конструкции (Рис. 16-II). При этом масса некоторых таких конструкций сопоставима или превышает массу рибосомы [108, 123, 140, 160, 163, 200].

Подходы для реализации технологии «ДНК-оригами» можно разделить на два типа. В основе первого лежит использование одной длинной одноцепочечной кольцевой молекулы ДНК, например плазмиды, в качестве каркаса, пространственная конфигурация которого фиксируется короткими одноцепочечными фрагментами ДНК, комплементарными к конкретным нуклеотидным последовательностям каркаса. Их принято называть «скрепками». Помимо этого, такие «скрепки» могут быть использованы как

элементы системы координат и факторы ориентации различных гетероэлементов в составе конструкции, в частности молекул белка [56, 113, 114, 143, 158], неорганических наночастиц [130], вирусных капсид [170] или пептидов [191]. В основе второго подхода лежит использование коротких одноцепочечных фрагментов ДНК, которые имеют в своем составе комплементарные области, а также сайты лигирования. Такой подход позволяет постепенно наращивать структурные элементы, за счет их самосборки в элементарные ячейки. Впоследствии они объединяются в конечную конструкцию за счет их обработки ДНК-лигазой.

Известны результаты экспериментов, продемонстрировавшие возможность получения ДНК-структур, содержащих такие гетероэлементы, как упорядоченно расположенные золотые и серебряные наночастицы [25, 164, 177], карбоновые нанотрубки [126] и молекулы фуллерена [46]. Показана возможность перспективного сочетания технологии «ДНК-оригами» и получения металлизированных фрагментов ДНК для решения прикладных задач электроники и фотоники [111, 159]. Более того, создание гетеромолекулярных структур, объединенных в единую конструкцию [201] находит применение для адресной доставки в клетки антител, гормонов, меток, лигандов [149], а также для создания устройств, способных осуществлять движение [44, 110, 139, 166], а также для повышения эффективности кристаллографических данных.

Таким образом, исследование закономерностей, лежащих в основе формирования искусственных самособирающихся ДНК-конструкций, содержащих гетеромолекулярные включения, является актуальной как прикладной, так и фундаментальной задачей. Их результаты могут быть использованы для решения конкретных прикладных задач не только биотехнологии и нанoeлектроники, но и могут найти применение в области современной медицины [54, 149]. При этом, введение в качестве гетероэлемента в такие конструкции металлсодержащих белков, например Dps, может оказаться крайне перспективным за счёт его не большого размера,

возможности модификации поверхности, синтеза в его полости соединений металлов с заданными свойствами и составом, а также способностью взаимодействовать с ДНК. Сочетание таких свойств дает целый ряд конструктивных преимуществ при создании конструкций с высокой пространственной регулярностью расположения белковых частиц. Понимание закономерностей, лежащих в основе механизмов взаимодействия белка Dps с участками ДНК различного нуклеотидного состава и пространственной организации, является ключевым фактором.

Обобщение литературных данных и постановка проблемы

Резюмируя имеющиеся литературные данные, можно сделать заключение о том, что на стационарной фазе роста и во время воздействия повреждающих внешних факторов архитектура бактериальной хромосомы определяется преимущественно присутствием белка Dps. При этом этот белок помимо обеспечения соответствующей конформации ДНК может выполнять функции ферритина, антиоксиданта, регулятора генной экспрессии, а также обеспечивать резистентность бактериальных клеток к воздействию различных типов стрессов. Он является весьма перспективной основой для решения конкретных прикладных задач как в области биотехнологии, так и в области различных отраслей нанотехнологий.

Тем не менее, остаются открытыми ряд вопросов, связанных с его структурно-функциональными характеристиками. В частности, отсутствуют данные о том, способен ли Dps распознавать какие-либо нуклеотидные последовательности или особенности структуры двойной спирали ДНК. Более того, в отличие от других представителей белков бактериального нуклеоида до сих пор не показано какой именно эффект оказывает Dps на ДНК при формировании нуклеопротеидного комплекса, то есть способен ли Dps формировать изгибы двойной спирали, наматывать цепь ДНК на белковую глобулу или одновременно взаимодействовать с разными областями ДНК.

Отсутствует информация о кинетических параметрах нуклеопротеидных комплексов, сформированных с участием Dps.

Считается, что при окислении ионов железа внутри белковой полости Dps формируется неорганическое ядро, содержащее ионы трехвалентного железа. Однако, до сих пор не проводилось детального анализа их электронной структуры и пространственного окружения. К тому же, расположение канала в структуре додекамера, по которому происходит транслокация железа к ферроксидазному центру и далее, внутрь белковой глобулы, вызывает вопрос о том, как процесс насыщения может сказываться на олигомерной структуре белка и какие физико-химические факторы могут влиять на этот процесс. Помимо этого присутствие ионов трехвалентного железа в белковой полости подразумевает наличие у молекулы белка собственного магнитного момента, а это значит, что теоретически молекула этого белка может играть роль рецептора электромагнитного излучения в бактериальной клетке. Соответственно возникает вопрос, способен ли Dps трансдуцировать такой сигнал на бактериальную ДНК.

Процесс поддержания функционально-активного состояния белковой молекулы в клетке является не тривиальным процессом и на него оказывает влияние множество факторов, а их вариации могут играть роль модуляторов, обеспечивающих приоритет для реализации той или иной функции, присущей одной макромолекуле. Учитывая, что белок Dps можно охарактеризовать как мультифункциональный, то в клетке, теоретически, должен присутствовать компонент, влияющий на выполнение им той или иной функции. Проявление такого влияния, как правило, отражается на олигомерной форме белка, но данных о таком клеточном компоненте, который может модулировать функциональную активность и/или олигомерное состояние молекулы, в настоящее время не известно.

Анализ имеющихся данных, свидетельствует о том, что во время стационарной фазы роста количество молекул Dps составляет около 180 000 молекул на одну клетку, и практически все они ассоциированы с геномной

ДНК. Таким образом, можно сделать вывод о том, что практически весь геном *E.coli* закрыт молекулами Dps. Однако формирование архитектуры бактериального генома должно носить строго упорядоченный характер. Более того, наличие экспериментальных данных, свидетельствующих о прямом или опосредованном влиянии Dps на регуляцию экспрессии некоторых генов, также свидетельствует в пользу наличия конкретной закономерности распределения молекул Dps на всем протяжении бактериальной ДНК. Тем не менее, результаты полногеномного поиска сайтов связывания Dps, анализа их свойств и состава, а также сопоставления их с сайтами связывания других белков нуклеоида до сих пор не проводились.

Учитывая вышеизложенное, целью данной работы являлось исследование механизма конденсации бактериальной ДНК с участием белка Dps в зависимости от природы компонентов микроокружения, выявление факторов, влияющих на него, а также изучение закономерностей распределения белка Dps по бактериальной хромосоме.

Задачи исследования:

1. Выявить и оценить наиболее значимые физико-химические характеристики как отдельных молекул рекомбинантного белка Dps, так и его концентрированных растворов в различных условиях;
2. Осуществить поиск потенциальных ДНК-мишеней, выявить их наиболее важные характеристики, обеспечивающие сродство Dps к ним и оценить способ формирования нуклеопротеидных комплексов;
3. Выявить компоненты, присутствующие в бактериальной клетке, способные оказать влияние на олигомерную форму белка и на способность Dps формировать нуклеопротеидные комплексы;
4. Оценить сродство Dps к линейным и разветвленным структурам ДНК как природного, так и искусственного происхождения;
5. Проанализировать термодинамические и конформационные особенности нуклеопротеидных комплексов, содержащих Dps, и оценить энергию их формирования;

6. Выявить области бактериальной хромосомы, обладающие высоким сродством к Dps, и провести анализ закономерностей, лежащих в основе его распределения в геноме *E.coli*;

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объект исследования

В качестве объекта исследования был использован рекомбинантный белок Dps, биосинтез которого осуществляли в клетках *E.coli* BL21*(DE3), трансформированные вектором pGEM-dps. Рекомбинантный ген был встроен между сайтами рестрикции эндонуклеазы XbaI, находящегося под контролем промотора фага T7, индукция которого активируется изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозидом (IPTG). Вставка начиналась с позиции - 26 от иницирующего кодона гена *dps* (ATG) в геноме *E. coli* K12 MG1655 и заканчивалась в позиции + 1 за стоп-кодоном TAA. Т.е. в векторной конструкции был сохранён собственный сайт связывания рибосомы, и ген содержал только нативную последовательность. Нуклеотидная последовательность рекомбинантного гена была проверена прямым секвенированием и не содержала мутаций.

2.2 Используемые в работе бактериальные штаммы

Все эксперименты, кроме выделения и очистки нативного белка Dps (описано в следующем разделе), были проведены с использованием штамма *E.coli* K-12 MG1655. Мутант, с делетированным геном *dps*, был получен с использованием штамма *E. coli* BW25113 в соответствии с методикой, описанной в [274] и использование праймеров *dps_del_1* и *dps_del_2* (Таблица 2). После этого, полученная конструкция была перенесена в штамм *E. coli* K12 MG1655 с помощью P1 трансдукции в соответствии с методикой, описанной в [274]. После этого, с помощью полногеномного секвенирования (Illumina, MiSeq) осуществляли проверку наличия соответствующей делеции или транспозиции гена *dps* в другую часть генома. Бактериальные клетки выращивали аэробно до достижения оптической плотности (OD₆₀₀) ~ 0.6 на

питательной среде M9, содержащей 0.2% глюкозы, 5% питательной среды Луриа-Бертани (LB) при 37°C с постоянным перемешиванием на водяной бане.

Таблица 2. Праймеры, использованные для получения клеток *E.coli*, содержащих делецию гена *dps*

Название праймера	Нуклеотидная последовательность
<i>dps_del_1</i>	5'-TCGTTAATTACTGGGACATAACATCAAGAGGATATGAAA TTATG ATTCCGGGGATCCGTCGAC-3'
<i>dps_del_2</i>	5'-TCGGGТАCTAAAGTTCTGCACCATCAGCGATGGATTTATTC GAT GTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'

2.3 Суперпродукция, выделение и очистка рекомбинантного белка Dps

Клетки *E. coli* BL21*(DE3), трансформированные плазмидой pGEM-*dps*, выращивали на питательной среде LB (pH 7.4) при температуре 37°C в присутствии ампициллина (20 мкг/мл). Индукцию белка проводили при OD₆₀₀ 0.4-0.6 путем добавления в клеточную культуру 0.02 mM IPTG, после чего клетки инкубировали еще 12 часов при 37°C и перемешивании. Клетки осаждали центрифугированием при 10 000 об/мин., отмывали два раза от среды холодным буфером, содержащим 0.1M Tris-HCl (pH 8.0) и замораживали при -20°C для хранения. Уровень индукции рекомбинантного белка Dps оценивали с помощью электрофореза в 12.5% денатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ) по модифицированному методу Дэвиса.

Для выделения и очистки белка биомассу размораживали на ледяной бане, добавляя 3 мл охлажденного лизирующего буфера, содержащего 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl. Для разрушения бактериальной клеточной стенки и ингибирования собственных протеаз биомассу обрабатывали лизоцимом (4×10^{-3} мг/мл) в присутствии 4 мкМ фенилметилсульфонил фторида (PMSF) на ледяной бане в течение 20 мин. Далее суспензию клеток подвергали воздействию ультразвука на

дезинтеграторе УРСК-7Н-18 в течение 1 минуты суммарно с интервалами 15 секунд. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 12000 об/мин. в течение 10 мин. на холоду (+4°C).

Полученный лизат наносили на ионообменную колонку ДЕАЕ-Сефадекс-А25 (medium) (Sigma-Aldrich, USA), предварительно уравновешенную элюирующим буфером, содержащим 50мМ NaCl, 10 мМ Tris-HCl (pH 8.0), 10^{-4} М этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA); 10^{-4} М дитиотреитол (DTT), и разделяли на хроматографической системе LKB (Pharmacia, Sweden). Для очистки белка использовали градиент концентраций NaCl в диапазоне 50-700 мМ, при скорости элюции 20 мл/ч. Объем собираемых фракций составлял 2.0 мл, а присутствие в них белка определяли с помощью электрофореза в 12.5% денатурирующем ПААГ (Рис. 17). Такое фракционирование позволяет удалить абсолютное большинство примесных белков, но в полученном препарате присутствует много ассоциированных с Dps фрагментов ДНК. Учитывая наличие таких примесей, фракции, содержащие целевой белок перед гель-фильтрацией объединяли и подвергали высаливанию сульфатом аммония (конечная концентрация 90%) в течение 30 мин. на ледяной бане. Полученный преципитат осаждали центрифугированием в течение 10 мин. при 13000 об/мин. и растворяли осадок в буфере, содержащем 500 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl (pH 8.0), 10^{-4} М EDTA. Полученный раствор белка фракционировали с использованием гель-фильтрации на Сефадексе-G200 (Pharmacia, Sweden). Элюцию белковой фракции осуществляли буфером, содержащим 500 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl (pH 8.0); 10^{-4} М EDTA, со скоростью 20 мл/ч.

Для хранения белок концентрировали на колонках Vivaspin 20 (Sartorius, Германия) с порами, пропускающими белки массой менее 10кДа. Для этого колонки несколько раз центрифугировали при 13000 об/мин. до достижения нужного объема белкового раствора. Затем полученный препарат диализовали против буфера, содержащего 50 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl (pH 8.0); 10^{-4} М EDTA. На этой стадии чистота препарата составляла более 95%. На Рис. 17 приведены результаты оценки уровня суперпродукции белка Dps в клетках

E.coli (Рис. 17А) и результаты этапов очистки (Рис. 17Б). Концентрацию очищенного белка определяли с помощью спектрофотометра Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc., США).

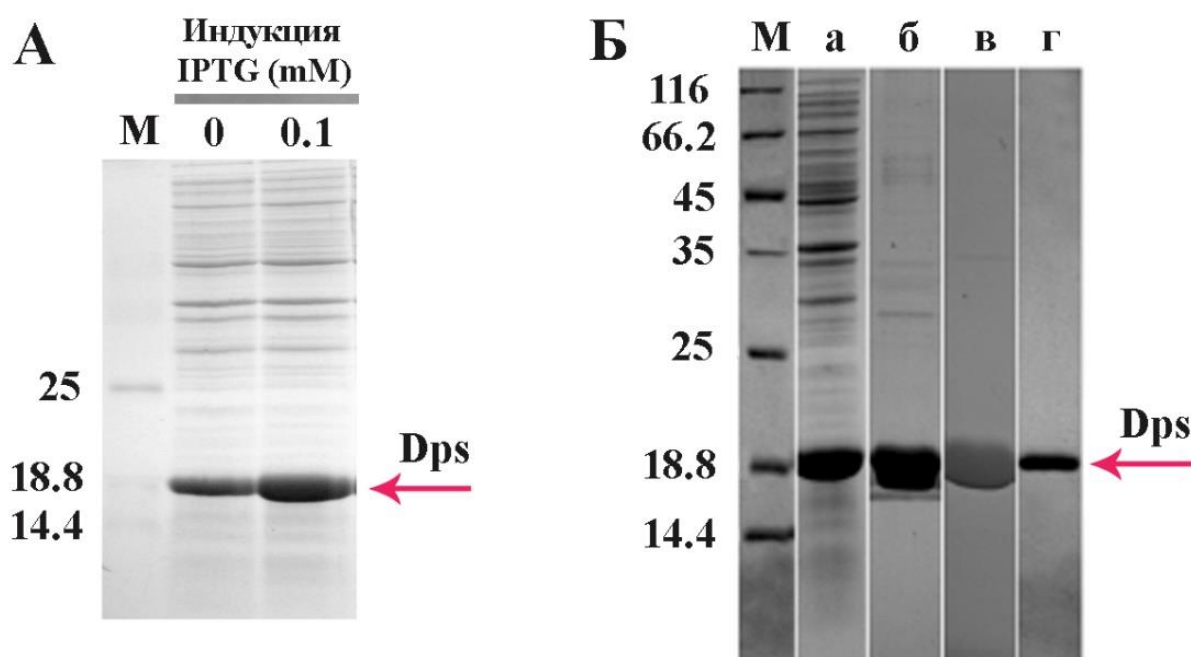


Рис. 17. А – уровень суперпродукции белка Dps в клеточном лизате *E.coli* в отсутствие IPTG и добавлении 0,1 мМ IPTG, соответственно; Б – результаты последовательных этапов очистки Dps. М – маркеры молекулярной массы, кДа; а – суммарный лизат клеток; б – фракция белков, полученная после ионообменной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

2.4 Электрофоретическое фракционирование белков в денатурирующих условиях

Электрофорез в полиакриламидном геле и присутствии SDS проводили по модифицированному методу Дэвиса [43] с использованием электрофоретической камеры “Mini-Protean” (BioRad, США). Перед нанесением на гель к образцам белка добавляли буфер, содержащий 0.125 М Tris-HCl (pH 6.8), 4% додецилсульфата натрия (SDS), 20% глицерина, 0.002% бромфенолового-синего, 10% β-меркаптоэтанола, после чего пробы инкубировали при 95°C в течение 10 минут для денатурации молекул белка и наносили на гель. После достижения лидирующим красителем нижней границы

геля отключали электрический ток и окрашивали гель 0.01% раствором Кумасси R-250 на смеси этанол – уксусная кислота – вода в соотношении 4:1:5, соответственно.

2.5 Электрофоретическое фракционирование молекул Dps в нативных условиях

Оценку олигомерного состава полученного препарата белка Dps оценивали с помощью его электрофоретического фракционирования в нативных условиях. Для этого, к раствору белка добавляли 1/5 часть объема раствора 50% глицерина и краситель, после чего 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.

2.6 Амплификация фрагментов ДНК

Амплификацию фрагментов проводили в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием праймеров, приведённых в Табл. 3 на программируемых термостатах Thermocycler (Biometra, Германия) или ДТ-322 (ДНК-Технология, Россия).

Использованные праймеры (Таблица 3) были выровнены по GC-составу, поэтому программа амплификации для всех участков бактериальной ДНК была одинаковой и состояла из следующих циклов:

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

Таблица 3. Праймеры, использованные для получения фрагментов ДНК и оценки уровня экспрессии генов *E.coli* в ходе ПЦР

Название	Нуклеотидная последовательность	Нить ДНК
<i>1</i>	5'-АТАТ <u>CTAGAT</u> АТАТАААGACGGTGTA -3'	+
<i>3</i>	5'-GGA <u>AAGATCTTC</u> CTCGGAGAAACACT -3'	-
<i>2</i>	5'-TCCT <u>CTAGATG</u> TTATGTCCCAGT -3'	+
<i>4</i>	5'-ATGC <u>AGATCTT</u> CTCGCTACTTTTC -3'	-
<i>1</i>	5'-TCCT <u>CTAGATG</u> TTATGTCCCAGT -3'	+
<i>4</i>	5'-GGA <u>AAGATCTTC</u> CTCGGAGAAACACT -3'	-
<i>hns-1+</i>	5'-ACAGCTGGAGTACGGCCTTG -3'	+
<i>hns-1-</i>	5'-ATTTAGATCTCCTTACATTCCTG -3'	-
<i>hns-2+</i>	5'-TCTGAACAACATCCGTA CTCTTCG -3'	+
<i>hns-2-</i>	5'-AAATTGTCTTAAACCGGACAATA -3'	-
<i>yeaI+</i>	5' – ААТААААТCCAGCACTCACA -3'	+
<i>yeaI-</i>	5'-ААСТАААТАGATAAGGCCACT -3'	-
<i>ysaA_F1</i>	5'-GCAGTAGCCTGTCATCAGTGTGAAGAT -3'	-
<i>ysaA_R1</i>	5'-ACGACCTCCATCGCACCAAACG -3'	+
<i>ysaA_F2</i>	5'-ТТАAGTGCGATCTGTGCTGGCAT -3'	-
<i>ysaA_R2</i>	5'-CTGCTGCCGTAGCCGATGC -3'	+
<i>dps_cl_1</i>	5'- ТААТТТCTAGAACATAACATCAAGAGG-3'	+
<i>dps_cl_2</i>	5'- AGCTCTAGATTTATTCGATGTTAG-3'	+
<i>dps_F1</i>	5'-GGAAGATCTTCCTCGGAGAAACACT-3'	+
<i>dps_F2</i>	5'-ATGCAGATCTTCTCGCTACTTTTC-3'	+
<i>dps_R2</i>	5'-TCCTCTAGATGTTATGTCCCAGT-3'	-
<i>fis_up_F</i>	5'-TTTGGCAGAGGTTAAGCGCT-3'	-
<i>fis_up_R</i>	5'-GTACCAGCTCATAGAGGTCA-3'	+
<i>fis_down_F</i>	5'-GACCTCTATGAGCTGGTACT-3'	-
<i>fis_down_R</i>	5'-TCACTCCCTTTGTGACACCT-3'	+
<i>fis_RT</i>	5'-GCATCACCATGTCCAACAGG-3'	-
<i>fis_PCR</i>	5'- CCAAAAACCCCTGCGTGACTC-3'	+
<i>rpoA_RT(F)</i>	5'-CATGCCCAGAGACAGTCCAC-3'	+
<i>rpoA_PCR(R)</i>	5'-CCAGAGTTCGATCCGATCCT-3'	-

<i>rpoB_F</i>	5'-CCAAGGCGGTAGCTGACGTATT-3'	+
<i>rpoB_R</i>	5'-CACAAGTTCTGGATGTACCTTA-3'	-
<i>rpoB_RT</i>	5'-TTGTGCGTAATCTCAGACAG-3'	+
<i>rpoB_PCR</i>	5'-CTCTGGGCGATCTGGATAACC-3'	-
<i>rho_F</i>	GAAAGAGTTCCTCGACGCTA	+
<i>rho_R</i>	GTCACAGGAGAGTACGCAGA	-
<i>rho_RT</i>	5'-TTCGTCGATCAGCAGAACCATC-3'	+
<i>rho_PCR</i>	5'-TAACTGCTCGCGTACTGGATC-3'	-
<i>oppA_F</i>	5'-TCCCCGCTTATTCGCACC-3'	+
<i>oppA_R</i>	5'-ACTCGCCAATACATTTTGC-3'	-
<i>oppA_RT</i>	5'-TCGGATCAACAGAACGTTGC-3'	+
<i>oppA_PCR</i>	5'-GATCTTGACGGTCATCCAGC-3'	-
<i>oppB_RT</i>	5'-CCGCAAGGAAAAATGCTGCG-3'	+
<i>oppB_PCR</i>	5'-TGACACAGTATTTTCAGCTACC-3'	-
<i>oppD_F</i>	5'-GGTTGCCAGTCTGATAGT-3'	+
<i>oppD_R</i>	5'-CATCATTACCGAATCCAC-3'	-
<i>oppD_RT</i>	5'-GCATCCGCACCGACTCTTCA-3'	+
<i>oppD_PCR</i>	5'-CCCAATGACTTCGTTGAATC-3'	-
<i>lacZ_RT</i>	5'-CCATCCAGTGCAGGAGCTCG-3'	+
<i>lacZ_PCR</i>	5'-CAACCCGTGGTTCGGCTTACG-3'	-
<i>lacZ_F</i>	CGGTGAAGTGCCTCTGGATG	+
<i>lacZ_R1</i>	CTGGTGGTCAGATGCGGGAT	-
<i>lacZ_R2</i>	GGGAGCGTCACACTGAG	-
<i>gfp_PCR</i>	5'-TTGTACTCCAGCTTGTGCCC-3'	+
<i>gfp_RT</i>	5'-ACGACGGCAACTACAAGACC-3'	-
<i>kan_PCR</i>	5'-TCAACGGGAAACGTCTTGCT-3'	+
<i>kan_RT</i>	5'-TCGGGCTTCCCATAACAATCG-3'	-
<i>appY F1</i>	AGCAAGCTGGATGTTGGTT	+
<i>appY R1</i>	ACCTGAAACCTCTTGCTATATATATGTCAAC	-
<i>appY F2</i>	CTAGGATGAGGTATGCAAAAAAACT	+
<i>appY R2</i>	TCCATCTGTGACGCCGAT	-
<i>appY F3</i>	GCATTTAAAGATTATTATGGTG	+
<i>appY R3</i>	ATAACTTCATCACTACTGCT	-
<i>yhaC F1</i>	AATGAACCGTTAAAAAACCAGGA	+

<i>yhaC R1</i>	ATTACGTAAGTCCAGAGAGGATAGAT	-
<i>yhaC F2</i>	CAGGTAATATCAATATTAATTGCCCAT	+
<i>yhaC R2</i>	GTATTAGCCATATGTTTATCTGTGA	-
<i>yhaC F3</i>	AAAACCAGGAAATATCCACAG	+
<i>yhaC R3</i>	CAGAATACATATCGCTAATG	-
<i>yjgL F1</i>	GTCATCGATTTCGATTCTGGAGACT	+
<i>yjgL R1</i>	GCTGCGAAGATTAATATGATTTATTACGG	-
<i>yjgL F2</i>	AATCCACCGGAAAATTTACGTATAGC	+
<i>yjgL R2</i>	TATCGCTATAAAGATGCCGGGAA	-
<i>yjgL F3</i>	TAATGATGTAAGAATACTGG	+
<i>yjgL R3</i>	CCAATTAATCATCTCAGGA	-
<i>yrhA F1</i>	ATTTGAAGCACCGCTCAAGGAATCAT	+
<i>yrhA R1</i>	CCATTAACCTCGAATCCATCCATTGCTCTT	-
<i>yrhA F2</i>	TGCCTGGAGAAGTTATGTAATGAAGT	+
<i>yrhA R2</i>	AGGCTAAATAATCGTAATCCATTAACCTCGA	-
<i>yrhA F3</i>	CTGGCTCAATTTATCCTCCC	+
<i>yrhA R3</i>	CCCCGATCACTAACCGTTC	-
<i>ysaA F1</i>	GCAGTAGCCTGTCATCAGTGTGAAGAT	+
<i>ysaA R1</i>	ACGACCTCCATCGCACCAAACG	-
<i>ysaA F2</i>	TTAAGTGCGATCTGTGCTGGCAT	+
<i>ysaA R2</i>	CTGCTGCCGTAGCCGATGC	-

ПЦР-смесь (20 мкл) содержала 10 пмоль каждого праймера, 0.1мМ каждого мононуклеотида (dNTP), 1 нг геномной ДНК, Таq-буфер (67 мМ Tris-HCl (pH 8.8), 2 мМ MgCl₂, 15 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.2% бычьего сывороточного альбумина (BSA)), 1 U термостабильной ДНК-полимеразы (Евроген, Россия), стерильную деионизованную воду. Очистку полученных в ходе ПЦР ампликонов от примеси праймеров и субстратов осуществляли электрофоретически в 5% ПААГ и присутствии бромфенолового-синего для визуализации фронта. Электрофорез проводили в трис-боратном буфере TBE (89 мМ Tris-HCl (pH 8.0), 89 мМ борной кислоты, 2 мМ EDTA) в электрическом поле с напряжением 200-250 В и силой тока 70–110 мА. После разделения

фрагментов геля окрашивали бромистым этидием и визуализировали на трансиллюминаторе согласно стандартному протоколу.

2.7 Экстрагирование фрагментов ДНК из ПААГ

Для экстракции полученных фрагментов ДНК из полиакриламидного геля использовали методику, которая заключается в том, что полученные в ходе электрофоретического фракционирования фрагменты ДНК экстрагировали из геля путем вырезания участка геля, содержащего искомый фрагмент. После этого, вырезанный фрагмент геля измельчали их чистым скальпелем, переносили в стерильную пробирку типа «Эппендорф» и гомогенизировали тefлоновым пестиком [118]. 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 этого пробы центрифугировали при 10 000 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. Далее, фрагменты ДНК осаждали из полученной смеси путём добавления 2.5 объемов 97% этанола и инкубировали смесь при -20°C на протяжении 15–20 часов. После окончания инкубации смесь центрифугировали при $+4^\circ\text{C}$ со скоростью 10 000 об/мин. в течение 20 мин. Надосадочную жидкость удаляли, а 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.

2.8 Оценка эффективности взаимодействия линейных фрагментов ДНК с Dps методом задержки нуклеопротеидных комплексов в полиакриламидном геле (EMSA)

Оценку эффективности взаимодействия с Dps с отдельными линейными фрагментами ДНК и их смесью производили методом EMSA (**E**lectrophoretic **M**obility **S**hift **A**ssay). Нуклеопротеидные комплексы Dps с фрагментами геномной ДНК *E.coli* формировали в течение 30 минут при комнатной температуре в 20 мкл буфера, содержащего 50 мМ Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 мМ EDTA, 50 мМ 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 [167]. 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% тиосульфата 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 Идентификация олигомерных форм Dps в растворе с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC)

Анализ соотношения олигомерных форм в очищенном препарате белка проводили с помощью установки Marksk (Hitachi, Германия) для гель-фильтрации высокого давления, оборудованной УФ детектором. Для фракционирования была использована колонка длиной 300 мм и диаметром 15 мм, заполненная смолой Сефакрил-200 (Amersham Biosciences, Великобритания). Разрешающая способность данной колонки составляла от 100 до 100000 Да. Колонку уравнивали буфером 50 мМ Tris-HCl (pH 7.0), 0.1 мМ, EDTA, 0.1 мМ DTT, 0.2 М NaCl, 0.6 М мочевины и наносили 80 мкл пробы с концентрацией белка 4-5 мг/мл. Скорость протока составляла 1 мл/мин. Собранные фракции объемом 250 мкл концентрировали с использованием колонок VivaSpin 500 (Startorius Stedim, Германия) согласно протоколу производителя. Для калибровки колонки были использованы α -субъединица РНК-полимеразы, кор-фермент РНК-полимеразы и лизоцим.

2.11 Оценка константы седиментации белка Dps

Эксперименты по скоростной седиментации проводили с использованием аналитической центрифуги Optima XL-I (Beckman, США) при температуре 20°C. Скорость вращения ротора составляла 30 000 об/мин. Циклы сканирования осуществляли с интервалом 4 минуты, каждый цикл при этом составлял 35 сканов с пространственным разрешением 0.003см. Седиментацию осуществляли в би-секторных ячейках с использованием ротора An60. Для проведения эксперимента исходный раствор белка разбавляли до концентрации до 0.7 мг/мл буфером, содержащим 50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10^{-4} M EDTA. Полученные данные обрабатывали с использованием программного обеспечения SEDFIT [325] в режиме непрерывного распределения коэффициентов седиментации $s(S)$. Коэффициенты седиментации, полученные экспериментально, в процессе обработки данных были приведены к стандартным водным условиям при 20°C, согласно методике предложенной в работе [326]. Парциальный удельный объем белка, вычисленный на основании данных о его аминокислотном составе, составлял 0.73 см³/г [327]. Для более наглядного представления результатов, распределение коэффициентов седиментации $s(S)$ было преобразовано в распределение по молекулярной массе $s(M)$ с использованием программного обеспечения SEDFIT.

2.12 Определение нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК по Максаму-Джилберту

Секвенирование фрагментов проводилось по методике, приведенной в [62], с небольшими модификациями. К экстрагированному из геля, модифицированному [γ -³²P], фрагменту ДНК, добавляли 200 мкл буфера, содержащего 50 mM какодилат натрия (pH 8.0) и 1 mM 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 (pH 7.0), 1 М DTT и tРНК (100 мкг/мл). Продукты реакции осаждали добавлением трёх объёмов 96% этанола, выдерживали 4–8 часов при -20°C и центрифугировали при 10000 об/мин. в течение 20 минут. Осадок растворяли в 250 мкл 0.3 М ацетата натрия и переосаждали тремя объёмами 96% этанола. После центрифугирования осадок промывали 70% этанолом, 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 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 К (Bio-Rad, США) в течение 12–24 часов и визуализировали с помощью сканера Bio-Rad Personal Molecular Imager FX (США).

2.13 Идентификация сайтов взаимодействия белка Dps с ДНК радиоавтографическим методом

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. 4) были помечены изотопами фосфора ³²P при помощи полинуклеотидкиназы Т4 (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].

Таблица 4. Праймеры, использованные для получения фрагментов ДНК регуляторной области гена *dps* в ходе ПЦР

Название	Последовательность праймеров (подчёркнуты отсутствующие в геноме линкеры)	Позиция 5'-конца геномной последовательности	Нить	Длина фрагмента с линкерами
<i>dps_1</i>	5'-АТАТ <u>CTAGAT</u> АТАТАА AGACGGTGTA-3'	849136	+	214 н.п. (H)
<i>dps_2</i>	5'-GGA <u>AGATCT</u> TCCTCG GAGAAACACT-3'	849331	-	
<i>dps_3</i>	5'-TCCT <u>CTAGAT</u> GTTATG TCCCAGT-3'	848930	+	259 н.п. (S)
<i>dps_4</i>	5'-ATGC <u>AGATCT</u> TCTCGC ТАСТТТТС-3'	849169	-	
<i>dps_3</i>	5'-TCCT <u>CTAGAT</u> GTTATG TCCCAGT-3'	848930	+	420 н.п. (L)
<i>dps_2</i>	5'-GGA <u>AGATCT</u> TCCTCG GAGAAACACT-3'	849331	-	

Для формирования нуклеопротеидных комплексов образцы ДНК (1 пмоль на реакцию) инкубировали 1 час при 37°C в 30 мкл транскрибционного 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 8 М ацетата аммония. Продукты, полученные в результате обработки ДНКазой I, осаждали этанолом и наносили на 6% полиакриламидный гель. Фракционирование осуществляли в буфере TBE в присутствии 8 М мочевины и визуализировали радиоавтографически. Гель калибровали маркерами, приготовленными по методу Максама-Гилберта.

2.14 Проектирование комплекса, формирующего Y-образную структуру из трёх частично комплементарных олигонуклеотидов

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 10нм;

- 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 *ихиТ*, 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. 5).

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

такой же температуры и оставляли еще на 5 минут инкубироваться при 98°C. Далее смесь переносили на 10 минут в термостат, прогретый до 70°C. После этого смесь 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 Integra-Vita (NT-MDT, Россия) в полуконтактном режиме, который наиболее пригоден для изучения биологических объектов.

2.15 Приготовление образцов ДНК с одноцепочечными разрывами двойной спирали

Для исследования возможности формирования нуклеопротеидных комплексов сформированных Dps с ДНК, содержащей одноцепочечные участки, 10 мкг плазмиды pET28b обрабатывали никазой Nt.BspD6I [204]. Реакционная смесь (20 мкл), содержала 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 150 mM KCl, 1 mM DTT и 10 U никазы Nt.BspD6I или равное количество элюирующего буфера содержащего (10 mM Tris-HCl, (pH 7.5), 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM 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. Нуклеопротеидные комплексы Dps с полученными плазмидными ДНК, содержащими одноцепочечные участки, формировали в молярном соотношении 5:1 или 10:1 по методике описанной для линейных или Y-подобных ДНК.

2.16 Исследование методом атомно-силовой микроскопии отдельных молекул белка, ДНК и их нуклеопротеидных комплексов

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-ваальсовых взаимодействиях зонда с поверхностью образца. По сравнению с электронной микроскопией, атомно-силовая микроскопия не требует нанесения проводящего металлического покрытия, более того, исследования могут быть осуществлены на воздухе или в жидкости. Кроме того она позволяет получить трёхмерное изображение рельефа поверхности.

Изучение магнитных свойств образца осуществлялось при помощи кантиллевера MFM01. При этом использовалась двухпроходная методика: сначала исследовался рельеф поверхности, после чего кантиллевер вновь проходил 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]:

$$F = (m, grad)H,$$

где m – эффективный магнитный момент зонда;

H – магнитное поле рассеяния образца;

Для исследования морфологии поверхности частиц 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 кантилвера NSG03 с резонансной частотой 47–150 кГц. Полученные изображения обрабатывались с использованием программного обеспечения Nova (NT-MDT, Россия).

2.17 Исследование изменений флуоресценции свободных молекул Dps и в составе нуклеопротеидного комплекса

Флуоресценция является частным случаем люминесценции и представляет собой излучательный переход возбужденного состояния с самого нижнего синглетного колебательного уровня в основное. При этом время жизни подобного состояния составляет порядка 10^{-8} с [4]. В качестве анализируемых данных, как правило, используют спектры испускания флуоресценции, то есть зависимость интенсивности флуоресценции образца от длин волн (нм) или волновых чисел (см^{-1}).

Измерение собственной флуоресценции свободных молекул нативного Dps и его нуклеопротеидных комплексов осуществляли на спектрофотометре Perkin Elmer 44B (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 проводилось при длине волны возбуждения 280 нм, 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. Нуклеопротеидные комплексы Dps с линейными и разветвлёнными искусственными фрагментами ДНК готовились в эквимольном соотношении, а концентрации компонентов составляли:

– Dps-ДНК(S) ~ 0.275 пмоль/мкл;

- Dps-ДНК(Н) ~ 0.22 пмоль/мкл;
- Dps-ДНК(У) ~ 0.23 пмоль/мкл
- Dps ~ 0.275 пмоль/мкл;
- ДНК (S) ~ 0.275 пмоль/мкл;
- ДНК (Н) ~ 0.22 пмоль/мкл;
- У-ДНК ~ 0.23 пмоль/мкл

2.18 Оценка гидродинамического радиуса молекул нативного Dps и в составе нуклеопротеида методом динамического светорассеяния

Динамическое рассеяние света (Dynamic light scattering, DLS) — представляет собой совокупность таких явлений как изменение частоты (Доплеровский сдвиг), интенсивности и направления движения света прошедшего через среду движущихся (Броуновских) частиц. Этот физический метод позволяет 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(Н)) с концентрацией 0.55 пмоль/мкл помещались в кювету объёмом 0.5мл 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 (Malvern Instruments, Великобритания).

2.19 Изучение кинетики формирования нуклеопротеидных комплексов молекулами Dps с линейными и разветвлёнными фрагментами ДНК методом поверхностного плазмонного резонанса

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 пленки [5].

Исследование кинетики формирования нуклеопротеидных комплексов Dps с линейными и искусственными разветвлёнными фрагментами проводилось с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса на приборе 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

которых позволяет рассчитать величину константы диссоциации, характеризующую прочность образующегося соединения. Для получения достоверных результатов принято рассчитывать кинетические и равновесные константы одновременно по нескольким сенсограммам. Оценку различия между экспериментальными и теоретическими данными производят при помощи расчета распределения χ^2 (хи-квадрат) с k степенями свободы, которое представляет собой распределение суммы квадратов k независимых стандартных нормальных случайных величин. При этом, аппроксимация полученных результатов считается достоверной, если значение $\chi^2 < 10$.

$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (r_{th} - r_{exp})^2}{n - p},$$

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 аминогруппы. Химическая иммобилизация белка на поверхности чипа осуществлялась за счет взаимодействия ϵ -аминогруппы остатков лизина при добавлении в раствор белкового компонента набора ProteOn™ Amine Coupling Kit (Bio-Rad, США). Для этого поверхность чипа предварительно активировали в течение 200 сек. смесью N-гидроксисульфосукцинимидом (sulfo-NHS) и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида (EDAC, EDC) в соотношении компонентов 1:1. Скорость движения смеси этих компонентов через поверхность чипа составляла 30 мкл/мин. Сразу после активации, над поверхностью чипа пропускался раствор белка с концентрацией 20 мкг/мл в 10 мМ 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 1 М раствор этаноламина (рН 8.5) со скоростью 30 мкл/мин. в течение 350 секунд.

Для анализа взаимодействия лиганда, в роли которого выступали молекулы Dps, с анализом (фрагментов ДНК) над поверхностью чипа в перпендикулярном направлении пропускались раствор искусственной разветвленной 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% Tween-20 (рН 7.4). Пропускание анализа над поверхностью чипа проводилось со скоростью 30 мкл/мин. в течение 350 секунд. По завершению стадии ассоциации лиганда и анализа через проточную кювету подавался рабочий буферный раствор. Стадию диссоциации комплекса лиганд-аналит осуществляли в течение 1200 секунд. Анализ полученных кинетических данных поверхностного плазмонного резонанса проводится в программе ProteOn manager (Bio-Rad, США) в рамках модели гетерогенного лиганда.

2.20 Моделирование способности фрагментов ДНК формировать анизотропные изгибы с использованием программы «DNATool»

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. 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 учета внешних факторов, например солевого состава растворителя, температуры, значения рН и т.д., и формирует соответствующий файл с цифровыми данными. Полученный файл загружается в программу RasMol, которая предназначена для получения визуального изображения в соответствии с полученными значениями.

2.21 Получение первичных анти-Dps антител

Для получения антител был использован очищенный препарат белка Dps, полученный согласно описанной выше методике. Два Новозеландских кролика были подкожно иммунизированы 100мкг Dps, эмульгированного в неполном адьюванте Фрейнда. После чего проводили еще три ревакцинации с использованием 75 мкг Dps, эмульгированного в том же адьюванте с интервалом времени в две недели между инъекциями. Кровь кроликов через 14 дней после последней иммунизации использовали для приготовления антисыворотки. Антитела выделяли из антисыворотки с использованием ионообменной хроматографии на DEAE-Toyopearl, согласно методике, описанной в [281]. Конечную концентрацию анти-Dps IgG определяли с помощью спектрофотометра ND-1000, которая составляла 3 мг/мл. Затем полученные антитела преципитировали 60% сульфатом аммония и хранили при 4°C до использования.

2.22 Приготовление хроматина и его иммунопреципитация

Эксперименты по иммунопреципитации хроматина (ChIP-Seq) проводились в двух независимых лабораториях с использованием одинаковых условий роста бактериальной культуры. Первый эксперимент был сделан на базе Centre for Genomic Regulation (CRG, Барселона, Испания), а второй - на базе Института Живых Систем (БФУ им. Канта, Калининград, Россия). В обоих случаях хроматин фиксировали при помощи формальдегида, после чего его выделяли и очищали, согласно методике описанной в [282], с небольшими модификациями. Клетки *E.coli* выращивали аэробно при 37°C в жидкой питательной среде M9 стандартного состава до достижения клеточной культурой оптической плотности ~ 0.6 оптических единиц, после чего добавляли формальдегид до конечной концентрации 1% и инкубировали в течение 20 минут. Сшивку белков с ДНК останавливали с помощью глицина

(конечная концентрация в пробе 450 мМ). Через 5 минут после инкубации с глицином бактериальные клетки осаждали центрифугированием при 14000 об/мин. в течение 15 минут (+4°C) и дважды отмывали от компонентов питательной среды и примесей. Полученный осадок ресуспендировали в 1.3 мл свежеприготовленной смеси, состоящей из 50 мл холодного буфера для иммунопреципитации (100 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl (pH 8.1), 5 мМ EDTA, 0.2% NaN₃, 0.5% SDS) и 25 мл буфера, содержащего 100 мМ Tris-HCl (pH 8.6); 100 мМ NaCl; 5 мМ EDTA; 0.2% NaN₃, 5% Triton-X-100. После этого к пробе добавляли 1 мМ PMSF или 20 мкл смеси ингибиторов протеаз (Protease Inhibitor Cocktail (PIC), Sigma) и инкубировали образцы в течение 30 минут при +4°C. Для получения фрагментов хроматина необходимой длины, образцы, полученные в первом эксперименте, подвергали 18 раундам обработки ультразвуком (10 сек. каждый), с использованием ультразвукового дезинтегратора Bioruptor (Diagenode, USA). Во втором эксперименте проводили 40 циклов обработки ультразвуком образцов на 150 Soniprep Plus (MSE, UK). Клеточный дебрис удаляли центрифугированием (15 мин. при 14000 об/мин и 4°C). В обоих экспериментах супернатант проверяли на содержание фрагментов ДНК хроматина необходимой длины электрофоретически в 5% ПААГ. Размер полученных фрагментов ДНК в первом эксперименте составлял 150-300 п.н., а во втором 300-500 п.н. Для иммунопреципитации использовали 800 мкл полученного хроматина, что соответствует ~ 1000 мкг белка, который инкубировали в течение 12-14 часов при +4°C и постоянном перемешивании в присутствии 10 мкг анти-Dps антител (опытный образец) или кроличьей сыворотки (контрольный образец). По окончании инкубации к образцам добавляли 30 мкл суспензии сферических частиц Ultra Link Protein A/G (Thermo Scientific, США) для преципитации связавшихся с Dps антител и инкубировали еще 2 часа при 4°C при постоянном перемешивании. Полученную суспензию трижды промывали в 1мл низкосолевого буфера (50 мМ HEPES (pH 7.5), 140 мМ NaCl, 1% Triton X-100, 1xPIC или 1 мМ PMSF), а затем промывали в 1 мл высокосолевого буфера, имеющего аналогичный состав низкосолевого буфера,

но содержащий 500 мМ NaCl, и осаждали с помощью центрифугирования. Осадок ресуспендировали в 110 мкл свежеприготовленного буфера, содержащего 100 мМ NaHCO₃ и 1% SDS, после чего проводили отделение иммунопреципитированных нуклеопротеидных комплексов от сферических частиц Ultra Link Protein A/G с помощью инкубации полученной суспензии в течение 3 часов при 65°C и постоянном перемешивании (1000 об/мин.). После этого образцы центрифугировали в течение 5 минут при 3000 об/мин., 100 мкл полученной надосадочной жидкости переносили в чистую пробирку и выделяли содержащиеся в растворе ДНК с помощью набора PCR Purification Kit (Qiagen, Германия). Концентрацию ДНК определяли с использованием спектрофотометра Qubit 2.0 (Thermo Scientific, США) и набора Qubit dsDNA HS Assay kit (Thermo Scientific, США). Таким способом было получено 8-10 идентичных образцов, которые были смешаны и сконцентрированы до объема 30-50 мкл, таким образом, чтобы содержание ДНК в них составляло 5-10 нг. Перед приготовлением библиотек образцы были проверены с помощью ПЦР в реальном времени на предмет содержания в них целевых участков ДНК.

2.23 Приготовление и секвенирование библиотек ДНК иммунопреципитированного хроматина

Библиотеки ДНК преципитированного хроматина были приготовлены с использованием 5-10 нг образцов ДНК и набором NebNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit (New England Biolabs, США) для платформы Illumina в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. Для конечной амплификации библиотеки было проведено 15 циклов ПЦР. Распределение размера и концентрацию полученных библиотек анализировали с помощью Bioanalyzer 2100 (Agilent, США). В первом эксперименте, максимальная длина компонентов библиотеки ДНК составляла 300 п.н., нуклеотидную последовательность которых определяли с использованием платформы Illumina HiSeq (Illumina, США) в Центре геномики и регуляции CRG (Барселона,

Испания). Во втором эксперименте максимальная длина компонентов библиотеки ДНК составляла около 450 п.н., а их секвенирование осуществляли с использованием стандартного протокола на платформе Illumina MiSeq (Illumina, США) в Институте живых систем БФУ им. Канта (Калининград, Россия).

2.24 Обработка данных, полученных методом иммунопреципитации хроматина (ChIP-Seq)

Качество исходных данных было проверено с использованием пакета программ FastQC. Выходные данные, полученные на секвенаторе Illumina HiSeq, содержали 32860548 и 47147298 одиночных прочтений, обладающих длиной 50 пар нуклеотидов, в контрольных и опытных образцах соответственно. Результаты, полученные с использованием прибора Illumina MiSeq, содержали соответственно 10028552 и 11570890 прочтений, которые имели длину от 35 до 150 нуклеотидов. Для всех четырех наборов данных была проведена фильтрация достоверности полученных результатов для каждого нуклеотида с использованием ресурса сервера Galaxy, обеспечивающая 99% корректности результатов секвенирования в каждом чтении [283]. В результате проведенной обработки данных количество прочтений в полученных наборах для первого эксперимента составили 31656551 и 45396252 для контрольных и иммунопреципитированных образцов, соответственно, а для второго эксперимента 7493528 и 8214737 прочтений, которые были впоследствии размещены в международной базе данных NCBI's Gene Expression Omnibus [284] под номером GSE102091.

Для выравнивания полученных прочтений на геном *E.coli* K-12 MG1655 (U00096.3) было использовано два разных подхода. Первый заключался в том, что все полученные прочтения нуклеотидных последовательностей были совмещены с геномной картой посредством компьютерной программы CLC Genomics Workbench версии 7.5.1 (CLC GW, Bio-Qiagen, Дания). Для получения

достоверных данных о местах локализации в бактериальном геноме прочитанных нуклеотидных последовательностей использовалось два способа картирования. В первом случае использовали значения коэффициентов длины и подобия прочитанных участков ДНК равные 0.5 и 0.8 соответственно (мягкие условия картирования), а во втором, использовали значения этих коэффициентов равные 1.0 (строгие условия картирования). Прочитанные нуклеотидные последовательности, которые совпадали с несколькими геномными областями, удалялись из расчета. В обоих случаях была сформирована выборка, включающая несколько тысяч областей связывания Dps с ДНК, обладающая высоким уровнем достоверности ($p < 0.001$).

Для реализации второго подхода, отличающиеся по длине прочтения нуклеотидных последовательностей полученных с помощью Illumina MiSeq, сначала были обрезаны с обеих сторон таким образом, чтобы получить наборы длиной 50 п.н., которые располагались в центральной части длинных прочитанных участков. При этом участки, имеющие длину менее 50 нуклеотидов, не учитывались и не использовались для дальнейших расчетов. Полученные после этого четыре набора данных были картированы на генетическую карту *E.coli* использованием программы Matcher [285]. Эта компьютерная программное обеспечивает картирование 5'-конца прочитанной нуклеотидной последовательности, в случае если она соответствует верхней нити бактериальной ДНК, или обеспечивает картирование 3'-конца, если прочитанная нуклеотидная последовательность соответствует нижней нити. Такой подход обеспечивает выявление полностью комплементарных прочтений нуклеотидных последовательностей совпадающих по своим положениям. Итоговое распределение прочитанных нуклеотидных последовательностей на протяжении генома программа рассчитывает по их частоте встречаемости и позиции, учитывая только идеальное совпадение с нуклеотидной последовательностью генома. Профили распределения выявленных нуклеотидных последовательностей в геноме, полученные для исследуемых и контрольных образцов, были нормализованы с помощью метода первоначально

предложенного для анализа данных, получаемых с помощью микрочипов, но затем были адаптированы для других подходов [286]. Этот способ не затрагивает области генома, не занятые белком и рассчитывает коэффициент значимости на основании на основе скорректированных средних значений, полученных после удаления 2% сигналов, обладающих максимальной и минимальной интенсивностью, как из контрольных, так и экспериментальных наборов.

После нормализации была проведена оценка прочитанных последовательностей с использованием метода скользящего среднего значения, с размерами окна 25, 35 или 75 п.н. и было рассчитано отношения R между значениями, полученными для экспериментальных и контрольных библиотек. Максимум признавали связанным с белком Dps, если он обладал значением $R \geq 1.5$ как минимум для 50% позиций и длине 60 п.н. геномной области, что соответствует предполагаемой длине сайта связывания белка Dps [30]. Области генома, имеющие значение $R < 1$ для всех позиций обоих экспериментов и включающие как минимум 60 п.н., но не перекрываются с областями, выявленными с помощью программы CLC Genomics Workbench version 7.5.1 (CLC GW, Bio-Qiagen, Дания) при значении $p\text{-values} < 0.0001$ были сгруппированы в набор не взаимодействующих областей «unbound regions» (UR). Соседние области объединялись в том случае, если расстояние между ними составляло менее 30 п.н., а величина значения R во всех промежуточных положениях не превышали 1.1.

2.25 Биоинформатический анализ данных о сайтах связывания Dps в бактериальной хромосоме

Было проведено сопоставление более ста геномных областей с различными функциональными характеристиками с наборами выявленных сайтов связывания Dps. Согласно данным, полученным с помощью методов ChIP-chip [247, 287, 288] и ChIP-seq [289, 290, 291], эти геномные области

включают в себя сайты связывания различных белков, предсказанные биоинформатически «*промоторные островки*» [285, 165], REP-элементы, аннотированные для генома *E.coli*, а также прямые или инвертированные повторы, идентифицированные с помощью программного обеспечения Unipro UGENE [292].

На предварительном этапе, геномные координаты для всех наборов полученных данных были сопоставлены с актуальной версией генома *E.coli* MG1655 (U00096.3). Затем было проведено сопоставление областей генома, занимаемых Dps с каждым интересующим белком или конкретным структурным элементом. После этого был проведен расчет и сравнение ожидаемого числа перекрывающихся пар оснований в двух анализируемых наборах, и, в случае их независимого распределения, включалось в соответствующий набор данных. Сопоставление полученных результатов осуществляли с данными полученными с помощью методов ChIP-chip и ChIP-seq обработанными их авторами по области расположения левой и правой границе сайтов связывания выявленных ими белков [288, 289, 290, 291], которые были использованы для сравнения с сайтами связывания Dps. Сформированные, таким образом, наборы данных с использованием результатов ChIP-chip [224, 287], содержали пробы длиной 60 п.н. с усредненным и нормализованным значением коэффициента обогащения. На основании проведенных расчетов были отобраны области генома длиной 60 п.н. обладающие, как минимум, двукратным коэффициентом обогащения, которые сопоставлялись с областями занятых Dsp и свободных от него. Аналогичным образом, на основании данных полученным методом ChIP-seq, оценивалось совпадение с сайтами связывания σ^{70} субъединицы РНК-полимеразы клеток *E.coli* выращенных аэробно, которые представлены в виде точечных координат значений максимумов для прочтений нуклеотидных последовательностей, имеющих длину 36 п.н. [290].

2.26 Поиск доминирующей нуклеотидной последовательности сайтов связывания белка Dps

Поиск нуклеотидной последовательности, наиболее часто встречающейся в составе сайтов связывания Dps, осуществляли с помощью набора компьютерных программ MEME (версия 4.11.2) [293] и DMINDA [294] по стандартному протоколу. Оба пакета программ использовали в дискриминационном режиме, чтобы выявить нуклеотидные последовательности, которыми обогащены библиотеки ДНК, полученные для экспериментальных образцов по сравнению с набором последовательностей контрольных образцов.

2.27 Анализ экспрессии генов с использованием ПЦР в реальном времени

Выделение тотальной РНК осуществляли из нативных *E.coli* K12 MG1655 или их мутантного типа с делетированным геном *dps* с использованием реактива TRIzol (Ambion, США) и последующей обработкой ДНКазой I (New England Biolabs, США) в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. Нуклеотидные последовательности использованных для этого праймеров приведены в Табл. 3. Объем реакционной смеси для получения кДНК составлял 25 мкл и содержал 1 или 2 мкг РНК и 80 U ревертазы RevertAid (Thermo Scientific, Литва) в соответствии с рекомендациями производителя. Два микролитра этой смеси впоследствии было использовано для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени, которую проводили в объеме 20 мкл, содержащим 4 мкл коммерческой смеси реагентов qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия). Реакцию осуществляли с использованием детектирующего амплификатора DTlite (ДНК-Технологии, Россия). Программа для амплификации включала следующие этапы: 1 минута - предварительное плавление при 95°C, далее следовало 35 циклов по следующей схеме: плавление 95°C - 20 секунд, отжиг при 56°C - 20

секунд, и синтез при 72°C в течение 25 секунд. Интенсивность флуоресценции SYBR Green I измерялась в течение 15 с. в конце каждого цикла. Образцы, не содержащие обратной транскриптазы, использовались в качестве отрицательного контроля. РНК-продукты генов *usaA* и *lacZ* были использованы в качестве эталона для оценки эффективности экспрессии хромосомных генов. Транскрипция *usaA* осуществляется в антисмысловом направлении, а *lacZ* был выбран из области не занятой Dps (Таблица 3), а по результатам, полученным в нескольких экспериментах, рассчитывалось среднее значение их экспрессии. А для проведения ПЦР в режиме реального времени для системы репортерной детекции на базе белка GFP, в качестве эталона был использован устойчивости к воздействию канамицина. Уникальность полученных ПЦР-продуктов оценивали электрофоретически в 5% ПААГ. Обработку полученных данных и статистический анализ осуществляли с использованием программного обеспечения qPCR (ДНК-Технологии, Россия). Оценку достоверности полученных результатов проводили с использованием t-теста Стьюдента.

2.28 Анализ экспрессии генов с использованием системы репортерной детекции на базе белка GFP

Для оценки возможности влияния Dps на эффективность экспрессии собственного гена его регуляторную область с использованием праймеров *dps_F1* и *dps_R2* (Табл. 3), клонировали в плазмиду pET28b-eGFP так, что бы регуляторная область гена *dps* располагалась перед геном *gfp* [295]. После этого была выполнена трансформация с использованием полученной плазмиды мутантных клеток *E.coli* не содержащих ген *dps*, и клеток дикого типа. Интенсивность флуоресценции колоний полученных трансформантов выращенных на питательной среде твердой питательной среде LB в присутствии канамицина (20 мкг/мл) регистрировали с использованием микроскопа Leica (объектив 2.5x). В качестве контроля использовали клетки, содержащие плазмиду без вставки регуляторной области гена *dps* перед

кодирующей областью гена *gfp*. Обработку полученных изображений проводили с использованием компьютерной программы ImageJ [295].

2.29 Подготовка образца, содержащего Dps, и регистрация XANES-спектров в сверхвысоковакуумных условиях с использованием синхротронного излучения в мягком рентгеновском диапазоне

Метод регистрации спектров XANES представляет собой вид абсорбционной спектроскопии и является одним из самых информативных для изучения структуры твёрдых тел. Для регистрации спектров XANES используется комплекс аппаратуры обеспечивающей получения структурной информации при незначительном изменении энергетического положения осцилляций спектра (~ 0.2 эВ) или расщепления спектральных пиков. Это позволяет использовать XANES-спектроскопию не только для исследования локальной структуры различных твёрдых тел (высокотемпературные сверхпроводники, фуллерены, тонкие моноатомные слои, сверхлегкие 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 1000эВ), поэтому ярко выраженная их тонкая структура для $L_{2,3}$ – краев 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 перспективным для исследования биологических макромолекул, особенно учитывая тот факт, что он относится к неразрушающим методам.

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 промывали дистиллированной водой в течение 30 сек. и высушивали в течение 5 мин. 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 трех недель.

Экспериментальные спектры XANES вблизи $L_{2,3}$ -края поглощения железа были получены на российско-германском канале (RGL) синхротрона BESSY II в Гельмгольц-центре (Берлин, Германия). Аппаратурное уширение составило 0.1эВ, 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 частиц в диапазоне 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 [154].

2.30 Регистрация Мёссбауэровских спектров концентрированного раствора белка Dps

Для регистрации Мессбауэровских спектров 100-120 мкл образца, содержащего белок Dps с концентрацией 2.0-2.5 мг/мл, наносили в кювету и замораживали в парах жидкого азота и помещали на подвижном штоке модулятора спектрометра. Мессбауэровские спектры образцов

регистрировались с использованием спектрометра MS1104Em (ЮФУ, Россия) при температуре 77° К, с использованием геометрии поглощения и режиме постоянных ускорений (- 8 мм/с). В регистрации спектра было задействовано 1024 канала прибора, а активность источника во время измерения составляла 20 мКи. Для калибровки спектрометра использовался эталонный образец металлического железа α -Fe. Полученные результаты обрабатывались с использованием программного обеспечения UNIVEW и стандартного теста « χ^2 ».

2.31 Анализ размеров неорганических частиц, входящих в состав олигомеров Dps, с применением просвечивающей электронной микроскопии

Измерения проводились с использованием микроскопа Carl Zeiss Libra 120. Ускоряющее напряжение составляло 120кВ. Для проведения анализа тонкие углеродные сетки погружали в раствор с концентрацией 0.4-1.0 мг/мл очищенного белка Dps или белка, насыщенного ионами железа. После этого сетку помещали в камеру микроскопа, где происходило ее высыхание в вакууме, после чего осуществлялась регистрация изображений из разных областей образца с различным увеличением. Полученные изображения были проанализированы с использованием программного обеспечения Altami studio 3.4. Процедура включала коррекцию фона, идентификацию неорганических частиц и их характеристику. Обнаруженные частицы были аппроксимированы как окружность, диаметр которой впоследствии измеряли. Для устранения шума, для расчета брали частицы сферической формы, обладающие коэффициентом округлости в диапазоне от 1.0 до 1.2.

2.32 Моделирование процессов взаимодействия лигандов различной природы с олигомерами белка Dps методом последовательного молекулярного докинга

Для моделирования взаимодействия молекул углеводов (α -D-глюкоза, D-галактуронат и D-глюкуронат) и оксидов железа (FeO, Fe₂O₃) с олигомером белка Dps был использован метод последовательного молекулярного докинга. В качестве мишени была использована модель додекамера белка Dps (код: 1dps) взятая из международной базы данных, содержащую информацию о структурах белка Protein Data Bank [67]. Данная модель была получена методом рентгеновской дифракции с разрешением 1,6 Å, что является достаточным для расчетов методом гибкого молекулярного докинга [276]. В процессе подготовки модели белка к проведению расчетов из ее структуры были удалены присутствующие в ней молекулы воды и ионы натрия.

Модели углеводов, которые были использованы в качестве лигандов для докинга, были получены в циклической форме с использованием базы данных PubChem DB и программного обеспечения Open Babel (v. 2.2.3) [276]. Для проведения гибкого молекулярного докинга использовали пакет программ Autodock VINA [278]. Расположение лигандов на поверхности молекулы-мишени визуализировали с помощью Python Molecular Viewer (v. 1.5.6) [279]. Для докинга была использована вся поверхность белка Dps в ячейке размером 124×124×124 Å. Было проведено три серии последовательных расчетов по 120 раундов для каждого углевода. В каждой серии очередного раунда докинга модель лиганда с наибольшей аффинностью добавлялась к модели мишени, а полученная, таким образом, новая модель использовалась в качестве мишени для следующего раунда. В итоге были получены структуры, состоящие из одной молекулы олигомера Dps и 1-120 молекул соответствующего углевода.

Модели FeO и Fe₂O₃ были получены с использованием программного обеспечения Avogadro (1.2.0n-win32) [280], а их геометрия была оптимизирована с помощью 15 итераций в универсальном силовом поле. Расположение оксидов на поверхностях Dps оценивалось с использованием

программного пакета Autodosk VINA [278]. Серии расчетов были независимо выполнены для FeO и Fe₂O₃ в 50 последовательных раундах докинга аналогично тому, как было описано в предыдущем абзаце. В результате две конечные модели содержали одну молекулу додекамера DPS и 50 молекул FeO или Fe₂O₃.

2.33 Поиск сайтов связывания для факторов транскрипции *in silico* в геноме *E.coli*

Обогащение 78 «промоторных островков» сайтами связывания различных регуляторных белков оценивали с использованием программного обеспечения Virtual Footprint [316] с помощью которого было сформированы весовые матрицы для 53 транскрипционных факторов *E.coli*. Анализ проводили с использованием двух ранее сформированных наборов нуклеотидных последовательностей [305]. Первая из них (положительный контроль) содержал 78 отдельных промоторов, стартовые точки транскрипции которых были помещены в центр фрагмента ДНК длиной 301 п.н. (наименьшая длина промоторного острова). Другой (отрицательный контроль) состоял из 78 внутригенных непромоторных нуклеотидных последовательностей длиной 301 п.н. Во всех случаях для поиска сайтов связывания использовались базовые параметры поиска (чувствительность – 0.8; чувствительность для области ядра длиной 5 п.н. – 0.9).

ГЛАВА III. ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как отмечалось в Обзоре литературы, белок Dps является основным архитектурным фактором бактериального нуклеоида на стационарной фазе роста. Таким образом, его внутриклеточное содержание является своеобразным индикатором перехода клеток к росту в условиях ограниченного доступа источников питания. Однако компоненты микро- и макроокружения могут оказать существенное влияние, как на синтез этого белка, так и на реализацию им той или иной функции. Тем не менее, стоит учитывать, что практически весь содержащийся в клетках Dps ассоциирован с ДНК, так что примерно на каждые 25 пар нуклеотидов геномной ДНК приходится один мономер Dps. Но конформацию бактериальной хромосомы определяют не только белки нуклеоида [18], но и белки аппарата транскрипции и факторы, контролирующие экспрессию генома. Тем не менее, на стационарной фазе именно Dps играет определяющую роль и, следовательно, изучение свойств олигомеров Dps и их микроокружение, а также исследование молекулярных механизмов регуляции, в которых он может принимать участие, представляет чрезвычайно актуальную задачу. Учитывая наличие неорганического ядра внутри белковой полости Dps, состоящего из ионов железа и потенциально обладающего магнитными свойствами, можно предположить наличие у молекул Dps собственного магнитного момента. Следовательно, вариации интенсивности внешнего электромагнитного фона может оказывать влияние на свойства и характеристики молекул этого мультифункционального белка. Учитывая особенности механизма регуляции экспрессии *dps*, такое воздействие может отразиться на эффективности его транскрипции, и, следовательно, привести к изменению внутриклеточного содержания белка Dps. Таким образом, олигомеры Dps, с одной стороны, могут рассматриваться как гибридный биологический объект наноразмерного диапазона, а с другой стороны, как природный клеточный биосенсор электромагнитного фона. Если

это так, то, прежде всего, необходимо оценить влияние электромагнитного излучения на эффективность экспрессии гена *dps*.

3.1 Ферритин-подобный белок Dps как биосенсор и наноструктура

Ранее было показано, что экспозиция клеток *E.coli* на протяжении 5 – 60 минут воздействию электромагнитного излучения сантиметрового диапазона (ЭМИ СВЧ) практически не влияет на параметры кривой роста бактериальной культуры, но сопровождается изменениями спектра синтезируемых белков [1]. Было также выявлено, что один из белков, внутриклеточное содержание которого проявляло зависимость от ЭМИ СВЧ, обладает молекулярной массой около 18.6 кДа, а значение его изоэлектрической точки находится в области значения рН 5.7. Это очень близко к значениям, характерным для белков Dps. Поэтому было исследовано влияние ЭМИ СВЧ на экспрессию гена *dps* в бактериальных клетках методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Для этого были использованы праймеры, подобранные так, чтобы регистрируемый сигнал отражал количество прочитанной до конца мРНК, что обеспечивало максимальное снижение погрешности, возникающей в результате преждевременной остановки транскрипции на аттенюаторах. Синтез мРНК гена *dps* начинается на промоторе P_{dps} [12, 101]. Его стартовая точка хорошо детектируется компьютерной программой PlatProm [165]. Кроме него, компьютерное сканирование исследуемого генетического локуса выявило еще два промотор-подобных участка, P_{a1} и P_{a2} , с которых теоретически может идти синтез РНК, антисмысловых к *dps*-мРНК [219].

Выбранные нами праймеры оказались высокоспецифичными. При амплификации с их использованием был зарегистрирован синтез только одного продукта ожидаемой длины как при использовании геномной ДНК в качестве матрицы, так и при постановке реакции с кДНК (Рис. 18С). Результаты исследования зависимости интенсивности флуоресценции (краситель SYBR Green) от числа циклов амплификации кДНК для опытного и контрольного

образцов приведен на Рис. 18А. Условия воздействия ЭМИ СВЧ описаны в работах [1, 219].

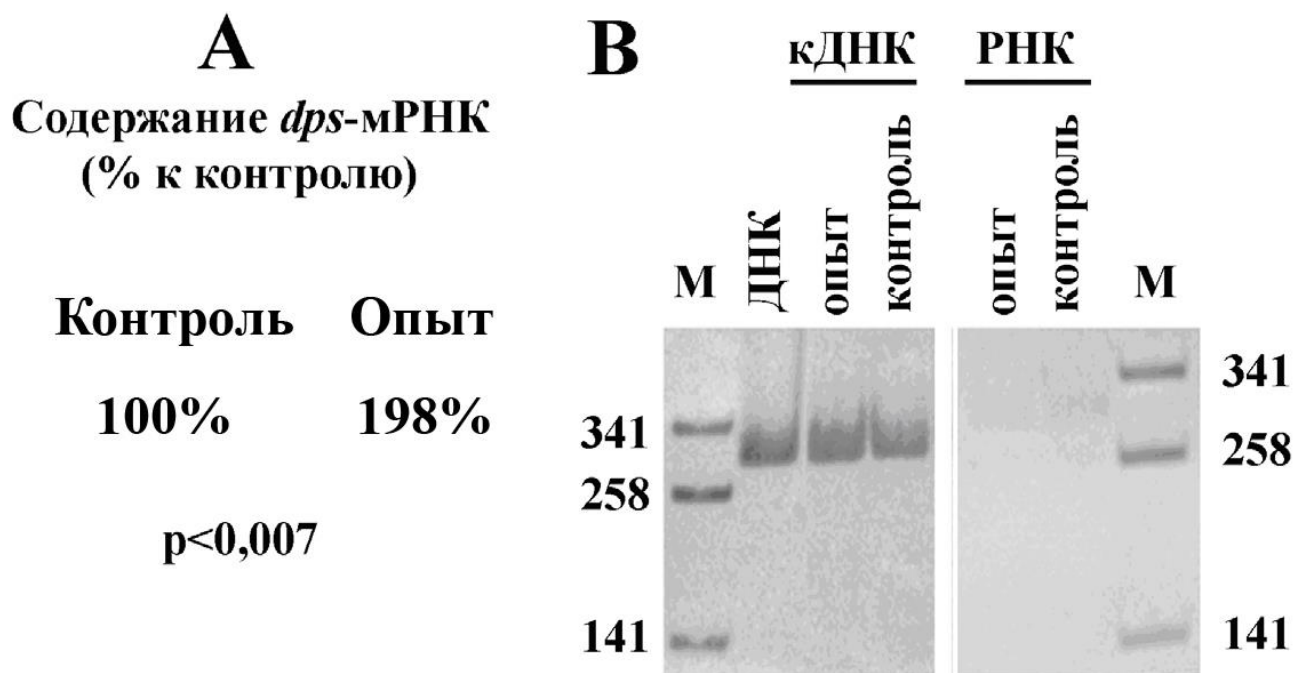


Рис. 18. Влияние ЭМИ СВЧ на внутриклеточное содержание мРНК гена *dps*. А) Результат статистического анализа данных с использованием программы q_PCR. С) Электрофоретический контроль специфичности полученных ампликонов с кДНК. М – маркер длины ДНК (пар оснований).

Динамика изменения сигнала флуоресценции свидетельствует о позитивном влиянии ЭМИ СВЧ на внутриклеточное содержание мРНК гена *dps*. Это вполне соответствует предположению, сделанному на основании данных, полученных методом двухмерного электрофореза белков. Так как синтез ампликонов не наблюдался в образцах, содержащих РНК без обратной транскриптазы (Рис. 18С), можно полагать, что зарегистрированное изменение отражает реальную ситуацию. Это означает, что регуляторные системы бактериальных клеток реагируют на электромагнитное излучение, а в формировании адаптивного ответа может принимать участие ферритин-подобный белок Dps, способный взаимодействовать с ДНК.

Полученные результаты пока не позволяют судить о том, насколько велика роль Dps в активации собственной транскрипции. И хотя он является мажорным белком бактериального нуклеоида, пока нет объективной

информации, свидетельствующей о том, что взаимодействие Dps с ДНК не определяется какой-то конкретной нуклеотидной последовательностью. Круг генов, экспрессия которых зависит от Dps, пока не установлен. Тем не менее, можно выдвинуть предположение о том, что роль первичного рецептора ЭМИ СВЧ может выполнять додекамер Dps, содержащий неорганическое ядро. Оно позволяет его молекулам улавливать изменения электромагнитного фона. Если предположить, что электромагнитное излучение влияет на равновесие между олигомерными формами Dps, то его воздействие должно приводить к каким-то изменениям компактности нуклеоида, от которой зависит профиль экспрессии всего генома. Очевидно, что другие ферритины, накапливающие ионы железа внутри белковой полости, тоже могут реагировать на электромагнитное излучение. Но только взаимодействующий с ДНК ферритин-подобный Dps может трансформировать полученный сигнал в изменения профиля генной экспрессии, то есть в адаптивный биологический ответ.

Выявленные факты влияния электромагнитного излучения низкой интенсивности на экспрессию *dps* открывают возможность его использования в качестве репортерного гена для мониторинга уровня техногенного излучения в окружающей среде. Однако процесс трансдукции сигнала от внешнего физического фактора в адаптивный биологический ответ требует всестороннего понимания механизмов передачи такого сигнала и, следовательно, более детального исследования структурно-функциональных характеристик растворов Dps, его одиночных молекул, молекул Dps в составе нуклеопротеидного комплекса, а также изучения органических и неорганических компонентов данного мультифункционального белка.

3.2 Исследование физико-химических характеристик рекомбинантного белка Dps

Окисление и запасание ионов железа в своей белковой полости в виде гидратированных оксидов является одной из основных биологических функций

белка Dps. Поэтому в бактериальных клетках он находится в ассоциированном с ионами железа состоянии [209, 215]. Число этих ионов может варьировать от 24 (фиксированы в ферроксидазных центрах белка) до 400 (формируют минерализованные ядра в полости белка). Это значит, что молекулярная масса очищенного белка может варьировать в широком диапазоне. На Рис. 19 приведены результаты восстановления седиментограммы нативного белка Dps и его апо-формы в координатах распределения по молекулярной массе $c(M)$. Для большей наглядности полученных результатов использовали программное обеспечение SEDFIT [325].

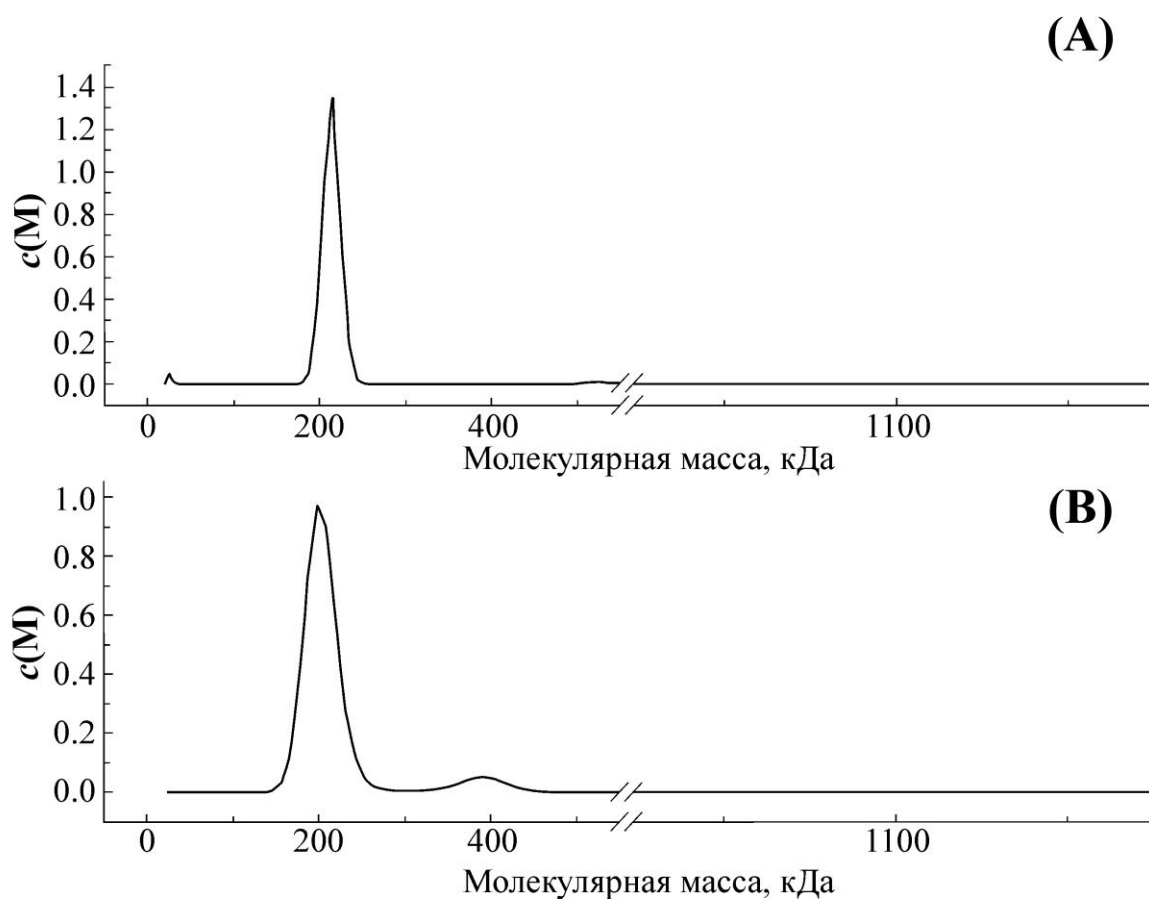


Рис. 19. Седиментационные данные апо-формы белка Dps (A) и нативного белка Dps (B) в координатах $c(M)$

Согласно полученным экспериментальным данным основной максимум кривой распределения молекулярных масс образца, содержащего апо-Dps, располагается при значении молекулярной массы около 220 кДа, что хорошо соответствует теоретической величине, рассчитанной из его первичной

аминокислотной последовательности ($18695 \text{ кДа} \times 12 = 224340 \text{ кДа}$). Для нативного белка этот же пик имеет плечо, соответствующее молекулярной массе 230 кДа. Кроме этого в эксперименте был зарегистрирован второй пик, соответствующий молекулярной массе димера додекамера ($\sim 400 \text{ кДа}$). Изменение молекулярной массы белка при получении его апо-формы отражает очистку его внутренней полости от ионов железа и других компонентов, которые могут в ней присутствовать, и свидетельствует о зависимости олигомерной формы белка от ионов железа.

Таким образом, в полученном нами образце были обнаружены молекулы в разной степени насыщения ионами железа. Наличие апо-формы может быть обусловлено тем, что биосинтез рекомбинантного белка Dps осуществлялся в условиях его суперпродукции в клетках *E.coli* без дополнительного притока ионов железа из внешней среды. В целом характер распределения констант седиментации полученного белка отражает сохранение им додекамерной формы в процессе выделения и хроматографической очистки.

Для анализа вариаций олигомерных форм, присутствующих в растворе нативного белка после его выделения и очистки, был использован метод динамического светорассеяния. На Рис. 20 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 [209]. Кроме этого, в соответствии с данными седиментационного анализа (Рис. 19В) были зарегистрированы максимумы, соответствующие размеру частиц около 300-400 нм, но их доля не превышала 7,1% от величины общего вклада всех максимумов, что, вероятно, отражает способность Dps к самоагрегации [30].

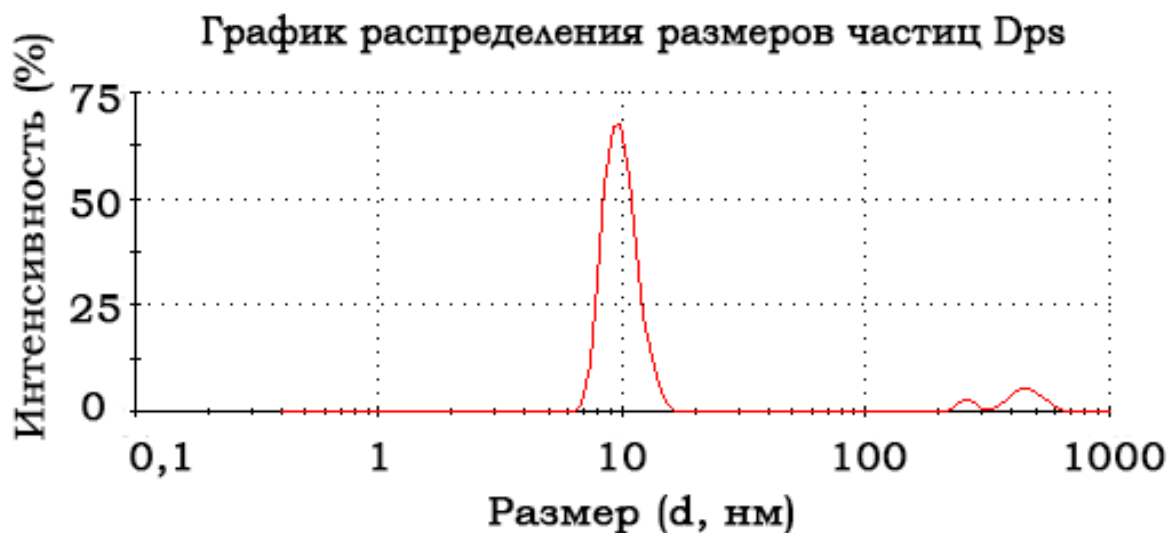


Рис. 20. Результат оценки размеров диаметра частиц (нм), присутствующих в растворе нативного белка Dps при 25°C с использованием метода динамического светорассеяния

Возможно в растворе присутствуют также олигомеры меньшего порядка, но в условиях данного эксперимента их выявить не представляется возможным. Тем не менее, произведенные нами манипуляции в процессе выделения и очистки белка не привели к значительным изменениям олигомерной формы белка Dps. Поэтому на следующем этапе (Рис. 21А) было проведено исследование топологии поверхности слюды с нанесенным на нее препаратом белка методом атомно-силовой микроскопии (АСМ).

В данном случае концентрация белка составляла около 1 нг/мкл, что на несколько порядков меньше, чем в экспериментах с применением метода динамического светорассеяния. Это позволяет оценить размеры одиночных олигомеров. Важно также, что в экспериментах с применением АСМ анализируется поверхность слюды с высушенными частицами Dps, что позволяет оценить способность олигомеров сохранять свои размеры в таких условиях (Рис. 21).

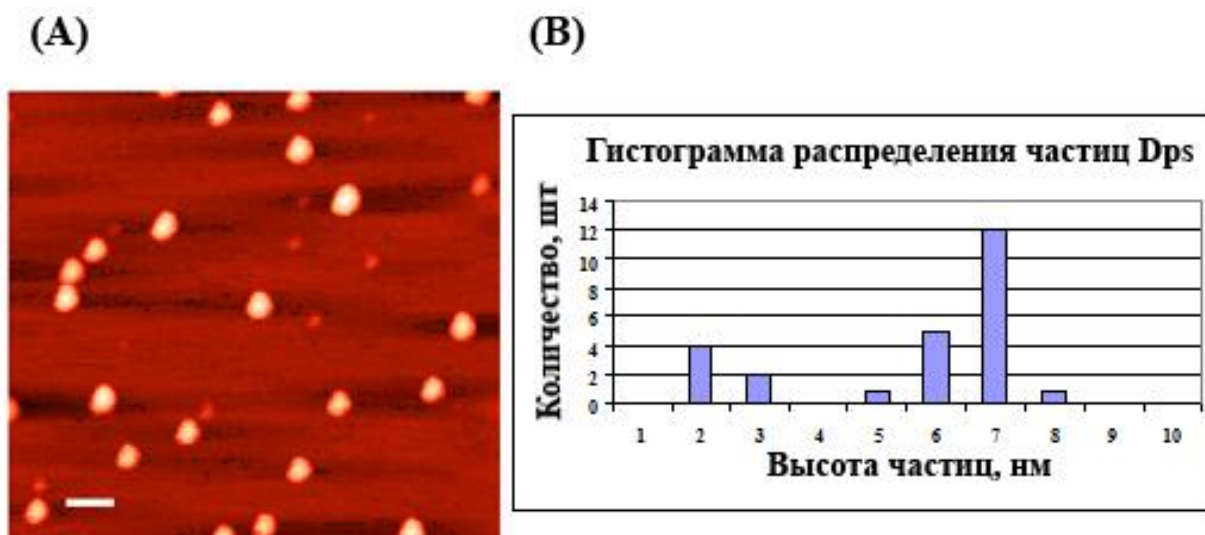


Рис. 21. (А) - пример АСМ-изображения нативного Dps (белая черта соответствует 100 нм); (В) - гистограмма распределения высот измеренных частиц белка Dps.

Учитывая особенности метода, для расчета размеров использовали только значение высоты выявленных частиц. Полученные результаты свидетельствуют о том, что данные частицы преимущественно имеют размер около 7 нм. Обнаружены также частицы, обладающие меньшими размерами, наличие которых может быть связано с частичной деградацией белка в процессе его высыхания на поверхности слюды, а также кристаллизацией солевых компонентов буферного раствора во время удаления влаги. Таким образом, основная группа частиц, присутствующих в растворе белка, обладает размерами, которые соответствуют литературным данным [67], а различие их размеров может свидетельствовать о присутствии в препаратах олигомеров меньшего размера или о влиянии процедуры пробоподготовки на геометрические размеры молекулы.

Важной физико-химической характеристикой белков являются спектры их собственной флуоресценции, которые могут свидетельствовать о микроокружении флуоресцирующих аминокислотных остатков и о конформационных изменениях, происходящих в белковой молекуле. Спектр флуоресценции очищенного препарата белка Dps показан на Рис. 22.



Рис. 22. Спектр флуоресценции белка Dps при 20°C

Оказалось, что, несмотря на относительно небольшое число ароматических аминокислот входящих в состав мономера (2 остатка триптофана, 3 остатка тирозина, 5 остатков фенилаланина), Dps имеет выраженный спектр испускания флуоресценции с максимумом в области плато 335 нм (Рис. 22). Это свидетельствует о том, что основной вклад в формирование спектра вносят остатки триптофана. Учитывая положение максимума и согласно принятой классификации [2], с высокой степенью вероятности можно предположить, что эти остатки находятся в белковой глобуле в неполярной (внутренней) форме. Следовательно, изменение параметров спектра будут преимущественно связаны со сменой положения именно этих остатков аминокислот в структуре олигомера.

Полученные экспериментальные данные о влиянии электромагнитного излучения на экспрессию гена *dps*, и литературные данные, свидетельствующие о способности додекамера Dps окислять и накапливать ионы железа внутри своей полости в виде оксида, предполагают наличие собственного магнитного момента у ферритового ядра Dps. Поэтому была предпринята попытка оценить влияние этого белка на магнитные свойства поверхности слюды с использованием специального вида АСМ (Рис. 23).

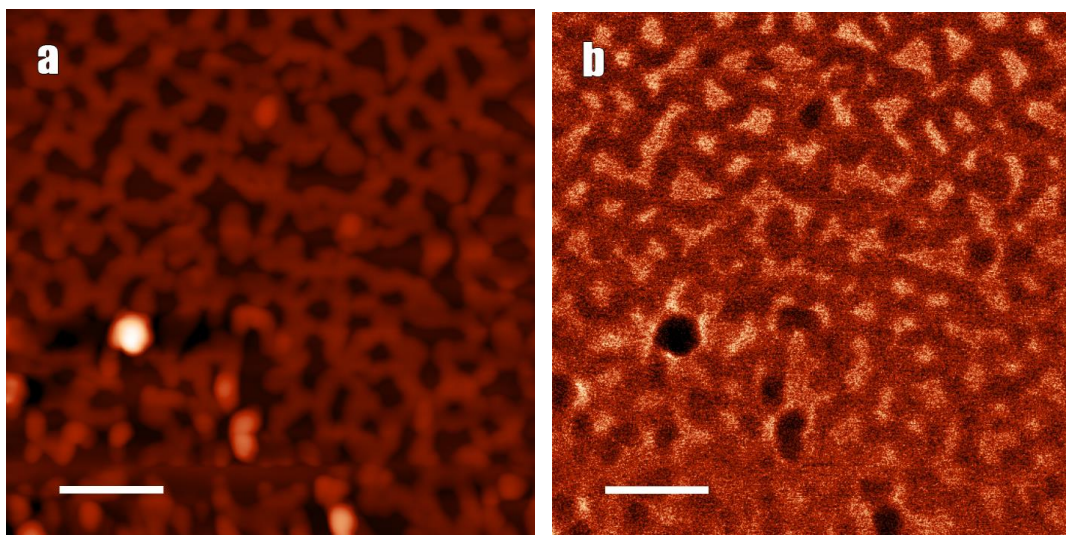


Рис. 23. а – рельеф поверхности подложки с нанесённым белком Dps; б – магнитные свойства поверхности этой подложки; белая черта на рисунках соответствует 100 нм.

На панелях а и б Рис. 23 приведены изображения одной и той же области в режимах отображения рельефа (панель а) и магнитных свойств (панель б). Хорошо различимы области, коррелирующие с расположением белковых молекул. Однако стоит учитывать, что исследование изменения магнитных свойств поверхности с нанесенным Dp при помощи такой модификации АСМ не позволяет получить количественные величины, а носит только качественный характер. Полученный результат позволяет, однако, сделать предварительный вывод о том, что раствор Dps влияет на магнитные свойства поверхности слюды и наиболее вероятной причиной формирования такого эффекта является тот факт, что молекулы Dps ассоциированы с металлами или их соединениями. Для получения информации о свойствах неорганического ядра, сформированного внутри белковой полости Dps, необходимо привлечение специальных методов. В частности ядерно-физических и рентгеноспектральных методов анализа, позволяющих получить информацию о свойствах раствора, об атомном и электронном строении, фазовом составе, а также особенностях взаимодействия молекул Dps с окружающей средой.

3.3 Синхротронные исследования в мягком рентгеновском диапазоне зарядового состояния ионов железа в составе неорганического ядра белка Dps *E.coli*

Исследование таких наноразмерных объектов, как молекулы белка Dps, представляющие собой гибридные биоорганические частицы, имеет большой научный и практический интерес [3, 209]. Этот интерес связан, с одной стороны, с тем, что они имеют фиксированный объём внутренней полости и это позволяет эффективно контролировать размерность их неорганической компоненты, а с другой стороны, наличие органической оболочки препятствует двухстороннему обмену кислородом, что вносит значительный вклад в сохранение свойств исходного материала. Достаточно полную информацию об атомном и электронном строении, а также фазовом составе ионов железа ассоциированных с Dps можно получить с использованием XANES-спектроскопии в области мягкого рентгеновского излучения. Вместе с тем следует учитывать высокую чувствительность этого метода к свойствам поверхности и ярко выраженную тонкую структуру регистрируемых спектров, как, например, в случае $L_{2,3}$ -краев поглощения Fe [47, 154], что предъявляет специфические требования к подготовке образцов для проведения исследований в условиях сверхвысокого вакуума [57]. Поэтому на начальном этапе было необходимо оценить применимость предлагаемого метода пробоподготовки для XANES-спектроскопии в области Fe $L_{2,3}$ -краев поглощения, и только после этого приступить к изучению специфики локального атомного окружения в неорганических ядрах осаждённых молекул белка.

На предварительном этапе были зарегистрированы XANES $L_{2,3}$ -спектры Fe_2O_3 и Fe_3O_4 , которые были использованы в качестве эталонов и дальнейшего сопоставления экспериментальных спектральных кривых, с последующим моделированием. Для этих же целей были использованы литературные данные о спектре FeO, который был зарегистрирован в аналогичных условиях [154]. Полученные данные отражают особенности распределения тонкой структуры в

зависимости от зарядового состояния ионов железа в составе FeO , Fe_2O_3 и Fe_3O_4 (Рис. 24). Энергетическое положение и распределение основных спектральных параметров находится в хорошем согласии с литературными данными [154]. 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. 24) имеют более сложную тонкую структуру краев поглощения, что обусловлено p - d - и d - d -кулоновским обменным взаимодействием электронов. Наличие двух максимумов (низкоэнергетический t_{2g} и высокоэнергетический e_g) тонкой структуры краев L_3 и L_2 с энергией расщепления $\sim 1,5$ эВ обусловлено действием кристаллического поля.

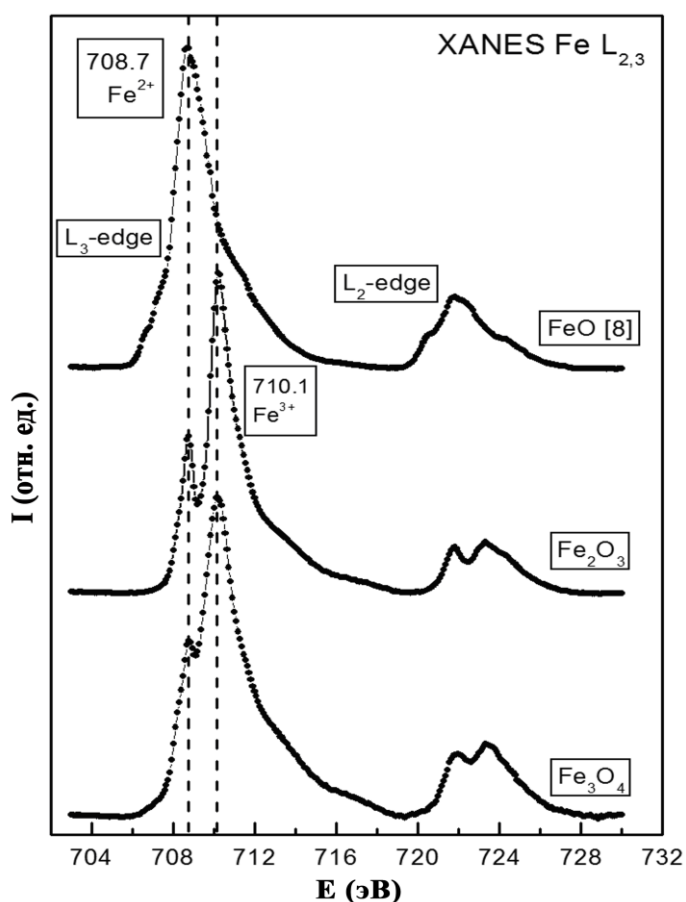


Рис. 24. XANES Fe $L_{2,3}$ спектры эталонных образцов оксидов железа FeO , Fe_2O_3 и Fe_3O_4 . E – энергия рентгеновского излучения (эВ), I – интенсивность рентгеновского излучения (отн.ед.).

Способ пробоподготовки, предложенный для регистрации спектральной кривой образца с содержащего молекулы белка Dps позволил зарегистрировать XANES $L_{2,3}$ -спектр железа, ассоциированного с белком (Рис.

25), и в его тонкой структуре наблюдается два пика $2t_{2g}$ - и $3e_g$ -края поглощения. Однако в целом тонкая структура L_3 -края железа, депонированного молекулами Dps, отличается от тонкой структуры всех эталонных спектров (Рис. 24), в том числе от структуры эталонного нанопорошка Fe_3O_4 . Стоит отметить, что интенсивность $2t_{2g}$ -пика спектра Dps выше, чем у всех использованных эталонных образцов. Такой результат может свидетельствовать в пользу того, что соотношение разнозарядных ионов железа в неорганическом ядре Dps является более сложным.

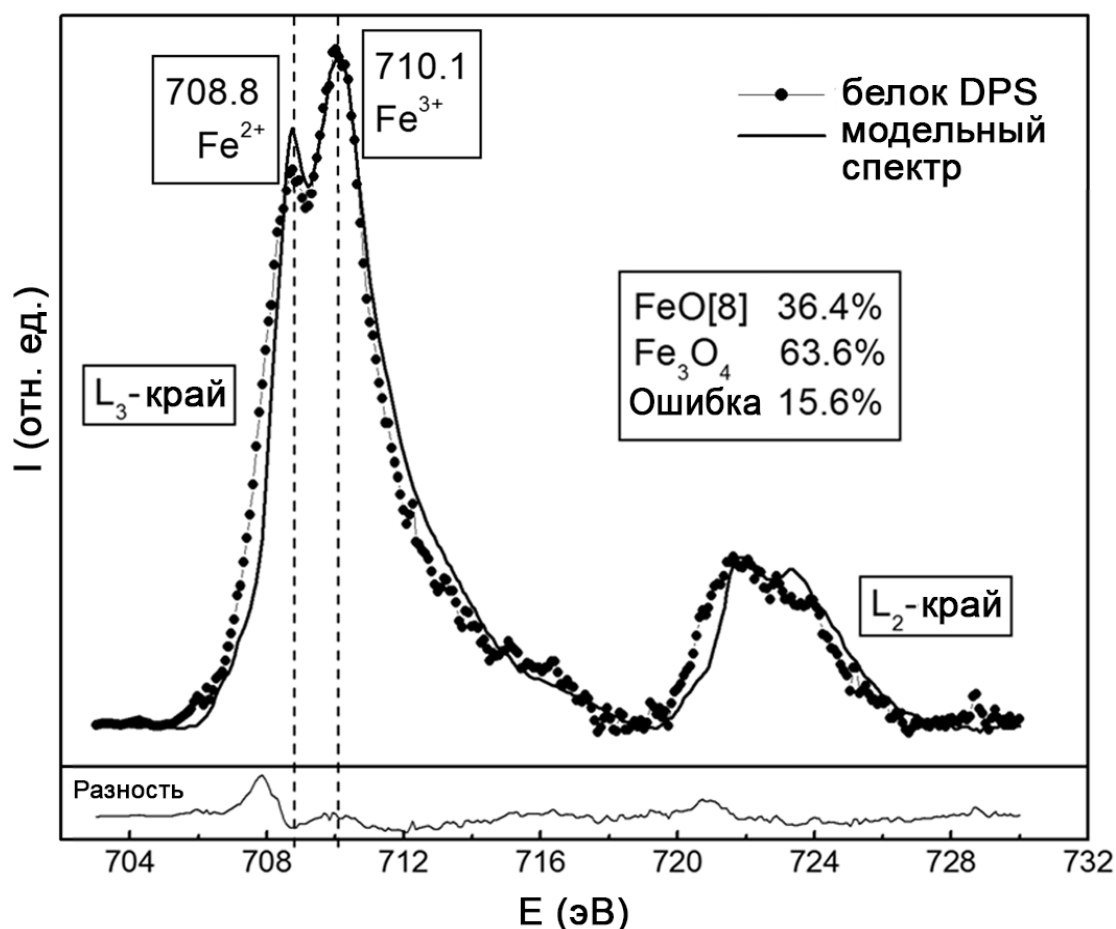


Рис. 25. XANES Fe $L_{2,3}$ спектр бактериоферритина Dps (точки) и модельный спектр (сплошная линия) совместно с результирующим вкладом выбранных спектров эталонов и разностным спектром (внизу)

Для выявления компонентов, которые потенциально могут входить в состав неорганического ядра белка, было применено математическое моделирование спектров с использованием методики, предложенной в работах [47, 175, 179, 180]. 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 Fe₃O₄, вклад которых составлял 36 и 64% соответственно. Это свидетельствует о наличии в составе Dps не только трехзарядного (Fe³⁺), но и двухзарядного (Fe²⁺) состояния ионов железа, причем в октаэдрическом и тетраэдрическом окружении атомами кислорода. Однако при интерпретации полученных результатов необходимо принимать во внимание тот факт, что в процессе подготовки пробы происходило осаждение молекул белка из водного раствора на подложку и последующее ее высушивание. Такие манипуляции могут приводить к изменению фазового состава неорганического ядра Dps из-за частичного или полного разрушения его олигомеров. Однако имеются литературные данные демонстрирующие возможность минерализации *in vitro* двухвалентного железа с участием ионов хлора в отсутствие O₂ и H₂O₂ [215]. Поэтому полученные данные вполне могут отражать естественное соотношение ионов железа в различном зарядовом состоянии в ядрах нативных молекул Dps. Свидетельствуя о наличии трёхвалентного железа в исследованном образце (Рис. 25), что соответствует ожидаемому результату, поскольку одной из основных функций Dps является окисление токсичного для клеток Fe²⁺ до Fe³⁺. Это также указывает на присутствие ионов Fe²⁺, т.е. на более сложный состав минерализованного ядра нативных молекул Dps. Учитывая полученные данные, возникает вопрос о том, способно ли присутствие ионов железа в полости Dps каким-либо способом отражаться на структуре его олигомера, особенно при условиях получения рекомбинантного белка, при которых индуцировался его синтез, но не осуществлялось дополнительного притока железа.

3.4 Увеличение концентрации ионов железа стабилизирует додекамерную форму Dps

Специфической особенностью Dps, которая значительно усложняет изучение его олигомерных форм и супрамолекулярных комплексов, является способность к самоагрегации его молекул. Считается, что в этом процессе участвуют положительно заряженные N-концевые участки мономеров. Они взаимодействуют с ДНК и могут связываться с отрицательно заряженной поверхностью соседних молекул Dps, образуя агрегаты большого размера [30]. Вследствие этого об эффективности взаимодействия Dps с фрагментами ДНК в условиях электрофоретического фракционирования сформировавшихся нуклеопротеидов судят не по образованию дополнительных полос на геле, которые соответствуют комплексам, а по убыванию свободных фрагментов ДНК [157, 298]. Другая техническая проблема, осложняющая проведение исследований молекул Dps, связана с его положительным зарядом и переменным числом ионов железа, расположенных в его внутренней полости. Так, согласно полученным нами данным, молекулярная масса нативного Dps примерно на 10 кДа больше молекулярной массы апо-белка (Рис. 19).

Чистоту полученного препарата белка Dps и наличие в нем посторонних примесей оценивали с использованием электрофоретического фракционирования в денатурирующих условиях с использованием 12,5% ПААГ (Рис. 26А). А для оценки олигомерного состава использовали два метода: электрофоретическое фракционирование в нативных условиях в 5% ПААГ (Рис. 26В и 26С) и фракционирование с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), результаты которого приведены на Рис. 26D. Принимая во внимание вклад положительно заряженных ионов железа в подвижность олигомеров Dps, фракционирование в нативных условиях осуществляли как в направлении от анода к катоду, так и в обратном направлении (Рис. 26В). Для оценки изменений профиля

присутствующих в растворе олигомеров от наличия ионов железа, раствор белка титровали свежеприготовленной солью Мора $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$.

В результате фракционирования в нативных условия (Рис. 26В) было выявлено несколько олигомерных форм белка, обладающих различной электрофоретической подвижностью. Две фракции имели суммарный отрицательный заряд и мигрировали к аноду. Одна фракция оставалась в верхней части геля, а другая мигрировала в противоположном направлении, т.е. обладала слабо выраженным положительным зарядом. Количество такой фракции явно увеличивалось с возрастанием концентрации $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$. При достижении концентрации соли Мора значения 1 мМ она становилась доминирующей, в то время как фракции олигомеров с меньшей молекулярной массой не детектировалась.

Ранее сообщалось о том, что присутствие солей в высокой концентрации (500 мМ NaCl и 2мМ ZnCl_2) вызывает формирование додекамеров Dps-1 *Deinococcus radiodurans* [299]. Но при его электрофоретическом фракционировании в таких условиях было выявлено наличие димеров, тетрамеров и гексамеров [299], присутствие которых не было зарегистрировано в результате фракционирования Dps *E.coli* в присутствии 1мМ соли Мора (Рис. 26В, дорожка 6).

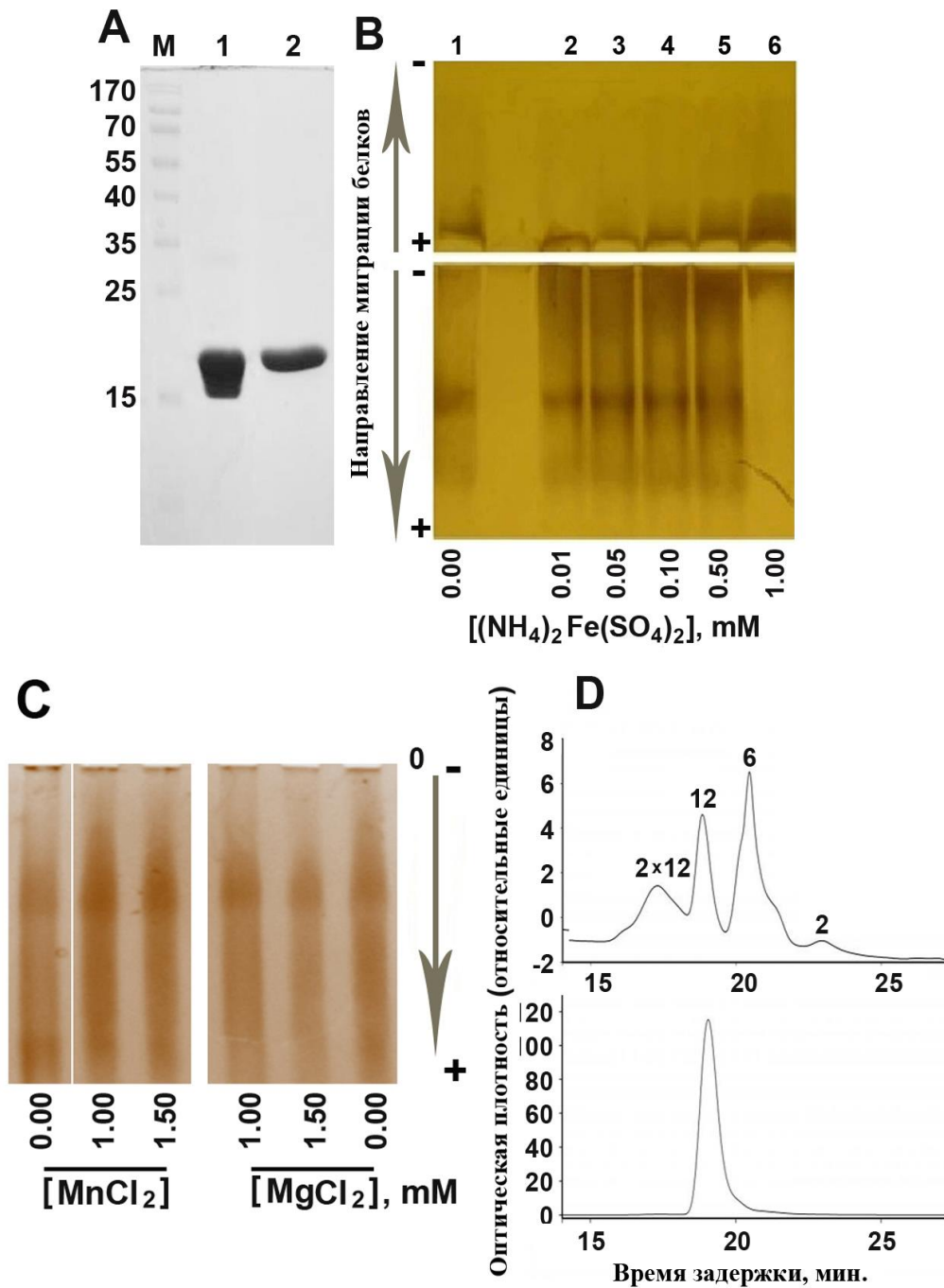


Рис. 26. Оценка олигомерного состояния рекомбинантного белка Dps. А: Фракционирование Dps в 12.5% ПААГ после ионообменной хроматографии (дорожка 1) и гель-фильтрации (дорожка 2). М-Маркеры молекулярной массы (кДа). В: Титрование очищенного Dps (~ 8.3 мкМ) солью Мора (рН 7.0). Дорожка 1 – нативный Dps; дорожки 2-6 – нативный Dps в присутствии 0.01-1 мМ соли Мора, соответственно. Вертикальные стрелки указывают направление фракционирования. С: То же самое для Dps, в присутствии MnCl_2 и MgCl_2 . D: профили элюции Dps (1 мг/мл) в системе ВЭЖХ для нативного Dps (верхняя панель) и насыщенного 1 мМ солью Мора (нижняя панель). Олигомерные формы, соответствующие наблюдаемой скорости миграции, указаны над соответствующими максимумами.

Тем не менее, есть вероятность того, что наблюдаемый эффект может возникать в результате изменения ионной силы раствора. Поэтому был проведен аналогичный эксперимент не в присутствии $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$, а с использованием MgCl_2 или MnCl_2 в аналогичных концентрациях (Рис. 26С). Соли магния и марганца были выбраны как модельные объекты. С одной стороны, магний имеет постоянную валентность, а марганец имеет переходную валентность, аналогичную железу. Полученные данные свидетельствуют о том, что присутствие этих солей не приводит к значительным изменениям в распределении олигомерных форм Dps *E.coli*. Следовательно, ионная сила не может рассматриваться как основной фактор, стимулирующий наблюдаемую олигомеризацию белка, а отсутствие явных отличий в присутствии MgCl_2 и MnCl_2 свидетельствует против предположения о том, что обнаруженный эффект опосредован каталитической активностью Dps.

Данные, полученные с использованием ВЭЖХ, свидетельствуют о присутствии двух доминирующих олигомерных форм в нативном препарате Dps (Рис. 26D, верхняя панель). Основываясь на полученных ранее данных о седиментации для апо-формы и нативного белка Dps (Рис. 19), второй максимум можно соотнести с додекамерной формой Dps ($\text{MW} \approx 224\text{кДа}$), а максимумы, соответствующие большему времени задержки соответствуют гексамерам ($\text{MW} = 112.17\text{кДа}$) и димерам (37.39кДа) Dps. Максимум широкого пика, соответствующий времени элюции $\sim 17,2$ мин, может соответствовать димеру додекамеров Dps, которые иногда встречаются в образцах белка (Рис. 26D, верхняя панель). Результаты фракционирования раствора Dps с использованием ВЭЖХ в присутствии 1мМ $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$, как и в случае электрофоретического фракционирования, выявили резкое увеличение фракции олигомера с высокой молекулярной массой, которая соответствует додекамеру Dps (Рис. 26D, нижняя панель). Этот эффект хорошо воспроизводился для препаратов Dps с различным соотношением олигомерных форм, в том числе для раствора, содержащего фракции димеров и додекамеров. Выявленное отсутствие олигомеров с низкой молекулярной массой при насыщении раствора

белка солью Мора (Рис. 26D, нижняя панель), может указывать на то, что $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ воздействует на поверхность белка. Следовательно, можно предположить, что ионы железа стабилизируют основную функциональную олигомерную форму этого белка. Важно отметить, что, несмотря на общепринятую точку зрения, что Dps образует стабильные олигомеры, состоящие из двенадцати мономеров, его олигомерная форма зависит от нескольких факторов. Литературные данные свидетельствуют о существовании его более мелких [32, 215, 299, 300] или более крупных [215] олигомерных форм. Более того, возможно обратимое получение той или иной олигомерной формы Dps, например, путем изменения величины pH от 5 до 7 можно получить переход олигомерных форм от димеров до додекамеров и обратно [32]. Более того, когда образец додекамеров, полученных с помощью гель-фильтрации, снова использовался для фракционирования, через 40 мин. в нем можно было наблюдать присутствие димеров [32]. Поэтому можно обоснованно предположить, что додекамеры склонны диссоциировать во время хранения. Как было установлено с использованием АСМ, образцы белка были относительно гомогенными, но, тем не менее, содержали не более 20% частиц, имеющих меньший размер, чем додекамер (Рис. 21). В экспериментах с использованием седиментационного анализа было выявлено ~ 10% частиц, соответствующих по своим параметрам димерной форме додекамерного белка (Рис. 19). Методом динамического рассеяния света был выявлен только один максимум, соответствующий додекамеру Dps (Рис. 20). Чтобы объяснить зависимость олигомерной формы белка от присутствия $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$, было выдвинуто предположение, что эффективность олигомеризации может зависеть от образования оптимальных по размеру неорганических ядер внутри белковой полости Dps, которые играют роль внутреннего каркаса для белковой оболочки. С другой стороны, ионы железа могут оказывать воздействие, аналогичное лигандам, заполняя определенные сайты связывания на границе контакта мономеров Dps, а также внутри или на поверхности белковой глобулы. Поэтому на следующем этапе мы проверили первое предположение, сравнив

размер неорганических ядер, сформированных во внутренней полости нативного Dps и белка, насыщенного ионами железа.

3.5 Неорганические ядра во внутренней полости молекул Dps имеют не одинаковый размер

Для оценки размеров и морфологии внутренних неорганических ядер и их зависимости от степени доступности ионов железа был использован метод просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Для насыщения молекул Dps ионами железа была использована такая же концентрация соли Мора как и в предыдущем эксперименте, а концентрация белка составляла 0.4-1.0 мг/мл (Рис. 27). В обоих случаях было зарегистрировано наличие частиц, распределенных на тонкой углеродной сетке после высушивания образцов в условиях высокого вакуума. При этом наличие подобных частиц в образцах, содержащих апо-форму Dps, полученную с использованием метода ступенчатого диализа (Рис. 27С), и в образцах, содержащих только 1мМ $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ (Рис. 27D) зарегистрировано не было. Наблюдаемые частицы имели форму, близкую к сферической, которую аппроксимировали окружностью с использованием специализированного программного обеспечения Altami Studio. Диаметр окружностей этих частиц был не одинаковым как для раствора нативного белка, так и для раствора, содержащего Dps насыщенный ионами железа, и достигал величины около 6 нм. Частицы, обнаруженные в образцах, насыщенных железом, были в среднем больше, чем в препаратах без насыщения (Рис. 27В и 27Е), но оставались гетерогенными по размерам (Рис. 27Е).

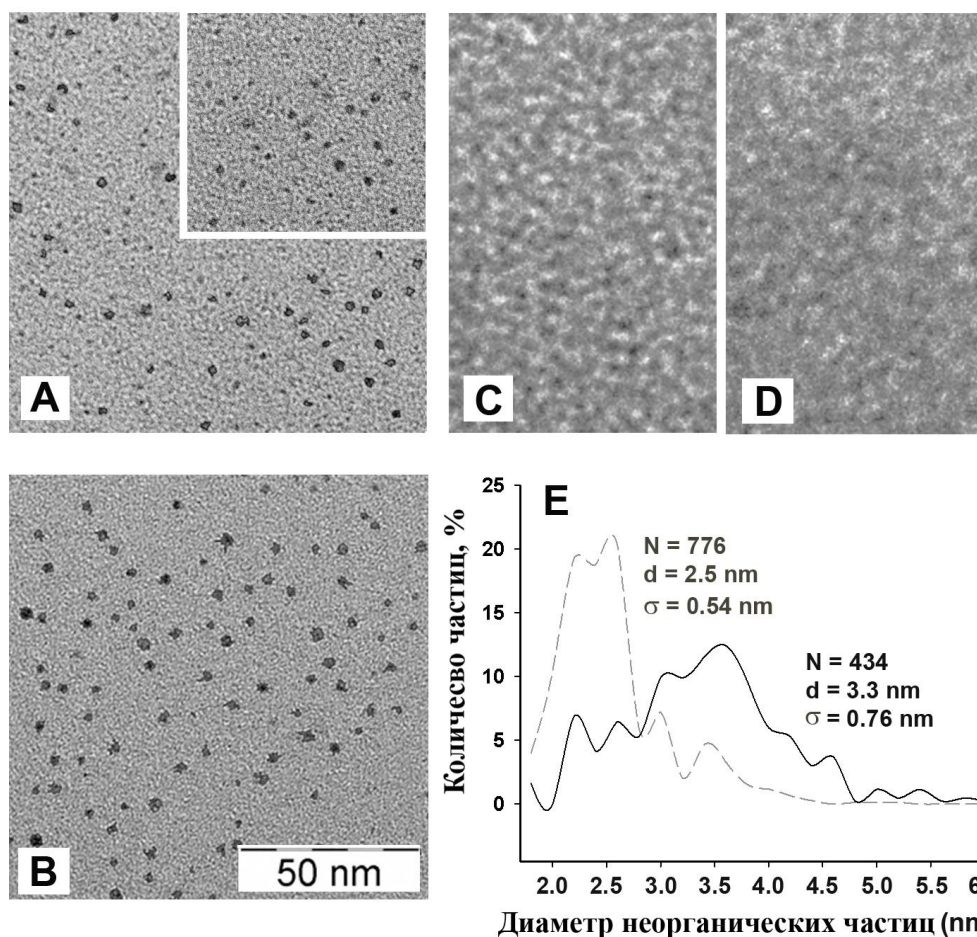


Рис. 27. Характеристика ферритового ядра Dps. ПЭМ-изображения, полученные для нативного белка Dps (A), Dps, насыщенного 1мМ соли Мора (B), его апо-формы (C), раствора, содержащего 1мМ $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ (D). (E) Оценка распределения частиц по размерам (пунктир – нативный Dps, сплошная – Dps, насыщенный железом. N - количество частиц, d-средний диаметр, σ – стандартное отклонение)

Такая вариабельность противоречит предположению о том, что ионы железа стабилизируют додекамер Dps за счет заполнения его внутренней полости. На предыдущем этапе были получены данные об электронном и атомном строении неорганического ядра Dps с использованием рентгено-спектральных методов (Рис. 24). При этом необходимо учитывать, что эти результаты были получены для высушенного образца Dps. Для более полного представления о зарядовом состоянии атомов железа в структуре Dps необходимо оценить характеристики в растворе с использованием объемно-чувствительных ядерно-физических методов, например, Мёссбауэровской спектроскопии.

3.6 Мёссбауэровская спектроскопия подтвердила присутствие Fe_3O_4 в неорганическом ядре Dps

Согласно большинству литературных данных ионы железа, окисленные в ферроксидазных центрах, хранятся во внутренней полости Dps в виде соединений Fe_2O_3 или $\text{FeO}(\text{OH})$, т.е. в виде трехвалентных ионов, тогда как ферроксидазные центры связывают ионы $\text{Fe}(\text{II})$ и превращают их в $\text{Fe}(\text{III})$ [27, 77, 300]. Поскольку эти центры только временно заняты ионами железа, было выдвинуто предположение о том, что отношение количества $\text{Fe}(\text{II})$ к $\text{Fe}(\text{III})$ внутри Dps будет достаточно низким. С другой стороны, количество ионов железа в клетках, продуцирующих большое количество молекул Dps, ограничено и не может быть достаточным для полного насыщения всех синтезированных молекул белка. Это приводит к увеличению доли $\text{Fe}(\text{II})$ в общем количестве ионов железа. В полученных образцах белка число ионов железа варьировало от 100 до 250 ионов на додекамер. Таким образом, если ионы $\text{Fe}(\text{II})$ расположены только в биметаллических ферроксидазных центрах, то их количество не должно превышать 10-20%. Тем не менее, с помощью XANES-спектроскопии было выявлено присутствие более 50% железа в составе Fe_3O_4 , которое является, по сути, смесью оксидов трех и двухвалентного железа (Рис. 25). Несмотря на то, что способность Dps минерализовать Fe^{2+} была ранее обнаружена в анаэробных условиях [215], такое превышение предполагаемого количества было неожиданным и в качестве гипотезы было выдвинуто предположение о том, что такой результат связан с возможной деградацией белковой оболочки во время подготовки образца и/или его сушки и длительного хранения. Метод Мёссбауэровской спектроскопии использован для независимой характеристики зарядового состояния ионов железа в составе Dps. Для регистрации спектров был использован раствор белка с концентрацией 2.0-2.5 мг/мл, чтобы в процессе насыщения 1 М солью Мора уменьшить отношение $\text{Fe}^{2+}/\text{Dps}$, и, тем самым увеличить вероятность их полного окисления в ферроксидазных центрах белка. Для удаления не

связанных с Dps ионов Fe^{2+} , раствор белка после инкубации с солью Мора дополнительно очищали с использованием гель-фильтрации на Сефадекс G-10. Для получения корректных результатов перед проведением эксперимента спектрометр MS1104Em был откалиброван с использованием эталона $\alpha\text{-Fe}$ (Рис. 28А). Спектр сухой соли Мора, полученный при комнатной температуре, свидетельствует о наличии характерного дублета, обладающего расщеплением первого возбужденного состояния с некоторым нарушением симметрии (Рис. 28G).

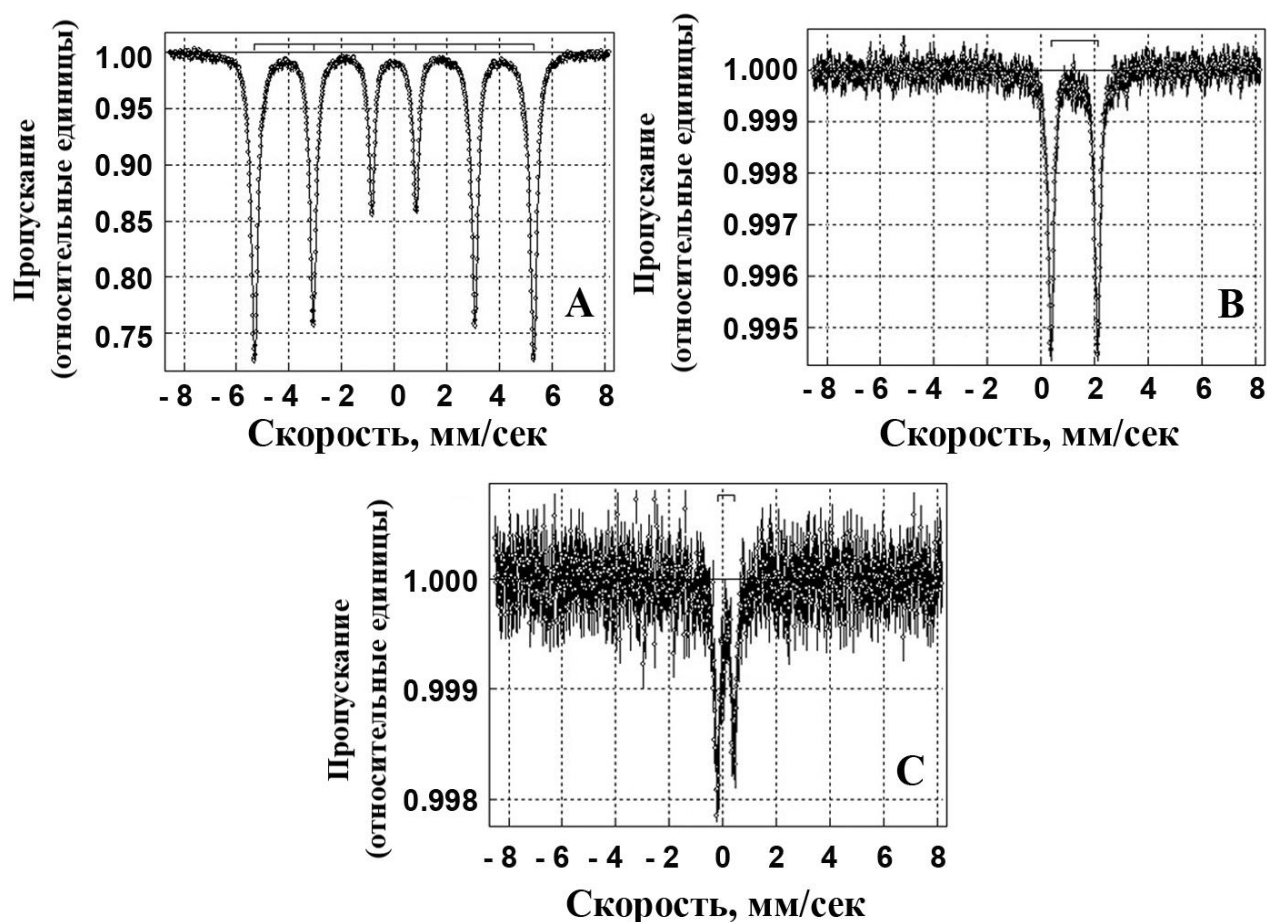


Рис. 28. Мёссбауэровские спектры, зарегистрированные для αFe (А), 1 мг сухой соли Мора (В) и для белка Dps, инкубированного в течение 30 минут в присутствии 1 мМ $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ (С)

Достоверный Мёссбауэровский спектр для раствора Dps был зарегистрирован только для образца, насыщенного ионами железа (Рис. 28С) и имеет явные отличия от спектра, зарегистрированного для $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ (Рис. 28В). Полученные данные были обработаны с использованием компьютерной

программы UNIVEM [26] и аппроксимированы двумя квадрупольными дублетами с изомерным сдвигом (δ) и квадрупольным расщеплением (ΔE_Q). Полученные значения δ и ΔE_Q характерны для сферических наночастиц магнетита (Fe_3O_4) диаметром 10 нм в парамагнитном состоянии [301]. Магнетит Fe_3O_4 содержит ионы Fe^{2+} и Fe^{3+} и представляет смесь FeO и Fe_2O_3 в переменных пропорциях. Мёссбауэровские спектры наночастиц Fe_3O_4 как для парамагнитных состояний (дублетов), так и для магнитного состояния (суперпозиция секстетов) имеют не лоренцевую форму линий. Поэтому наилучшая аппроксимация Мёссбауэровских спектров для белка Dps была достигнута путем распределения квадрупольного расщепления с использованием линий нелоренцевой формы для пары дублетов (Табл. 6)

Таблица 6. Значения параметров сверхтонкого спектра для соли Мора и белка Dps.

Образец	Аппроксимация	δ , мм/сек	ϵ , мм/сек	G, мм/сек	%
α -Fe	Секстет_1	0			
соль Мора	Дуплет_1	1.39			
Dps + соль Мора	Дуплет_1	$0.25 \pm 0,02$	0.60	0.22	37
	Дуплет_2	$0.27 \pm 0,02$	0.62	0.22	63

Величины, рассчитанные для квадрупольных дублетов насыщенного ионами железа Dps, соответствуют состоянию Fe^{3+} атомов железа в октаэдрическом окружении кислорода с двумя неэквивалентными положениями. При этом одно из этих положений атомов кислорода более деформировано [302]. Учитывая данные литературных источников [303] и значение полученного изомерного сдвига относительно заселенности $3d$ $4s$ орбиталей, электронная конфигурация атомов железа, связанная с внутренней полостью Dps, может быть определена как $3d^5$. Зарегистрированные спектральные параметры свидетельствуют о содержании 50-60% Fe_2O_3 от общего количества железа в исследуемых образцах. Таким образом, полученные в этом эксперименте результаты подтвердили присутствие

двухвалентного железа в структуре Dps. Поскольку 40-50% всего железа, накопленного Dps, с высокой долей вероятности можно отнести на долю Fe^{2+} , то можно сделать вывод о том, что, по крайней мере, половина от этого количества должно находиться в составе неорганического ядра, а не в составе ферроксидазных центров.

Относительно высокое сходство спектральных характеристик ассоциированных с Dps оксидов и наличие Fe_3O_4 наблюдалось также и в экспериментах с использованием XANES- спектроскопии (Рис. 25), хотя тонкая структура L_3 -края железа, зарегистрированная для образца Dps, отличалась от всех эталонных спектров, включая спектр, зарегистрированный для нанопорошка Fe_3O_4 . Наличие максимумов $2t_{2g}$ и $3e_g$ в спектрах XANES в тонкой структуре спектра указывает на присутствие трехвалентных ионов железа в неорганическом ядре Dps. Однако соотношение Fe_3O_4 и FeO , рассчитанное с помощью компьютерного моделирования XANES-спектров железа $L_{2,3}$ с использованием эталонных образцов, выявило, что на долю Fe_3O_4 приходится 64% общего железа, и 36% - на долю FeO . Более высокое содержание ионов Fe^{2+} , зарегистрированное в анализируемых образцах с помощью рентгено-спектральных методов, может быть обусловлено существенными различиями в процедуре подготовке проб или некоторыми особенностями этих двух методов. В любом случае, на основании полученных данных стало ясно, что состав неорганических ядер Dps имеет более сложную, неоднородную физическую и химическую природу, чем обычно предполагалось. В поддержании додекамерной структуры Dps могут быть задействованы не только оксиды трёхвалентного железа, но и ионы или оксиды двухвалентного железа.

3.7 Молекулярное моделирование структуры белка Dps в присутствии FeO и Fe_2O_3 выявило потенциальные области связывания только для Fe_2O_3

Для получения предварительной информации о том, каким образом FeO или Fe_2O_3 могут стабилизировать додекамерную форму Dps, был использован

метод последовательного молекулярного докинга структурных моделей этих оксидов на трехмерную структуру додекамера Dps. Основываясь на данных, полученных на предыдущем этапе, было выдвинуто предположение о том, что олигомер Dps должен содержать дополнительные сайты для взаимодействия с FeO в области контакта соседних мономеров. Однако распределение 50 последовательно закрепленных молекул двухвалентного оксида в трехмерной структуре Dps носило случайный характер (Рис. 29В, синие линии), за исключением 12 молекул этих оксидов, обнаруженных в области локализации ферроксидазных центров (Рис. 29В).

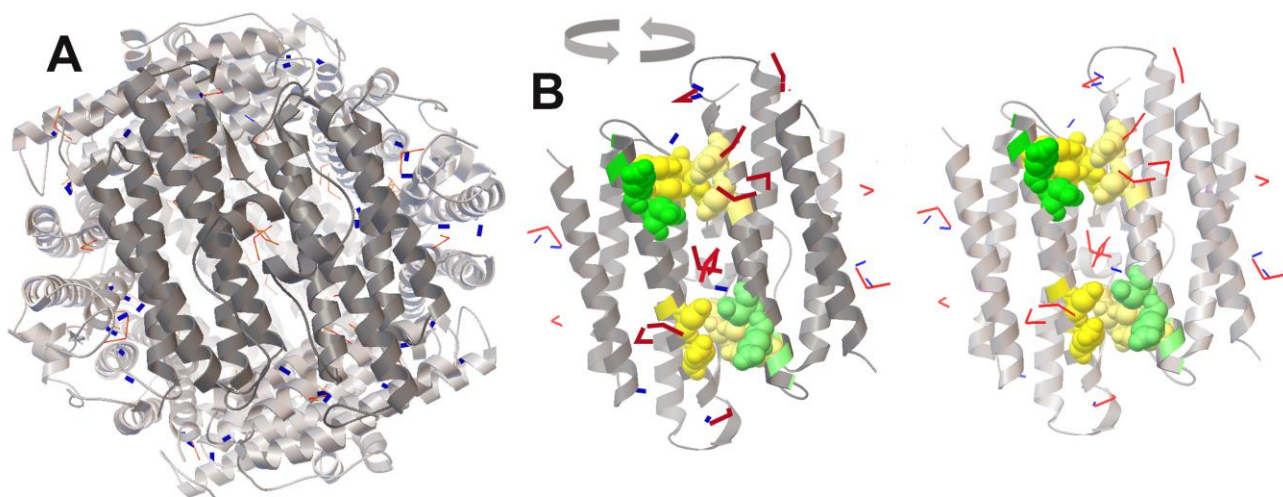


Рис. 29. Результат последовательного молекулярного докинга. Модель додекамера (А) и димера (В), FeO - синие прямоугольники, Fe₂O₃ - красные изогнутые линии. Желтым и зеленым цветами отмечены аминокислоты ферроксидазных центров и центров нуклеации, соответственно. Трехмерную структуру белка Dps визуализировали с использованием программы RasMol 2.7.5 [304]. (Результаты получены совместно с Ю.А. Пуртовым)

Участки связывания Fe₂O₃ (Рис. 29В, красные линии) были распределены более упорядоченно и предполагают возможность их закрепления преимущественно в области, расположенной между двумя каталитическими центрами (Рис. 29В, желтые сферы). Эти области связывания окружены аминокислотными остатками серина (Ser44) и лейцина (Leu45) одного мономера, а также остатками аргинина (Arg70) и изолейцина (Ile74) другого мономера, расположенных в области центра нуклеации (обозначенным зеленым

цветом), но не перекрываются с ними. Таким образом, можно предположить, что высокая концентрация ионов железа способствует увеличению площади минерализации на внутренней поверхности Dps.

3.8 Изучение эффективности образования нуклеопротеидных комплексов с участием белка Dps в зависимости от физико-химических свойств ДНК

Белок Dps выполняет ряд функций в бактериальной клетке, одной из которых является регуляция экспрессии генов [27, 36, 152, 184]. Это предполагает возможность его взаимодействия с промоторными участками регулируемых генов, в частности, с регуляторной областью собственного гена [27]. Длина всей регуляторной области составляет 420 п.н., которая помимо основного промотора P_{dps} содержит 4 промотора для инициации транскрипции в прямом направлении (P_1 , P^*_1 , P_2 , P_3) и 3 для синтеза антисмысловых продуктов (Рис. 30). Считается, что не обладающий классическими ДНК-связывающими модулями Dps не способен распознавать какие-либо мотивы нуклеотидной последовательности в геноме, что, однако, не исключает его специфичности к каким-то структурным особенностям двойной спирали ДНК. В таком случае регуляторная область собственного гена является наиболее вероятной мишенью связывания, так как большинство факторов транскрипции и белков нуклеоида имеют сайты взаимодействия в промоторах своих генов. Поэтому для проверки предположения о том, что наиболее предпочтительной мишенью для взаимодействия Dps с ДНК может быть не нуклеотидная последовательность, а какая-либо физико-химическая или структурная особенность двойной спирали было использовано три фрагмента ДНК, содержащих частично или полностью регуляторную область гена *dps*, и, соответственно, разные наборы промоторов (Рис. 30).

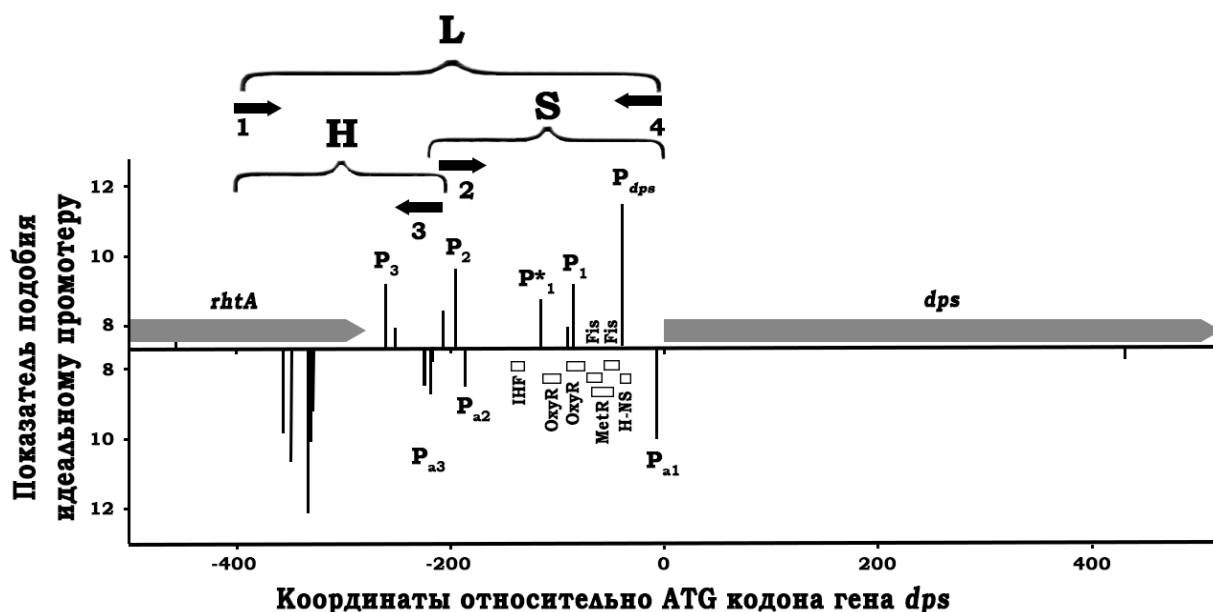


Рис. 30. Структурно-функциональная организация регуляторной области гена *dps*. Столбиками указаны координаты точек инициации транскрипции: P_{dps} – основной промотор; P^*_1 , P_1 , P_2 , P_3 – предсказанные промоторы для транскрипции в прямом направлении; P_{a1} , P_{a2} , P_{a3} – в антисмысловом направлении. Цифрами со стрелками обозначены использованные в работе праймеры: 1–4 – соответствуют фрагменту *L* (420 п.н.), 1–3 – фрагменту *H* (214 п.н.), 2–4 – фрагменту *S* (256 п.н.) [172]

Анализ нуклеотидной последовательности этих фрагментов свидетельствует о том, что все ДНК обладают высоким содержанием А/Т – пар, что предполагает высокую термодинамическую подвижность молекулы. В результате моделирования с использованием компьютерной программы DNA Tool [185] (Рис. 31) пространственной структуры этих фрагментов ДНК, выявлено, что только фрагмент *L* способен формировать выраженные анизотропные изгибы двойной спирали (Рис. 31С).

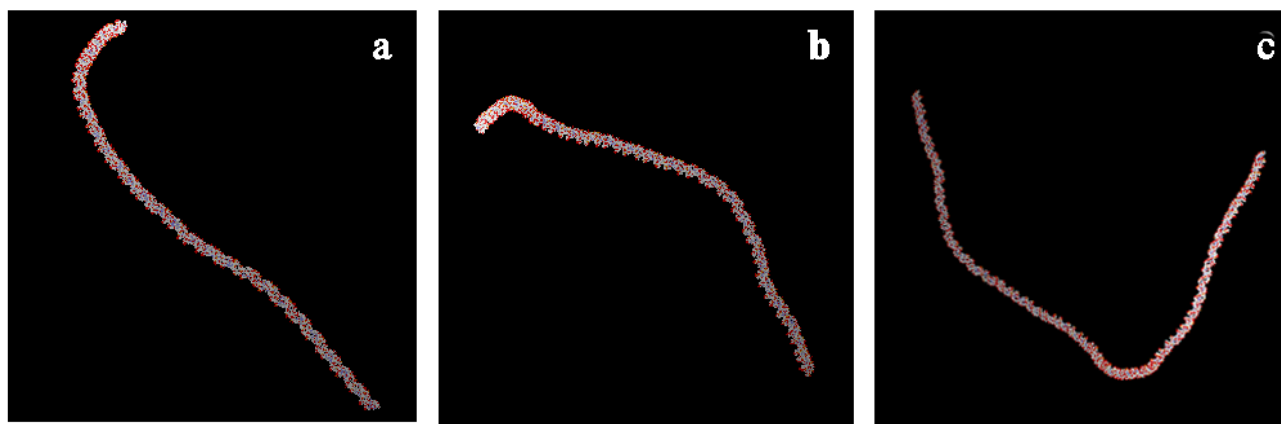


Рис. 31. Модели фрагментов ДНК, построенные с использованием программы DNA Tool: (a) – фрагмент *H* (214 п.н.); (b) – фрагмент *S* (259 п.н.); (c) – фрагмент *L* (420 п.н.)

Фрагменты ДНК *S* и *H*, наоборот, можно использовать в качестве моделей относительно прямолинейных молекул. На следующем этапе была проведена оценка морфологических особенностей этих фрагментов, полученных в ходе ПЦР, методом атомно-силовой микроскопии (Рис. 32).

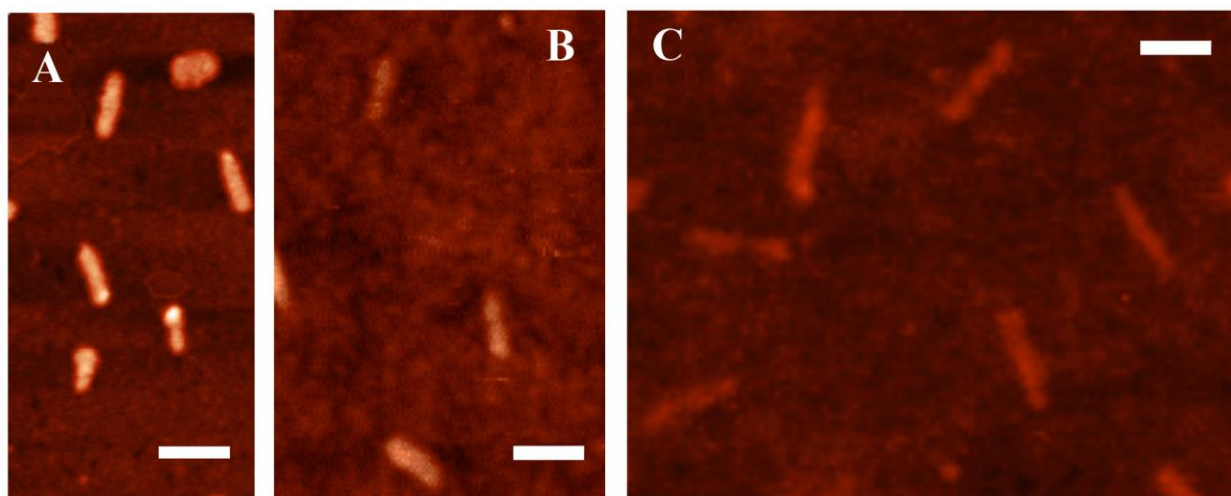


Рис. 32. АСМ-изображения фрагментов ДНК, полученных в полуконтактном режиме: (A) – фрагмент *H* (214 п.о.); (B) – фрагмент *S* (259 п.о.); (C) – фрагмент *L* (420 п.о.). Белая черта на рисунках соответствует 100 нм

Расчетные параметры фрагментов ДНК имеют следующие величины: высота и ширина ДНК – 2 нм, длина фрагментов определяется количеством нуклеотидов, умноженных на длину одного нуклеотида и составляет для фрагмента *H* – 75,3 нм; для фрагмента *S* – 91,16; для фрагмента *L* – 147,84 нм.

На Рис. 32 приведены полученные АСМ изображения фрагментов ДНК. Их высота в точности соответствует расчётной. Наблюдаемая ширина на порядок выше ожидаемой (20 нм). Это обусловлено особенностями метода атомно-силовой микроскопии, точность измерения линейных параметров в котором максимальна в вертикальном направлении, а в плоскости зависит от радиуса кривизны наконечника кантеливера, величина которого составляла 10 нм. С учётом этого, длины фрагментов также соответствуют расчётным величинам, а изогнутость фрагмента *L* прослеживается на нескольких изображениях (Рис. 32С).

Известно, что делеция гена *dps* приводит к изменению белкового профиля в голодающих клетках *E.coli* [11], а также к изменению профиля транскрипции в *S.enteritidis* [28] 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 [11, 19, 30, 49, 67]. Поэтому для проверки этого предположения нами было проведено тестирование эффективности взаимодействия Dps с несколькими фрагментами ДНК, включающими явно изогнутый фрагмент *L*, обогащённый А/Т-парами фрагмент, взятый из «*промоторного островка*» гена *yeaI*, фрагмент, *hns-1* взятый из промоторной области гена *hns* и фрагмент *hns-2* из этой же области, но частично перекрывающийся с кодирующей частью гена (Рис. 33). Фрагмент *yeaI* имел длину 310 п.н., содержал 42 предсказанные PlatProm точки инициации транскрипции, хотя в составе генома был транскрипционно неактивным. Фрагмент *L* имел длину 420 пар оснований и содержал экспериментально картированный промотор этого гена [12, 19], а также все дополнительные промоторы, предсказанные компьютерным алгоритмом PlatProm, для транскрипции в прямом и обратном направлении [165]. Фрагмент *hns-1* содержал экспериментально идентифицированный промотор гена *hns* [45], картированный ранее промотор для антисмысловой

транскрипции [7], а также 2 дополнительных промотор-подобных сайта, предсказанных алгоритмом PlatProm. Он включал промоторную и часть кодирующей последовательности гена. Фрагмент *hns-2* длиной 466 п.н., наоборот, включал конец кодирующей последовательности *hns*, перекрываясь с фрагментом *hns-1* на 334 п.н., и межгенное пространство за стоп-кодоном, прилегающее к концу конвергентно транскрибируемого соседнего гена, хотя тоже содержал один антисмысловой промотор.

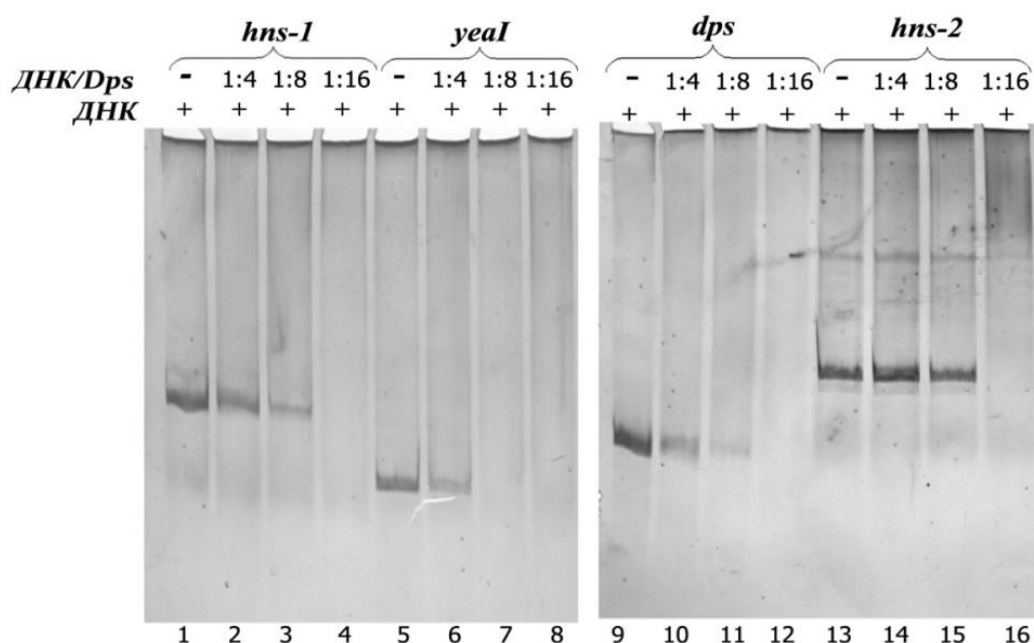


Рис. 33. Оценка эффективности взаимодействия белка Dps с различными фрагментами ДНК *E. coli*. На дорожки 1, 5, 9 и 13 нанесены только модельные фрагменты ДНК в количестве 0.14, 0.29, 0.28 и 0.19 мкг соответственно. На дорожки 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 14, 15 и 16 – их комплексы с белком Dps. Над гелем указаны молярные соотношения ДНК: белок. Гель окрашивали бромистым этидием и нитратом серебра.

Для оценки способности Dps формировать нуклеопротеидные комплексы с выбранными фрагментами ДНК был использован метод задержки ДНК-белковых комплексов в геле (Рис. 33). 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 относительно большим размером олигомера Dps, состоящим из 12 одинаковых субъединиц, и

возможностью образования еще более крупных, олигомерных структур в присутствии ДНК, которые практически не входят в гель [12, 19, 20, 60, 152, 159, 172]. Поэтому об эффективности взаимодействия Dps с ДНК судили по убыли фракции свободных фрагментов ДНК.

Было установлено, что все использованные фрагменты обладают способностью взаимодействовать с Dps. Однако наблюдаемая в ходе экспериментов эффективность этого взаимодействия была разной, что само по себе свидетельствует о некоторой специфичности взаимодействия. Два А/Т-богатых фрагмента ДНК, содержащих «промоторный островок» *yeaI* и регуляторную область *dps*, имели более высокое сродство к Dps, чем 2 других фрагмента ДНК, содержащих 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. Поэтому выявленное предпочтение в отношении фрагментов, содержащих промоторные области генов, свидетельствует о способности Dps распознавать их физико-химические особенности.

Для более детального понимания способности Dps взаимодействовать с регуляторной областью собственного гена, фрагмент *L* разделяли на две части. Первый фрагмент (*S*), длиной 259 пар оснований, содержит основной промотор гена – P_{dps} [12, 101] и расположен ближе к кодирующей части гена *dps* (Рис. 30). Второй, длиной 214 пар оснований, содержит дистальный промотор-подобный сайт P_3 , который продемонстрировал низкую транскрипционную активность, но был важен для максимальной экспрессии *dps* [219] (Рис. 34).

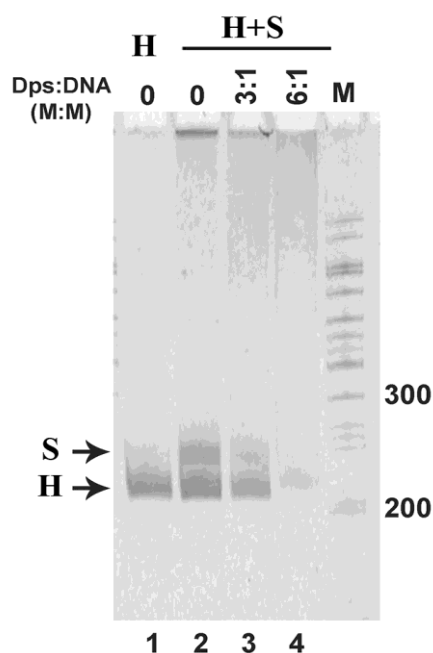


Рис. 34. Оценка эффективности взаимодействия Dps с различными участками регуляторной области собственного гена в условиях конкуренции за белок методом EMSA. Все фрагменты ДНК наносились на гель в количестве 1 пмоль. Перечень образцов, их молярные соотношения указаны сверху рисунка. М – маркеры длины ДНК

Оценку сродства Dps к фрагментам ДНК *S* и *H* исследовали аналогичным методом, что и на предыдущем этапе, который продемонстрировал высокую информативность для подобного рода задач. Однако, в отличие от предыдущего эксперимента, было проведено тестирование не индивидуально к каждому фрагменту ДНК, а в условиях конкуренции фрагментов ДНК за белок. Для этого фрагменты *H* и *S* были смешаны в эквимольных концентрациях (1 пмоль/мкл), после чего с этой смесью были приготовлены комплексы аналогично тому, как это было сделано на этапе тестирования сродства Dps к различным фрагментам ДНК (Рис. 34).

В результате было выявлено, что в условиях конкуренции фрагмент, содержащий функциональный промотор, имеет большее сродство к Dps, чем дистальная часть регуляторной области (Рис. 34). Таким образом, физико-химические особенности именно этой области являются наиболее важными для взаимодействия с Dps, и подтверждают предположение о том, что в

бактериальной хромосоме присутствуют участки ДНК, обладающие повышенным сродством к этому белку.

По существующим представлениям, в структуре белка Dps отсутствуют классические ДНК-связывающие модули, однако отличия в эффективности его взаимодействия с различными по физико-химическим свойствам фрагментами ДНК могут свидетельствовать о наличии определенных 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).

У фрагментов *S* и *H* при использовании 10-кратного и 5-кратного молярного избытка Dps было обнаружено несколько гиперактивных сайтов, свидетельствующих об опосредованных белком конформационных изменениях в ДНК. Кроме этого, было обнаружено несколько защищённых белком фосфодиэфирных связей. На фрагменте *H* они находятся в позициях 175 и 113-119 от меченного праймера, а на фрагментах *S* и *L* в позициях 95-124 от другого праймера. Их расположение воспроизводилось в экспериментах при формировании комплексов как с коротким фрагментом *S* (*dps*₄ – P³²- *dps*₃), так и длинным фрагментом *L* (*dps*₂– P³²- *dps*₃), что подтверждает предположение о наличии специфических сайтов Dps в этих областях. Эти участки оказались особенно А/Т-богатыми, что послужило основанием для выдвижения предположения о том, что обладая повышенным сродством к промоторным участкам, Dps преимущественно связывается в них с А/Т-богатыми треками. Поэтому на следующем этапе было проведено тестирование эффективности функционального взаимодействия Dps с так называемыми «промоторными островками», имеющими аномально высокую плотность промотор-подобных мест и на 20% больше А/Т-пар, чем в случайном фрагменте геномной ДНК.

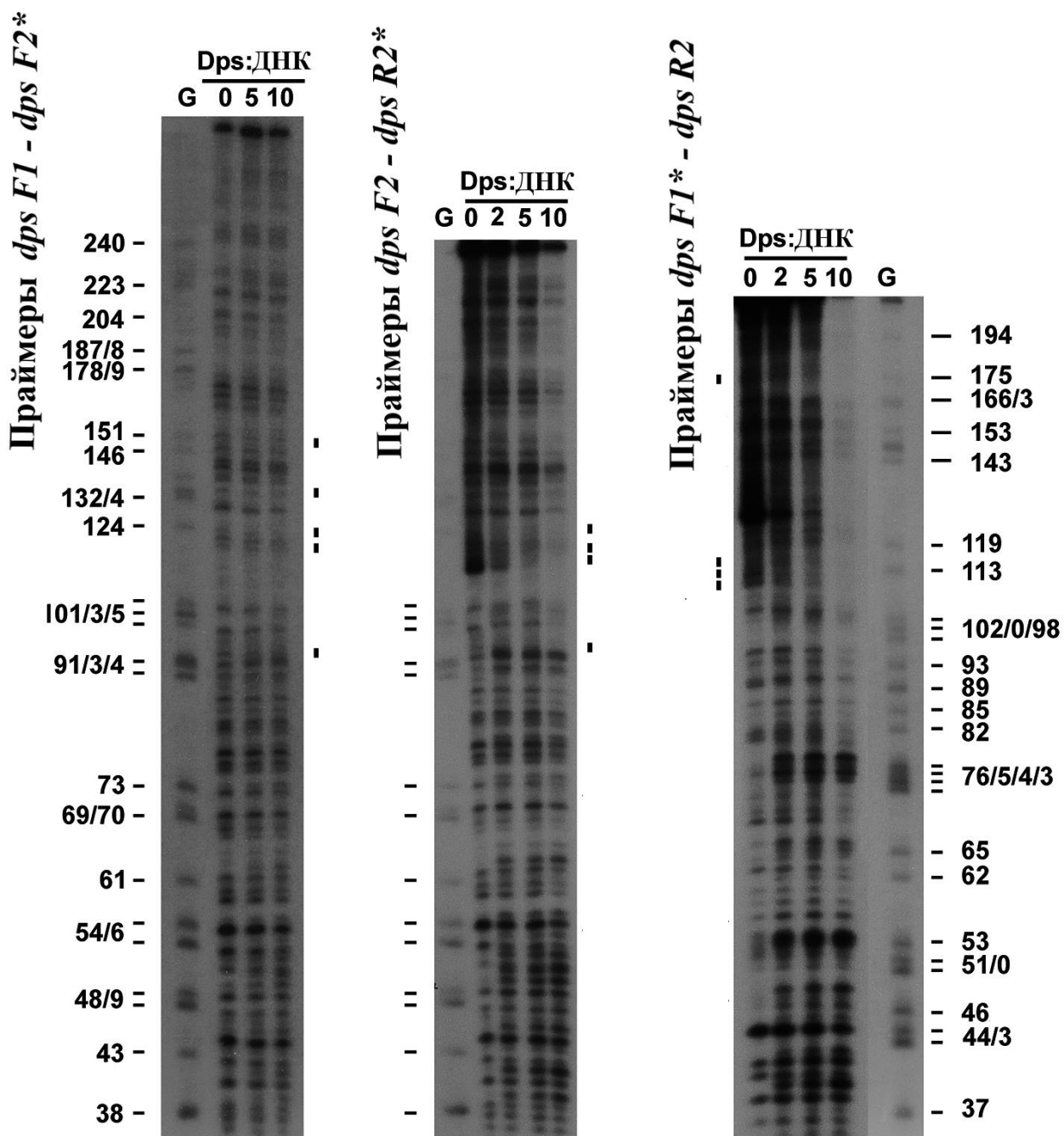


Рис. 35. Футпринтинг комплексов, формируемых Dps с фрагментами ДНК *L*, *S* и *H* ДНКазой I. Защищённые Dps фосфодиэфирные связи отмечены вертикальными прямоугольниками. Дорожки G - секвенирование по гуанинам в реакции Максама-Гилберта. Гели прокалиброваны относительно радиоактивно-меченных праймеров.

3.9 Исследование эффективности взаимодействия белка Dps с фрагментами ДНК «промоторных островков»

«Промоторные островки» в геноме *E.coli* исходно были обнаружены *in silico* с помощью компьютерной программы PlatProm [165]. Обладая множеством промоторов и способностью эффективно взаимодействовать с РНК-полимеразой, эти участки оказались мало способными к синтезу полноразмерных мРНК, хотя демонстрировали высокую склонность к синтезу коротких олигонуклеотидов [165, 305], которые могут иметь биологическое значение или являться простым следствием блокировки полимераза-промоторных комплексов на стадии абортивной реакции. Биологическая роль «островков» до сих пор остаётся мало понятной, хотя установлено, что большинство из них ассоциированы с генами, приобретенными бактериями в результате горизонтального переноса и подавление активности их промоторов, может быть результатом действия защитных механизмов эволюции. Тем не менее, молекулярные механизмы, лежащие в основе такой эволюции, и регуляторные процессы поддержания богатых промоторами областей генома в транскрипционно-неактивном состоянии, остаются невыясненными. Белок Dps, имеющий сродство к промоторным участкам исследованных генов и к А/Т-богатым модулям в них, вполне можно было рассматривать в качестве потенциального кандидата на роль специфического супрессора.

Базируясь на ранее установленных фактах показано, что фрагменты «промоторных островков», отличаются от фрагментов ДНК, содержащих обычные промоторы, по нескольким структурным параметрам [305]. В частности, участки ДНК, содержащие «промоторные островки», обладают более высоким уровнем суперсперализации их 3D-моделей, чем одиночные промоторы и контрольные непромоторные последовательности [305]. Анализ результатов, полученных с помощью метода иммунопреципитации хроматина (ChIP-on-chip) [289, 224, 245], показал, что один из мажорных белков бактериального нуклеоида – гистон-подобный белок H-NS, во время

экспоненциального роста занимает до 90% их поверхности [165]. Это соответствует его участию в специфической супрессии генов, приобретенных в результате горизонтального переноса [225, 306, 307]. Однако количество молекул H-NS при переходе на стационарную фазу снижается примерно до 40%, и функцию супрессии, по-видимому, берет на себя белок Dps, являющийся мажорным белком нуклеоида в условиях лимита источников питания. Его количество в таких условиях составляет около 180 000 молекул на одну клетку [19]. Для проверки этого предположения были получены четыре фрагмента ДНК, содержащие «*промоторные островки*», зависимость транскрипционной активности которых от белков H-NS и Dps были изучены с использованием ПЦР в реальном времени (qRT-PCR) (Рис. 37 и Рис. 38) и мутантных клеток, у которых делетированы гены *hns* и *dps*.

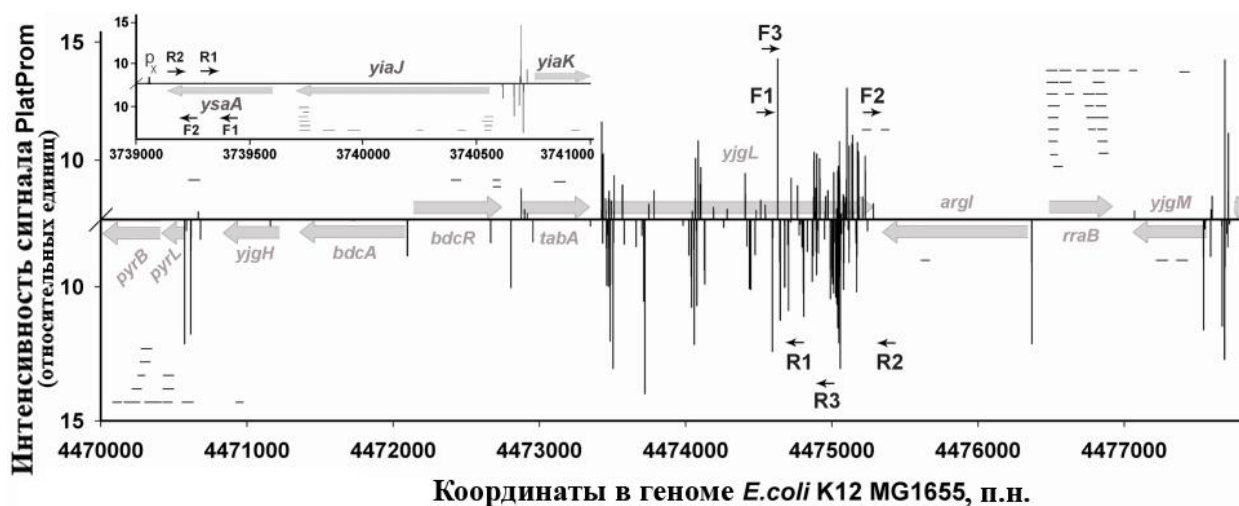


Рис. 36. Распределение стартовых точек транскрипции (столбцы), предсказанных с использованием программы PlatProm на верхней и нижней нитях ДНК в области локализации «*промоторного островка*» *yjgL* (основная панель) и в области референсной нуклеотидной последовательности гена *ysaA* (вставка). Серые стрелки показывают кодирующие области генов и направления их транскрипции. Черные стрелки показывают позиции праймеров, использованных для qRT-PCR. Короткие горизонтальные линии соответствуют прочтениям, зарегистрированным с помощью RNA-seq [317]

РНК, транскрибируемые с нуклеотидной последовательности гена *ysaA* были использованы в качестве эталонных продуктов (вставка на Рис. 36). Для оценки интенсивности транскрипции в прямом направлении гена *ysaA* были

использованы праймеры *ysaA* F1- *ysaA* R1 и *ysaA* F2- *ysaA* R2 (Табл. 3). Полученные значения пороговых циклов (Ct) мало отличались для этих двух пар праймеров (значения 16,1 и 15,7 соответственно) и не выявили зависимости от присутствия H-NS при использовании делеционного мутанта. Помимо ожидаемой *ysaA*-мРНК, с использованием обратных пар праймеров был обнаружен довольно высокий уровень транскрипции антисмыслового РНК-продукта, который может быть транскрибирован с промотора P_x, (Рис. 36, вставка). Количество этих транскриптов также не проявляло зависимости от H-NS (среднее значение Ct для образцов дикого типа и мутантов, лишенных *hns*, составляло 20.2 и 20.4 соответственно). Так как величины Ct для антисмыслового продукта были ближе к значениям порогового цикла «промоторных островков» (Ct = 22.2), именно он был использован для нормализации полученных результатов (пара праймеров *ysaA* F1- *ysaA* R1, Рис. 36).

Для всех выбранных «промоторных островков» были зарегистрированы специфические продукты транскрипции. Практически все образцы продемонстрировали увеличение количества кДНК, полученных из клеток делеционного мутанта по *hns*. Однако низкий уровень транскрипции в штамме дикого типа вызывал довольно высокий уровень вариабельности результатов. РНК, синтезируемые с «промоторного островка» ассоциированного с геном *ujgL*, были наиболее неустойчивыми. Несмотря на то, что ожидаемые транскрипты получены из конца этого гена (Рис. 36), было зарегистрировано увеличение их количества в 2-84 раза в мутантных клетках, что снижает достоверность полученной величины среднего значения. Аналогичная низкая стабильность продуктов транскрипции в антисмысловом направлении наблюдалась и для внутригенных антисмысловых транскриптов, тогда как для *ujgL*-мРНК в мутантных клетках было зарегистрировано их статистически значимое увеличение (Рис. 37В).

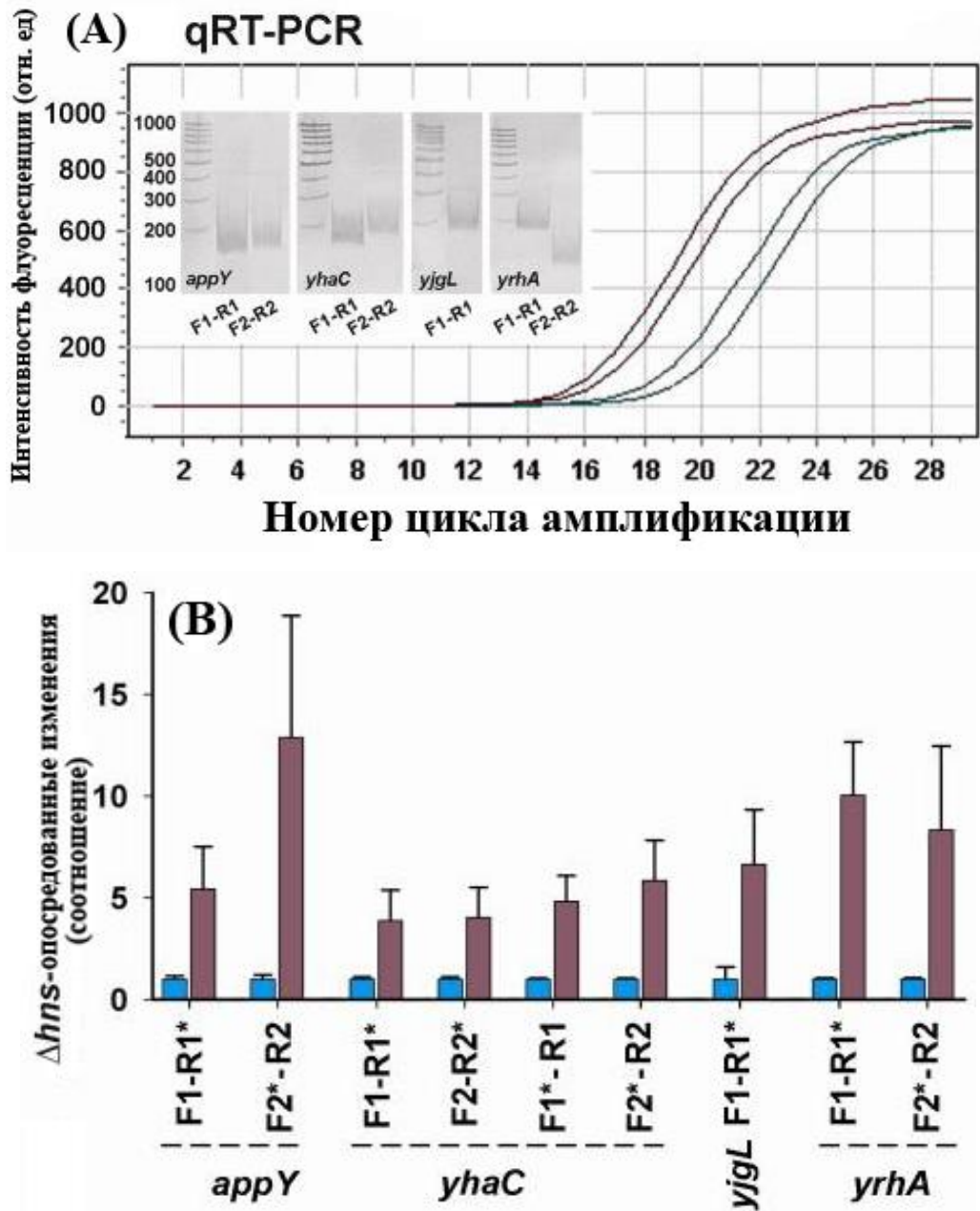


Рис. 37. Влияние Н-NS на эффективность транскрипции «промоторных островков». Панель (А) - Рис. 27. Характеристика ферритового ядра Dps. ПЭМ-изображения, полученные для нативного белка Dps (А), Dps, насыщенного 1мМ соли Мора (В), его аро-формы (С), раствора, содержащего 1мМ $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ (D). (E) Оценка распределения частиц по размерам (пунктир – нативный Dps, сплошная – Dps, насыщенный железом. N - количество частиц, d-средний диаметр, σ – стандартное отклонение) результат qRT-PCR. Вставка демонстрирует специфичность ПЦР. Панель (В) - относительное количество обнаруженных РНК в образцах, полученных из клеток дикого типа (голубые столбики) и мутантов (фиолетовые столбики) со статистически значимыми изменениями ($p < 0.05$). Праймеры, использованные для обратной транскрипции, обозначены звездочкой (*).

В случае «*промоторного островка*», ассоциированного с геном *appY*, также было выявлено устойчивое увеличение продуктов в отсутствие *hns*, синтезированных в прямом направлении от внутреннего промотора (праймеры *appY* F1- *appY* R1*, где * указывает праймер, использованный для обратной транскрипции), а также для антисмысловой РНК, транскрибируемой из кодирующей области этого гена (*appY* F2* - *appY* R2). Для «*промоторных островков*», ассоциированных с генами *yhaC* и *yrhA*, было выявлено увеличение количества всех тестируемых продуктов в мутантных клетках, хотя два образца из гена *yrhA* (праймеры: *yrhA* F1* - *yrhA* R1 и *yrhA* F2- *yrhA* R2*), показали сильное отличие в соотношении значений Ct (1.1- 21.1 и 7.0-39.4, соответственно).

Таким образом, полученные данные однозначно свидетельствуют о том, что H-NS не только связывается с «*промоторными островками*», но и ингибирует транскрипцию с их промоторов. Однако при переходе к стационарному росту, т.е. при недостатке источников питания, число молекул этого белка в клетках уменьшается, а потребность в супрессии чужих генов, наоборот, увеличивается. Поэтому функцию гетерохроматизации «*промоторных островков*» должен, по-видимому, взять на себя Dps, заменяющий H-NS и все другие белки нуклеоида на бактериальной хромосоме. Поэтому, на следующем этапе аналогичный экспрессионный анализ был выполнен для исходного штамма *E.coli* и его делеционного мутанта по гену *dps* (Рис. 38).

Предварительно было установлено, что Dps взаимодействует со всеми модельными фрагментами (Рис. 38А), причём в этих экспериментах впервые были обнаружены ДНК-белковые комплексы, не наблюдавшиеся ранее (Рис. 34). Более того, кроме крупных нуклеопротеидных комплексов с низкой электрофоретической подвижностью для трёх из четырёх фрагментов были зарегистрированы комплексы меньших размеров, которые могут соответствовать димерам Dps в составе нуклеопротеида (Рис. 38А). Такой результат согласуется с представлениями о том, что ДНК-связывающей

активностью обладает не только додекамерная форма Dps, но и более мелкие олигомеры [299].

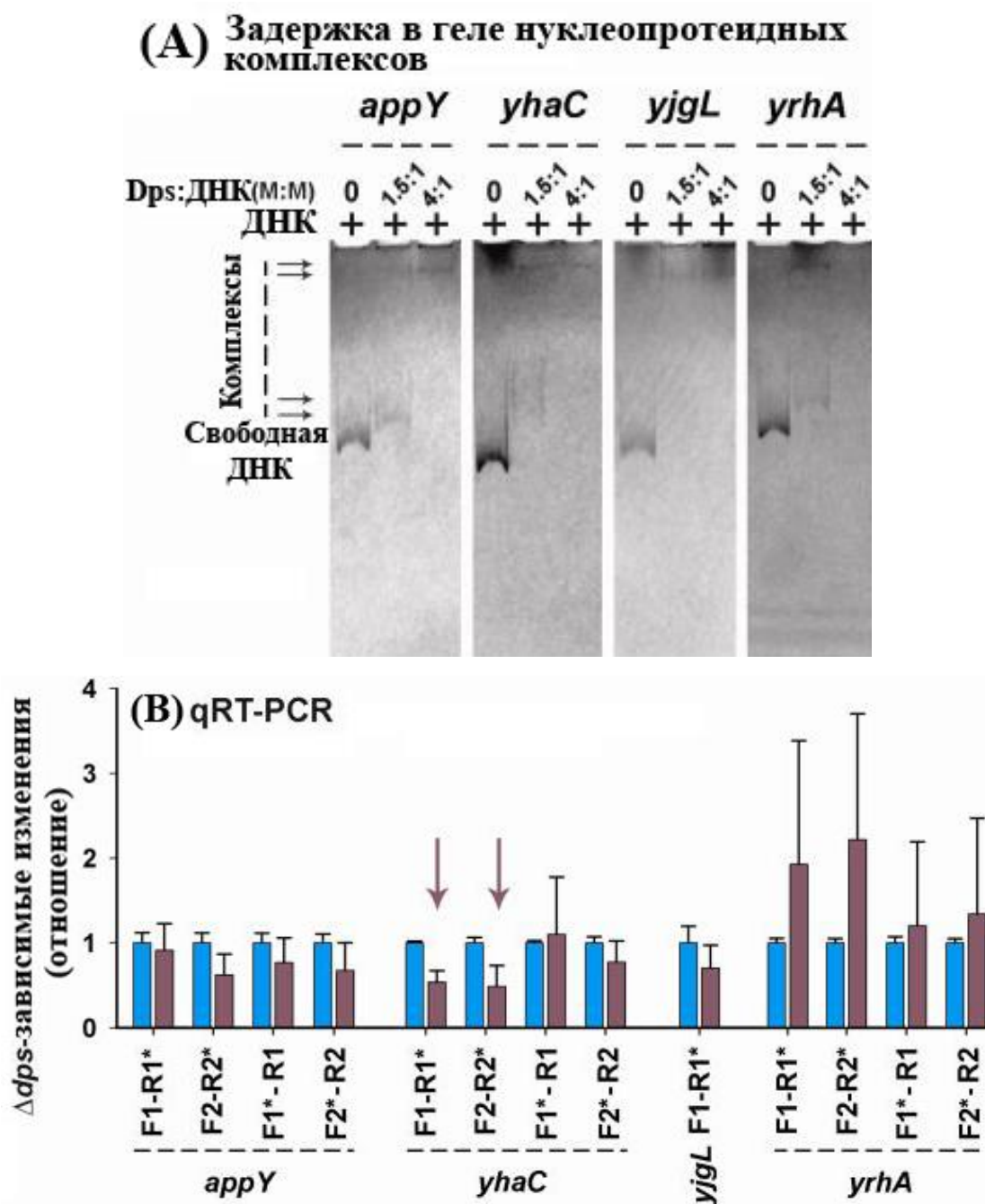


Рис. 38. Оценка эффективности взаимодействия Dps с фрагментами ДНК, содержащими «промоторные островки». (А) – электрофоретическое фракционирование нуклеопротеидных комплексов, сформированных Dps и «промоторными островками», ассоциированными с генами *appY*, *yhaC*, *yjgL* и *yrhA*; (B) - количество обнаруженных РНК в образцах, полученных из клеток дикого типа и Δdps мутантах. Стрелки показывают образцы со статистически значимыми изменениями транскрипции.

Результаты экспрессионного анализа показаны на Рис. 38В. Ожидаемое увеличение продуктивности «*промоторных островков*» в делеционном мутанте было обнаружено только для РНК, транскрибируемых в прямом направлении гена *yrhA* и было статистически незначимым (рис. 38В). Три повторности для *yjgL*-ассоциированного «*промоторного островка*» дали противоречивые результаты и не были нанесены на гистограмму. Оставшаяся часть образцов, полученных с использованием мутантных клеток, продемонстрировала тенденцию к снижению эффективности транскрипции, которая для гена *yhaC* статистически значима.

Таким образом, Dps не может быть классифицирован как белок, целенаправленно ингибирующий активность «*промоторных островков*». Возможно, это является следствием того, что РНК для этого эксперимента, так же как в предыдущем случае, получали из экспоненциально растущих клеток. Следовательно, тотальный ингибиторный эффект мог бы быть зарегистрирован для клеток стационарной фазы роста, но в этих условиях молекулы Dps закрывают практически весь геном [17, 18, 19] и оценка специфичности изменений по отношению к «*промоторным островкам*» не могла быть достоверной. С другой стороны, сопоставимое количество в клетках молекул H-NS (~20000) и Dps (6-10000) во время экспоненциального роста позволяет сравнивать их влияние на экспрессию модельных генов. В любом случае, было установлено, что два архитектурных фактора бактериального генома, H-NS и Dps, оказывают различное влияние на активность «*промоторных островков*», которые, как оказалось, могут быть не только предметом целенаправленной гетерохроматизации (Рис. 37), но и специфической регуляции (Рис. 38В).

В результате проведенных исследований стало ясно, что, кроме белка H-NS, оказывающего ингибиторное воздействие и способного закрыть до 90% общей длины всех «*промоторных островков*» [305], такие области генома могут предоставлять собой платформу для взаимодействия с другими белками. Продуктами транскрипции «*промоторных островков*» являются преимущественно короткие олигонуклеотиды, которые могут быть

востребованы клеткой, либо быть побочными продуктами заблокированной транскрипции. Не исключено, что, предоставляя платформу для белков, в том числе Dps, которые преимущественно связываются с А/Т-богатыми последовательностями, «*промоторные островки*» реагируют на их удаление просто потому, что освобождаемые сайты занимают другие факторы транскрипции, способные оказывать специфическое воздействие. Если, согласно литературным данным [305] основной биологической функцией «*промоторных островков*» является интеграция чужеродных генов в регуляторные системы нового хозяина, то формирование в их структуре сайтов связывания Н-NS (для супрессии чужих генов), промоторов (для экспрессии полезных генов) и сайтов связывания факторов транскрипции (для регуляции экспрессии полезных генов) представляется вполне оправданным.

Примечательно, что все три процесса не исключают друг друга и могли эволюционировать совместно при накоплении А/Т-пар в области остановки транскрипционного комплекса на чужеродном генетическом материале. Согласно ранее выдвинутой гипотезе [305], это накопление может быть результатом дезаминирования метилированных цитозинов с превращением их в тимины, или окислением гуанинов с превращением их в 8-оксогуанины и последующим распознаванием репликативным аппаратом как тиминов. Мутационное накопление А/Т-пар должно сопровождаться формированием сайтов связывания для Н-NS (tcGATWaAtw). Это должно стабилизировать транскрипционные комплексы в состоянии abortивного синтеза олигонуклеотидов и усиливать мутационный процесс в локально расплетённых участках ДНК, способствуя формированию дополнительных промотор-подобных мест и сайтов связывания регуляторных белков. Согласно полученным данным, одним из участников этого процесса может быть белок Dps, который имеет повышенное сродство к А/Т-богатым последовательностям, хотя механизм его взаимодействия с ними, с учётом отсутствия ДНК-связывающих модулей, остаётся не понятным. Поэтому на следующем этапе были подробно изучены комплексы, формируемые Dps с

разными по структуре фрагментами ДНК, методом АСМ и проведена оценка термодинамических характеристик сформированных нуклеопротеидов.

3.10 Особенности взаимодействия Dps с короткими линейными фрагментами ДНК

Исследование нуклеопротеидных комплексов с участием Dps имеет ряд особенностей. В частности, образование комплексов с ДНК вызывает формирование агрегированных молекул, что значительно затрудняет интерпретацию получаемых изображений. Промывка поверхности образца позволяет удалить агрегаты, но и большую часть бинарных комплексов. Тем не менее, отдельные комплексы Dps с фрагментами ДНК S или H, использованными ранее для оценки сродства Dps к ДНК в условиях конкуренции (Рис. 34), были зарегистрированы (Рис. 39). В обоих случаях наблюдалось взаимодействие белковых частиц с концевыми участками молекул ДНК, и не было зарегистрировано формирования упорядоченных двумерных структур, выявленных ранее с помощью электронной микроскопии [11, 59, 61, 70, 192, 209]. Это согласуется с другими литературными данными [30, 32, 33]. Не наблюдалось также формирования гексамерных колец вокруг ДНК [11] или нуклеосом-подобного оборачивания ДНК вокруг сферических частиц Dps [209], что предполагается существующими моделями взаимодействия Dps с ДНК. Даже если принять во внимание, что подобные комплексы могли быть удалены в процессе промывания, ясно, что Dps может формировать бинарные комплексы с линейными фрагментами, выбирая для связывания локально денатурированные концевые участки двухцепочечной ДНК (Рис. 39).

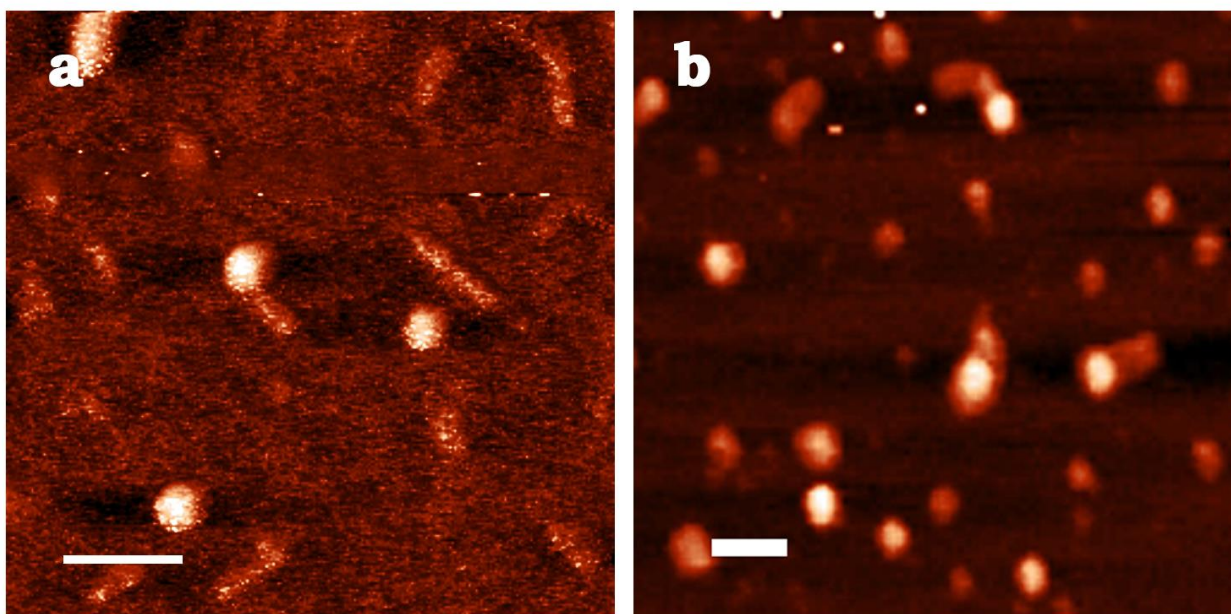


Рис. 39. АСМ-изображения комплексов Dps с ДНК: а – нуклеопротеидные комплексы, сформированные Dps с фрагментами S (259 п.о.); б – нуклеопротеидные комплексы, сформированные Dps с фрагментами H (214 п.о.); белая черта на рисунках соответствует 100нм

В кольцевой ДНК бактерий таких сайтов для связывания Dps нет, хотя они есть во многих молекулах РНК, которые формируют вторичные структуры. Поэтому полученные данные указывают на возможность взаимодействия Dps не только с ДНК, но и с РНК, хотя данные, полученные с использованием флуоресцентной микроскопии [17], свидетельствуют о том, что практически весь Dps в бактериальных клетках находится на геноме. Это может означать, что в процессе взаимодействия с ДНК, Dps может связываться и с молекулами РНК, синтезируемыми в области этого контакта. Не исключено также, что в клетке присутствуют некоторые компоненты, которые модулируют его связывание с нуклеиновыми кислотами. Учитывая, что наибольшее количество Dps зарегистрировано в условиях недостатка питательных веществ, логично предположить, что такими модуляторами являются сахара. Поэтому на следующем этапе была проведена оценка их влияния на олигомерную форму Dps и эффективность его взаимодействия с линейными фрагментами ДНК.

3.11 Влияние гексуронатов на олигомерную форму Dps и его способность взаимодействовать с линейными фрагментами ДНК

В качестве модельного лиганда были выбраны D-глюкоза, которая является субстратом гликолиза, и D-глюкуронат, являющийся интермедиатом энергетически более выгодного метаболического пути Эшвелла. В качестве тестового метода, способного выявить изменения в характере формирования ДНК-белковых контактов, был выбран использованный ранее (Рис. 34 и Рис. 38) метод задержки ДНК-белковых комплексов в геле. В качестве модельных мишеней для взаимодействия с Dps был использован фрагмент *S*, продемонстрировавший более высокое сродство к Dps в условиях конкуренции (Рис. 34). Второй фрагмент был взят из регуляторной области гена *fliA*, кодирующего σ^{28} (σ^F)-субъединицу РНК-полимеразы, под контролем которой находятся гены, отвечающие за клеточную подвижность (Рис. 40).

На Рис. 40 приведены результаты электрофоретического фракционирования проб, содержащих модельные фрагменты ДНК, белок Dps и сформированные ими нуклеопротеидные комплексы. Уменьшение интенсивности полосы, соответствующей свободной ДНК, свидетельствует, что Dps взаимодействует с фрагментом *S*, хотя образующиеся комплексы не входят в гель (Рис. 40, панель а, дорожки 2-4). Добавление 5мМ D-глюкозы никак не повлияло на комплексообразование (дорожки 5-7), однако введение аналогичного количества D-глюкуроната не только привело к снижению доли свободной ДНК, что свидетельствует об увеличенной эффективности связывания, но и впервые для фрагмента *S* позволило зарегистрировать слабую полосу по подвижности соответствующей бинарному комплексу Dps с линейным фрагментом ДНК. Фракция, обладающая аналогичными характеристиками, была зарегистрирована и для другого модельного фрагмента *fliA* в присутствии глюкуроната, но не глюкозы. D-глюкуронат, следовательно, специфическим образом влияет на формирование нуклеопротеидных комплексов с участием Dps.

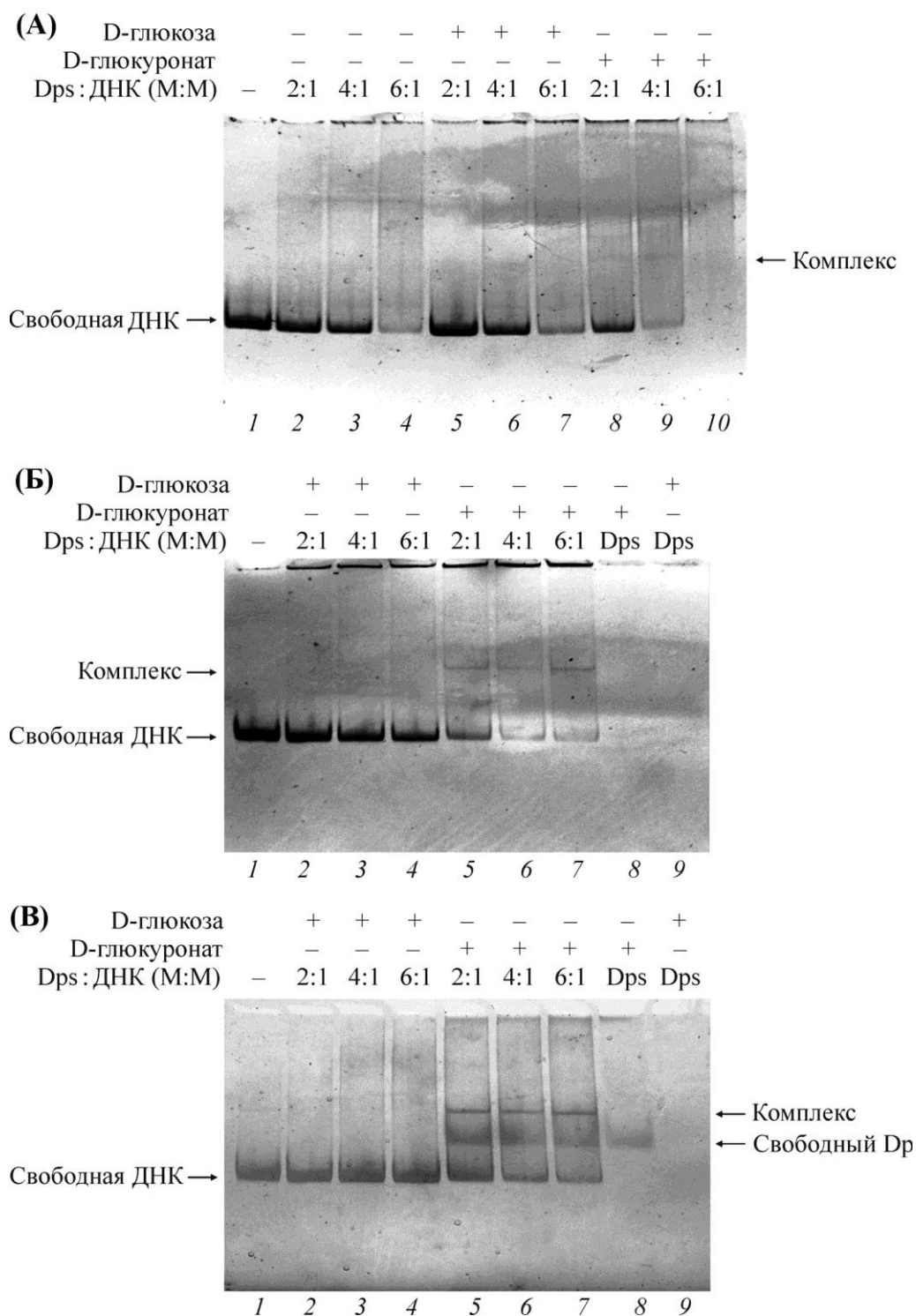


Рис. 40. Результат электрофоретического фракционирования фрагментов ДНК регуляторных областей генов *dps* (А) и *fliA* (Б, В) и их комплексов в зависимости от присутствия углеводов. Состав проб и молярное соотношение Dps к ДНК указано над дорожками. Гели на панелях (А) и (Б) были окрашены бромистым этидием; на панели (В) – нитратом серебра. (Данные получены совместно с Т.А. Бессоновой).

Окраска геля нитратом серебра, способная обнаружить место миграции не только ДНК, но и белка (Рис. 40, панель В), выявила еще одну особенность

D-глюкуроната. Оказалось, что он влияет на электрофоретическую подвижность самого белка, который в присутствии глюкозы совсем не проникает в поры геля, а в присутствии глюкуроната мигрирует с одинаковой скоростью, независимо от того, есть в пробе ДНК или нет. Скорее всего это свидетельствует о влиянии D-глюкуроната на олигомерную форму Dps либо путем предотвращения формирования додекамера в процессе его равновесной ассоциации/диссоциации, либо посредством его участия в разрушении додекамера.

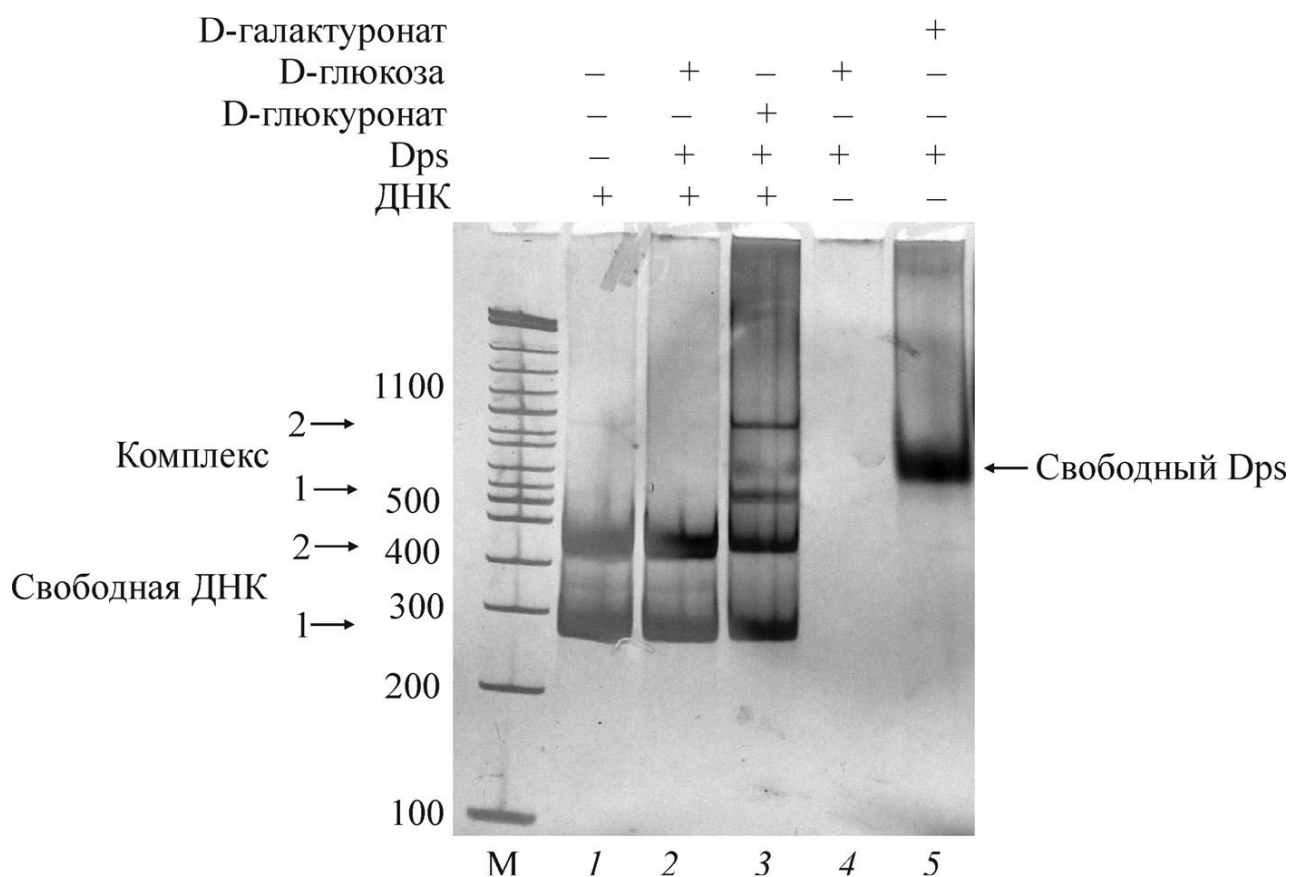


Рис. 41. Зависимость олигомерной формы Dps и эффективности его взаимодействия с модельными фрагментами ДНК от наличия углеводов. Показаны результаты электрофоретического фракционирования макромолекул и их комплексов. Состав проб указан над дорожками. Фрагмент 1 взят из регуляторной области гена *dps*, фрагмент 2 – из промоторной области гена *fliA*. Молярное соотношение Dps к ДНК во всех случаях составляло 4:1. Окраска - нитратом серебра. (Данные получены совместно с Т.А. Бессоновой).

Для того чтобы убедиться в том, что дополнительная полоса, обнаруженная на дорожках 5–7 (Рис. 40Б), действительно соответствует ДНК-белковым комплексам, а не каким-то особым олигомерам белка, способным

прокрашиваться бромистым этидием, был поставлен аналогичный эксперимент, но в качестве мишеней для конкурентного связывания Dps использовались оба фрагмента ДНК (Рис. 41). Как и в предыдущем эксперименте, присутствие глюкозы не влияло на олигомерную форму белка и не приводило к появлению дополнительных полос на геле (Рис. 41, дорожки 2 и 4). В присутствии глюкуроната, напротив, были зарегистрированы две полосы с подвижностью, соответствующей ожидаемым комплексам. Следовательно, можно обосновано сделать вывод о том, что глюкуронат является функционально-активным лигандом для Dps, способным влиять на эффективность его взаимодействия с ДНК.

Принципиально разное влияние глюкозы и глюкуроната на олигомерную форму Dps было наименее ожидаемым результатом данной работы. Поэтому влияние на структурное состояние Dps было проверено еще для одного интермедиата пути Эшвелла – D-галактуроната, который является изомером глюкуроната. Его присутствие в растворе привело к аналогичным изменениям в белке (Рис. 41, дорожка 5). Это означает, что гексуронаты, используемые бактериальной клеткой в качестве альтернативных источников питания, параллельно с этим могут изменять структурное состояние Dps и характер его взаимодействия с ДНК.

В соответствии с этим возникает вопрос о том, может ли наблюдаемая форма белка, которая по подвижности приблизительно соответствует димеру или тримеру Dps, распадаться до мономеров при более высокой концентрации лигандов? Рабочая концентрация лигандов исходно была снижена с 100–200 мМ, традиционно используемых для такого типа экспериментов [328, 329, 330], до 5 мМ с тем, чтобы приблизить их молярное соотношение с белком до величин, сопоставимых с последующими модельными экспериментами, результаты которых изложены в следующем разделе. Зависимость олигомерной формы Dps от концентрации D-глюкуроната в диапазоне от 1 до 40 мМ была исследована в специальной серии экспериментов, но присутствие данного

углевода в концентрации больше чем 10мМ не приводило к дальнейшим изменениям олигомерной формы Dps (Рис. 42).

D-глюкуронат, мМ	0	1	2.5	5	10	20	30	40
Dps	+	+	+	+	+	+	+	+

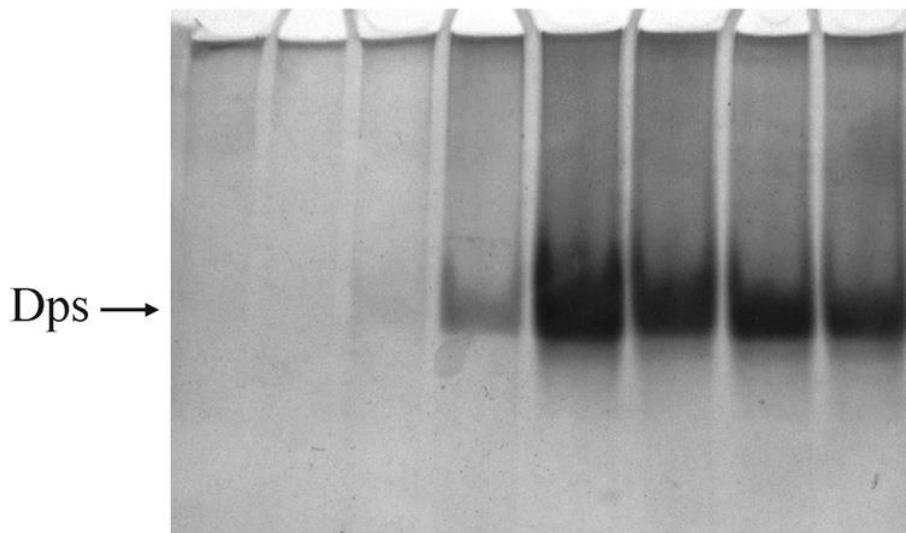


Рис. 42. Зависимость олигомерной формы белка Dps от концентрации D-глюкуроната. Показаны результаты фракционирования белка в 5% полиакриламидном геле без добавления денатурирующих агентов. Молярная концентрация D-глюкуроната в пробах указана над дорожками. Гель окрашен нитратом серебра

Таким образом, концентрацию сахаров в диапазоне 5–10 мМ можно считать оптимальной для изучения закономерностей комплексообразования Dps с линейными фрагментами ДНК. Следует отметить, что именно такие концентрации были эффективными и при исследовании влияния другого источника питания – аминокислот – на способность транскрипционного фактора DcsR взаимодействовать с регуляторной областью оперона *yhaOM*, отвечающего за детоксификацию L-цистеина [319].

Чтобы понять, каким образом гексуронаты могут влиять на способность Dps к олигомеризации, на следующем этапе был использован метод последовательного молекулярного докинга моделей, использованных нами углеводов, на трёхмерную модель додекамера Dps. Его результаты свидетельствуют о различиях как в расположении наиболее предпочтительных мест связывания гексуронатов по сравнению с глюкозой (Рис. 43), так и в

динамике изменения свободной энергии в каждом последующем раунде докинга (Рис. 44). Тем не менее, для всех трёх углеводов наиболее предпочтительным местом связывания первых моделей оказалась поверхность одной из четырёх одинаковых пор, открывающихся в полость олигомера и сформированных на месте стыка трёх субъединиц Dps (отмечены стрелками на Рис. 44В). В дальнейшем наиболее предпочтительными местами связывания новых молекул лиганда становились участки, преимущественно расположенные внутри белковой полости. Для α -D-глюкозы эта закономерность сохранялась на протяжении всего модельного эксперимента, т.е. последовательного докинга 120 моделей лигандов. Для D-галактуроната и D-глюкуроната наряду с заполнением внутренней полости белка наблюдалось встраивание моделей в межсубъединичное пространство белковой структуры (отмечено звездочками на Рис. 44Б и Рис. 44В). Это отличие от α -D-глюкозы особенно наглядно в случае D-глюкуроната, молекулы которого при добавлении 42–84-го лиганда (наиболее активно в ходе 57–75 раундов докинга) последовательно формировали протяжённый кластер на внутренней поверхности межсубъединичного контакта. Подобный эффект на тех же стадиях добавления лигандов наблюдался и для D-галактуроната, хотя и в меньшей степени, а в случае α -D-глюкозы отсутствовал.

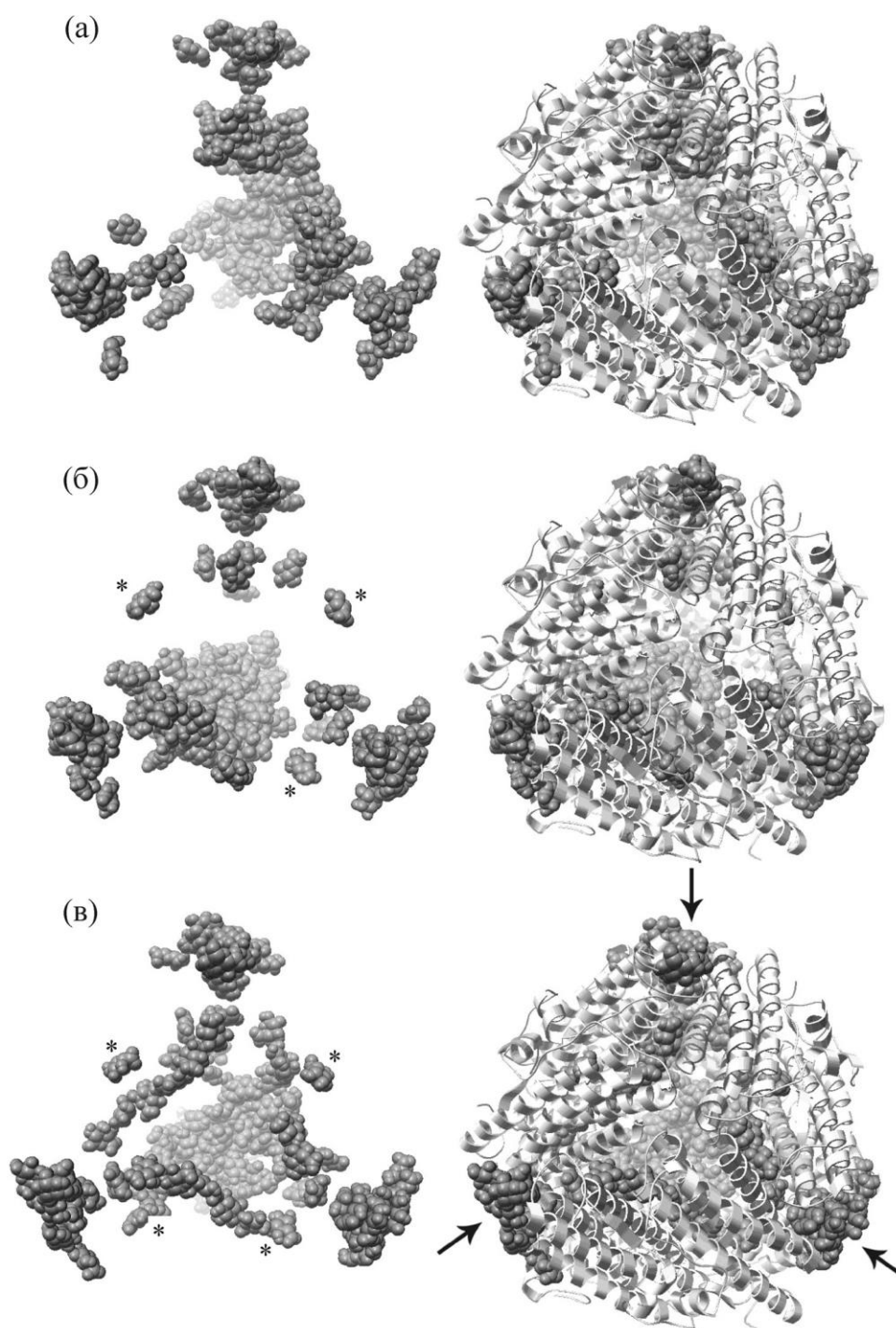


Рис. 43 Результаты молекулярного докинга α -D-глюкозы (а), D-галактуроната (б), D-глюкуроната (в) с додекамером Dps. Справа приведены белок-углеводные комплексы на последних стадиях докинга. Отдельные модули в трёхмерной структуре Dps показаны ленточными моделями, а атомы лигандов – объемными сферами. Комплексы представлены с одного визуального ракурса белка. Стрелками показаны три из четырёх порообразующих вершин, четвертая вершина находится на заднем плане. Слева углеводная часть комплексов показана отдельно. Лиганды, попавшие на стык двух субъединиц, на переднем плане отмечены звездочками. На панели (в) хорошо видны треки углеводных кластеров, формирующиеся на противоположной им внутренней поверхности додекамера. (Результаты получены совместно с Ю.А. Пуртовым)

Следует отметить, что по мере заполнения наиболее предпочтительных сайтов связывания размещение от 70-ой до 90-ой модели углевода сопровождалось постепенным повышением рассчитанных значений ΔG (Рис. 44). Однако на поздних раундах последовательного докинга предпочтительной областью связывания новых лигандов становилась поверхность, сформированная ранее присоединёнными моделями углеводов, а не поверхность белка. При этом энергия потенциального связывания (ΔG) снижалась (Рис. 44). Этот эффект наблюдался для всех трёх лигандов, хотя и в разной степени. Позднее и наименее явно это выражено для моделей α -D-глюкозы, раньше всего для D-галактуроната, но наиболее явным является уменьшение ΔG в случае D-глюкуроната.

В случае D-галактуроната и D-глюкуроната формировался слой из моделей молекул углеводов вдоль одной из внутренних стенок додекамера, который становился всё более предпочтительной мишенью для связывания последующих молекул. Показательно, что в случае D-галактуроната «затравкой» для формирования этого слоя становились молекулы лигандов, расположенные в области межсубъединичного контакта. Напротив, в случае α -D-глюкозы связывание происходило на большем пространстве полости белка и аффинность потенциального связывания изменялась при этом меньше.

Так как экспериментально была обнаружена дестабилизация олигомера Dps только в присутствии D-галактуроната и D-глюкуроната можно предположить, что связывание этих углеводов в области межсубъединичных контактов Dps дестабилизирует сеть межсубъединичных водородных связей, удерживающих додекамер, и провоцирует его распад на более мелкие олигомерные формы. Дополнительным фактором дестабилизации может оказаться образование кластеров из молекул D-глюкуроната и D-галактуроната на внутренней поверхности белка, примыкающей к потенциальным межсубъединичным местам контакта. Отсутствие таких кластеров и межсубъединичных контактов в случае α -D-глюкозы и меньшая аффинность

связывания могут объяснить сохранность олигомерного комплекса в присутствии α -D-глюкозы.

Таким образом, экспериментально обнаружено взаимодействие D-глюкуроната и D-галактуроната с Dps и доказано влияние именно этих углеводов на олигомерную форму белка. Возможные причины разного влияния углеводов на структуру Dps исследованы методом молекулярного докинга, в результате которого обнаружено встраивание D-глюкуроната и D-галактуроната в область межсубъединичных контактов Dps. Это вполне объясняет экспериментально обнаруженную разницу. Впервые методом задержки в геле было установлено, что присутствие D-глюкуроната стимулирует образование бинарных комплексов Dps с линейными фрагментами ДНК. Следовательно, углеводы могут играть роль кофакторов Dps, модулирующих его ДНК-связывающую активность, в том числе при конденсации и деконденсации генома.



Рис. 44. Динамика изменения энергии связывания лигандов при последовательном молекулярном докинге модели α -D-глюкозы (светлые кружки), D-галактуроната (темные кружки) и D-глюкуроната (треугольники) с 3D-моделью додекамера Dps. Используются значения энергии взаимодействия, рассчитанные для моделей молекул углеводов, взаимодействующих с белком (первый раунд докинга) или белок-углеводным комплексом (раунды докинга 2–120) с наибольшей аффинностью. (Результаты получены совместно с Ю.А. Пуртовым)

Использованный в данной серии экспериментов фрагмент *S* обладает большим сродством к белку Dps (Рис. 34), чем второй фрагмент регуляторной области гена *dps*, *H*. В связи с этим возникает вопрос о физико-химических особенностях *S*, являющихся причиной этих отличий. Нуклеотидные последовательности этих фрагментов ДНК перекрываются на 53 п.н. в А/Т-богатой области, но фрагмент *S* содержит больше А/Т пар (65% и 58%, соответственно). На основании этого можно было предположить, что повышенное сродство белка к фрагменту *S* может быть обусловлено его меньшей термодинамической стабильностью как таковой, либо наличием у него более легкоплавких концов. Поэтому, на следующем этапе, с использованием модифицированной технологии «ДНК-оригами» [155], были спроектированы и собраны модельные разветвлённые самособирающиеся Y-подобные молекулы ДНК различной структуры и нуклеотидного состава, имеющие разную конфигурацию на концах двойной спирали.

3.12 Самособирающиеся Y-подобные разветвлённые структуры ДНК как наиболее оптимальная мишень для взаимодействия с Dps

Исходно было собрано две разветвлённые структуры для изучения сродства Dps к А/Т-богатым участкам ДНК. Одна из них состояла из двух синтетических олигонуклеотидов Y1 (57 п.о.) и Y3 (64 п.о.) (Табл. 5). Она имела комплементарный участок длиной 32 п.о. со однородным G/C-остовом и две гибкие одноцепочечные ветви, одна из которых состояла из 25 аденозинов, а вторая из 32 цитидинов (Рис. 45А). 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. 5) и состояла из трёх комплементарных ветвей: двух ветвей длиной 32 п.н. и одной 25 п.н. в длину. Две более длинные ветви этой молекулы состояли только из остатков

гуанина и цитозина. А укороченная ветвь состояла только из А/Т пар, и имела длину 10.88нм, что сопоставимо с экспериментально выявленными значениями размеров молекулы Dps (Рис. 20 и Рис. 21), поэтому могла быть идеальной мишенью для «концевого» взаимодействия с Dps.

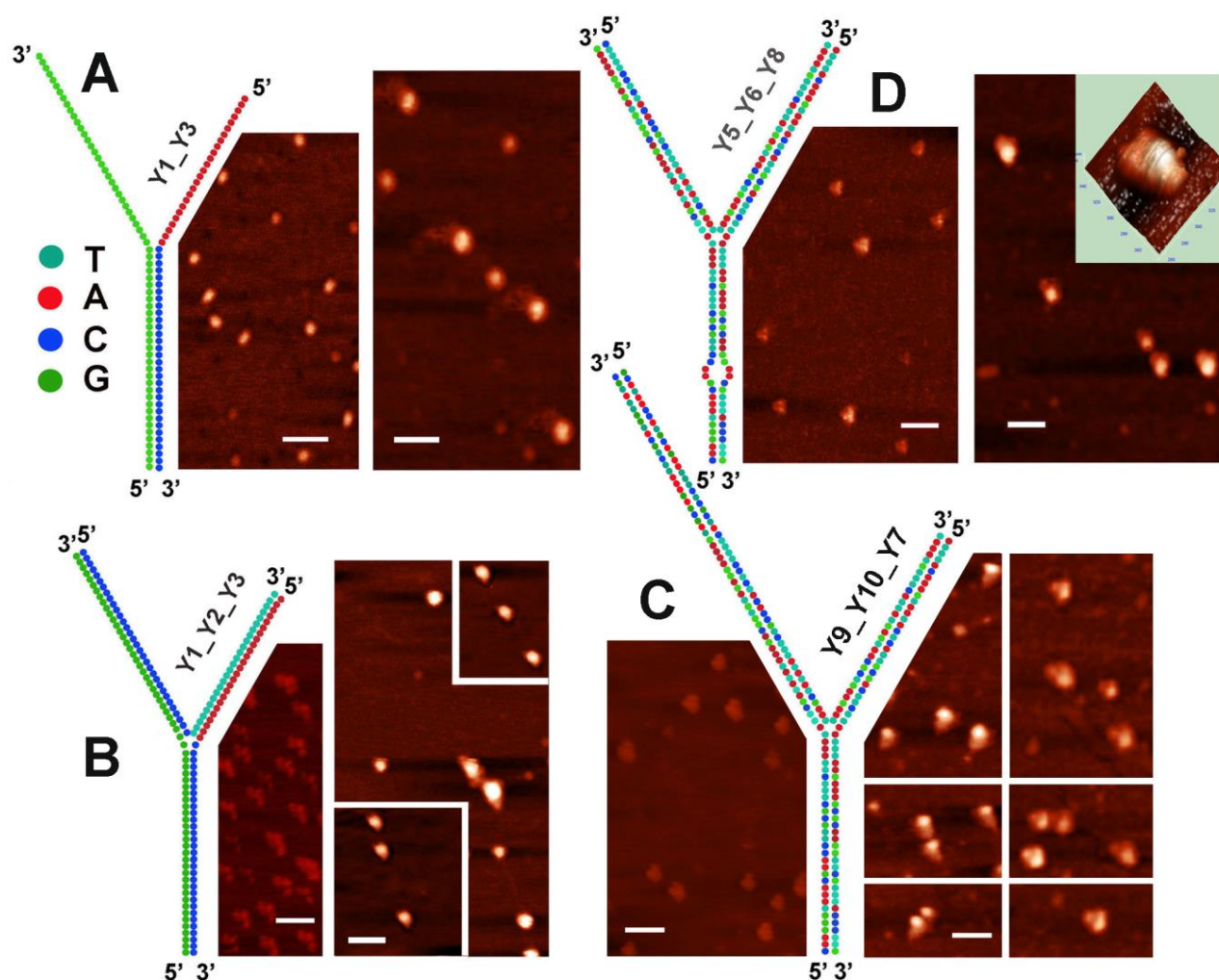


Рис. 45. Комплексы, образованные Dps с четырьмя искусственными разветвленными ДНК-структурами. Их конструкции схематично показаны слева от каждого из АСМ-изображений. В центре каждой панели – АСМ-изображение свободных молекул ДНК. С правой стороны – АСМ-изображения нуклеопротеидных комплексов с Dps каждой 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 на панели D иллюстрирует 3D-изображение одного из комплексов. Белая черта на рисунках соответствует 100 нм

На левой панели (Рис. 45А) представлено схематичное изображение Y-подобной ДНК, содержащей две одноцепочечных ветви и одну

комплементарную. На центральной панели (Рис. 45А) приведены результаты визуализации свободных молекул ДНК, собранных из олигонуклеотидов Y1 и Y3 с помощью АСМ. Все они имеют зерноподобную форму, что может быть связано со способностью гуанинов к квази-комплементарному взаимодействию с аденинами и гуанинами. Видимый продольный размер этих частиц составляет около 25 нм, что меньше ожидаемого для длинной грани полностью развёрнутого дуплекса ($32 \cdot 0.34 + 32 \cdot 0.59 = 29.8$ нм, где длина одной пары оснований – 0.34 нм, длина одного нуклеотида – 0.59, количество нуклеотидов и их пар в структуре фрагмента – 32). Такая гетерогенность полученных структур может быть обусловлена взаимодействием 3'-концевых цитозинов олигонуклеотида Y1 не только с 5'-концевыми гуанинами из Y3, но и с гуанинами соседних цепей, образуя смесь дуплексов различной структуры. Тем не менее, все эти структуры должны содержать, по крайней мере, небольшие участки двухцепочечной ДНК. Помимо частиц зерноподобной формы длиной около 25 нм, были зарегистрированы более мелкие частицы длиной 13–20 нм, что соответствует размерам одиночных олигонуклеотидов, которые могли сформировать квадруплексы или иные вторичные структуры.

Добавление Dps приводило к изменению структуры этих зерноподобных частиц таким образом, что вместо ожидаемой конструкции, состоящей из двуцепочечного участка, соединенного с бинарным комплексом, мы наблюдали 2–4 неупорядоченных одноцепочечных участка ДНК (Рис. 45А), 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

взаимодействие Dps в первую очередь происходило с зерновидными частицами, и было достаточно сильным для ремоделирования их структуры и удерживания неупорядоченных молекул.

Разветвлённые молекулы ДНК на (Рис. 45В) были собраны из олигонуклеотидов Y1, Y2 и Y3 (Табл. 5). Они сформировали Y-подобную структуру, приведённую на центральной части рисунка, которая состояла из асимметричной V-образной структуры и соединённого с ней маленького домена. Размеры этого домена хорошо соответствовали размерам зерновидных частиц, наблюдаемых на центральной панели на Рис. 45А, в то время как длина V-образного модуля 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 близко к расчётному значению ($57 \text{ п.о.} \div 64 \text{ п.о.} = 0.89$). Короткая сторона V-образного модуля на Рис. 45В, 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. 45В присутствует от 10 до 20% более крупных Y-подобных объектов длиной 53–62 нм, высота которых составляет около 2.6 нм. Они, вероятно, были сформированы из агрегировавших триплексов и дуплексов в результате квази-комплементарного квадруплекс-подобного взаимодействия вдоль G-цепи. Таким образом, появились основания предположить, что самосборка наблюдаемых частиц проходит через стадию формирования комплементарных триплексов, связанных с дуплексами через неканоническое спаривание. Поэтому гомогенность полученных разветвлённых структур была исследована с использованием электрофоретического фракционирования в 5% ПААГ (Рис. 46).

Фракционирование структур, полученных с использованием олигонуклеотидов Y1-Y2-Y3, действительно, выявило две полосы, которые по своей электрофоретической подвижности могут соответствовать триплексам и дуплексам (Рис. 46, дорожка 1). При этом, фракционирование олигомерных

структур, Y5-Y6-Y7 свидетельствовало об очень высокой эффективности самосборки триплекса, при которой мономеры и дуплексы практически отсутствовали (Рис. 46, дорожки 4-7). Триплекс Y5-Y6-Y7 отличается от конструкции Y5-Y6-Y8, АСМ-изображения, которые показаны на Рис. 45D, только отсутствием небольшой петли (см. ниже), но обе они собраны из природных последовательностей в отличие от триплекса Y1-Y2-Y3, который состоит из протяжённых цепочек одинаковых нуклеотидов. Они не формировали агрегатов (Рис. 45D), что подтверждает высказанное предположение об участии гуанинов, треки которых могут формировать квадруплексы и участвовать в квази-комплементарном взаимодействии.

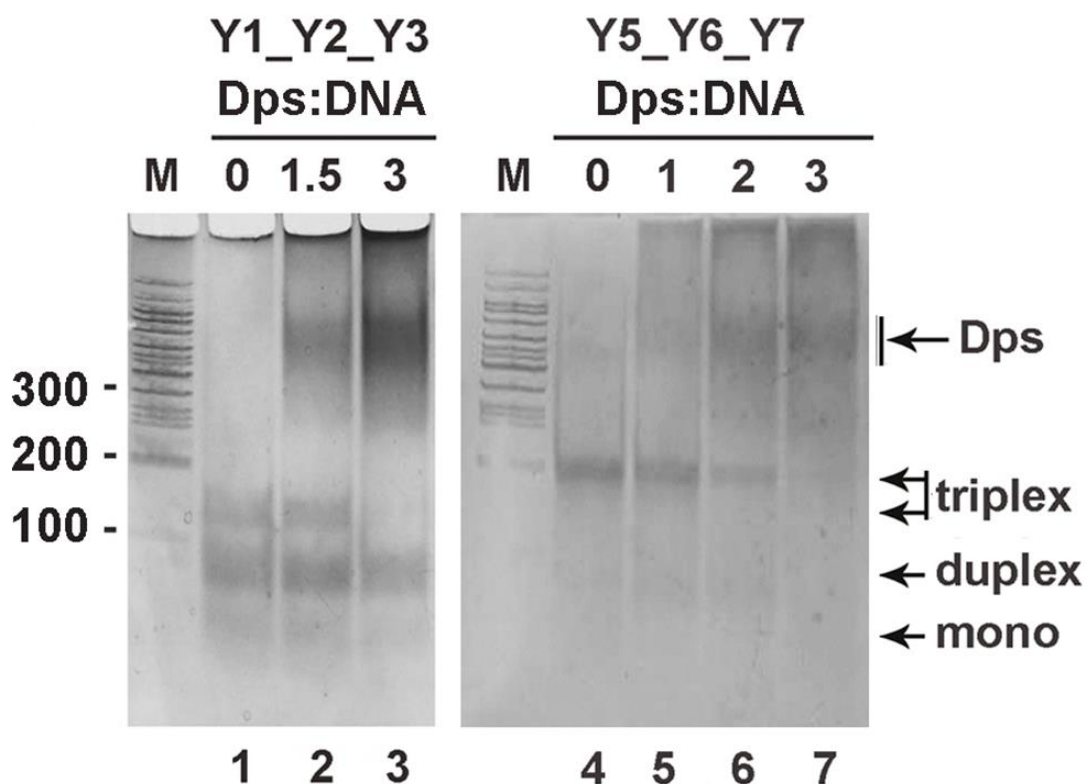


Рис. 46. Оценка электрофоретической подвижности модельных Y-подобных структур Y1-Y2-Y3 и Y5-Y6-Y7 и их комплексов с Dps. Состав и молярное соотношение смесей Dps-ДНК указаны над рисунком. Комплексы с Dps были сформированы без предварительного фракционирования Y-подобных структур после самосборки. Гели были откалиброваны с помощью ДНК-маркеров (M) и окрашены с помощью AgNO_3

В присутствии Dps большинство крупных агрегатов, обнаруженных АСМ (Рис. 45В, средняя панель), разрушалось (Рис. 45В, правая панель), но

подробное рассмотрение отдельных структур размером приблизительно 24–30 нм также не выявило его связывания с концами Y-ДНК. Поскольку размер этих структур лишь немного больше диаметра Dps, то в планарной проекции они были практически полностью закрыты белковой глобулой. Наблюдать можно было только концевые участки трёх ветвей, что не позволяло судить о том, триплексы или дуплексы взаимодействуют с Dps. Однозначный ответ на этот вопрос был получен в эксперименте, показанном на Рис. 46 (дорожки 1-3): из их смеси, полученной в процессе не очень эффективной сборки конструкции Y1-Y2-Y3, Dps с большим предпочтением выбирал триплексы. Трёхкратный молярный избыток белка был достаточен для их полного связывания, тогда как большинство дуплексов остались свободными. Основываясь на этих данных, была выдвинута гипотеза, что Dps может взаимодействовать с одноцепочечной ДНК и даже разрушать двойную спираль. При этом разветвлённые двуспиральные молекулы ДНК оказались для него более удобной мишенью, вероятно, потому, что предоставляют дополнительную двухцепочечную платформу для взаимодействия с положительно заряженными N-концевыми модулями.

На следующем этапе было установлено, что способ взаимодействия, зарегистрированный для структуры Y1-Y2-Y3 (Рис. 45B) не является следствием её особой структуры и/или нуклеотидной последовательности, поскольку Y-образные молекулы, собранные из олигонуклеотидов с природными нуклеотидными последовательностями Y5, Y6 и Y7 или Y8, формировали нуклеопротеидные комплексы с аналогичным расположением додекамера Dps (Рис. 45D для Y5-Y6-Y8). Тем не менее, оставалось не ясным, будут ли молекулы Dps проявлять сродство к разветвлённой двуспиральной структуре при наличии двух условий: 1. - расположенного рядом одноцепочечного участка; 2. - сайта, защищённого Dps от воздействия ДНКазы I (Рис. 35.). Для проверки этого предположения было спроектировано и использовано две модификации самособирающихся Y-подобных конструкций. В первой модифицированной конструкции фрагмент ДНК, содержащий

защищённый сайт был добавлен в составе 26 нуклеотидных олигонуклеотидов на 5'-конец Y5 и 3'-конец Y6, увеличивая, таким образом, длину этой ветви триплекса на 9 нм (Табл. 5 и Рис. 45С).

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. 45С, правая часть). При этом удлиненная ветвь была отчётлива различима, что свидетельствует о том, что место взаимодействия с Dps осталось в области ветвления Y-ДНК, не сместившись в сторону вставки.

Во второй модификации мы произвели замену двух нуклеотидов AA на TT в центре олигонуклеотида Y7 (Табл. 5, Y8), поэтому Y-подобная структура Y5-Y6-Y8 стала содержать короткую одноцепочечную петлю в одной из ветвей (Рис. 45D). Такая замена в нуклеотидной последовательности привела к некоторому смещению белковой глобулы от точки ветвления молекулы ДНК (Рис. 45D), в результате можно было наблюдать все три ветви Y-ДНК (Рис. 45D, вставка трёхмерного изображения поверхности).

Таким образом, можно заключить, что Dps преимущественно взаимодействует с точками ветвления Y-ДНК, что может быть обусловлено наличием трёх платформ для связывания его N-концевых ДНК-связывающих модулей, формирующих триаду вокруг каждой из четырёх вершин в додекамерной глобуле белка. При этом важным является тот факт, что даже при наличии разветвлённой структуры, Dps сохраняет некоторое сродство к одноцепочечным или гибким областям в структуре ДНК (Рис. 45С), а на границе двуспиральной и однонитевой ДНК может способствовать расплетанию двойной спирали (Рис. 45А). Если это так, то взаимодействие Dps с одноцепочечными участками геномной ДНК тоже может вызывать её денатурацию. Для проверки этой возможности была проанализирована морфология нуклеопротеидных комплексов, сформированных Dps с плазмидной ДНК рЕТ28b, обработанной сайт-специфической нуклеазой, которая

вызывает формирование разрыва одной из комплементарных цепей ДНК в области распознаваемой ею нуклеотидной последовательности.

3.13 Исследование возможности формирования одноцепочечных участков в нативной ДНК с участием Dps

Очищенная плаزمида pET28b была использована в качестве модели нативной молекулы ДНК. Атомно-силовая микроскопия позволила зарегистрировать множество суперспирализованных молекул (Рис. 47А). Затем эта плаزمиды была обработана сайт-специфичной нуклазой Nt.BspD6I, узнающей девять мотивов GAGTC в её нуклеотидной последовательности и делающей разрывы с отступом в четыре нуклеотида по верхней нити ДНК в сторону 3'-конца [115]. В результате этого воздействия плазмиды релаксирует и даже может фрагментироваться в случае близкого расположения сайтов, распознаваемых нуклазой (Рис. 47В).

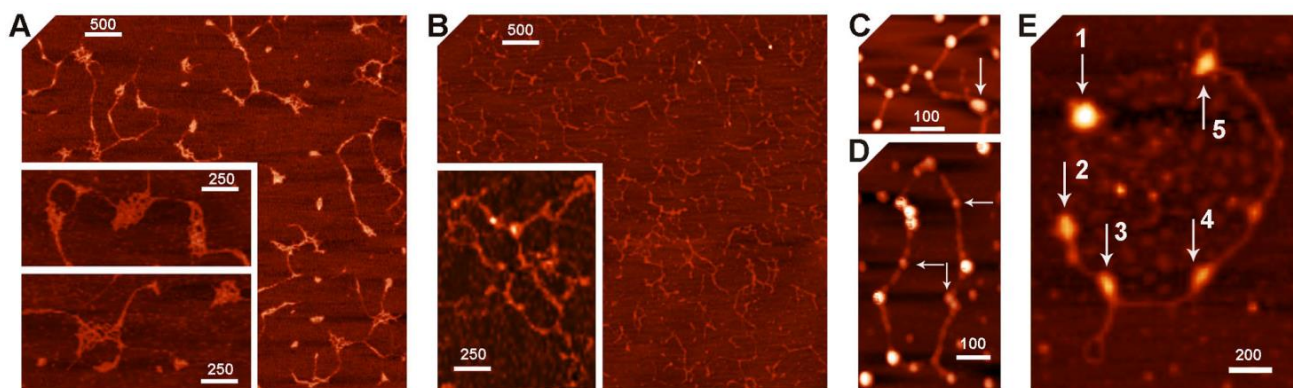


Рис. 47. Изображения, полученные с помощью АСМ для нативной плазмиды (А, С) и плазмиды pET28b, обработанной сайт-специфичной нуклазой Nt.BspD6I (В, D, E), в свободном состоянии (А, В) и в составе нуклеопротеидных комплексов с Dps (С–Е). Белая черта – шкала (нм). Горизонтальными и вертикальными стрелками на панелях С–Е указаны области формирования нуклеопротеидных комплексов с молекулами Dps, имеющими, соответственно, меньшую, или большую степень олигомеризации, чем додекамер.

После такой подготовки плазмид к их растворам добавляли Dps в 5- и 10-кратном молярном избытке. Такое соотношение обеспечивает формирование комплексов с нативной и обработанной нуклазой ДНК и позволяет

идентифицировать их различия при взаимодействии с предпочтительными сайтами. Плотность расположения Dps при его 10-кратном избытке была больше на обработанной никазой плазмиде по сравнению с нативной и составляла примерно одну молекулу на каждые 117 ± 12 нм против 135 ± 23 нм соответственно (расчетная длина плазмиды составляет 1917 нм).

Полученные различия являются статистически значимыми и для плазмиды, модифицированной сайт-специфичной никазой, они были постоянны. При этом бинарные комплексы, сформированные с додекамерами Dps, в обоих случаях имели схожую морфологию, и их тщательное изучение не выявило наличия одноцепочечных участков в области взаимодействия (Рис. 47С и 47D). Для нативных и никированных образцов плазмиды примерно 15% комплексов были сформированы с частицами Dps, степень олигомеризации которых была меньше, чем додекамер (Рис. 47D, горизонтальные стрелки). Поэтому можно предположить, что додекамерная форма не является единственно возможной для взаимодействия с ДНК. Как и ожидалось, в препаратах с фрагментированной плазмидой в большинстве случаев Dps располагался на концах двойной спирали. Образцы плазмиды, обработанные никазой, при этом содержали в два раза больше комплексов, образованных агрегированными частицами Dps (30 и 15%, соответственно). Они, как правило, были встроены в матрицу ДНК (отмечены вертикальными стрелками на Рис. 47С и E). 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. 47E), не может образоваться в плазмиде после обработки никазой или в результате пробоподготовки.

3.14 Оценка термодинамических и конформационных свойств Dps в составе нуклеопротеидного комплекса, включающего фрагменты ДНК с различной структурной организацией

Для исследования возможных конформационных изменений додекамеров Dps при формировании нуклеопротеидных комплексов, оценки их стабильности, а также констант связывания при взаимодействии с различными фрагментами ДНК было использовано несколько подходов. В частности, исследование конформационных изменений молекул Dps отдельно и в составе нуклеопротеида в зависимости от температуры проводили с использованием методов динамического светорассеяния и флуоресцентной спектроскопии. Измерение констант связывания Dps с ДНК осуществляли с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса.

Результаты экспериментальных исследований показали, что, гидродинамический радиус молекул Dps в буфере, содержащем 50 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl (рН 8.0) и 10^{-4} М EDTA, составляет 9–10 нм при 25°C (Рис. 48). Повышение температуры раствора до 55°C с шагом в 10°C практически не оказывало на него влияния (Рис. 48А). Среднее значение гидродинамического радиуса при этом составляло 9.86 нм, а средняя интенсивность зарегистрированных максимумов была 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 не превышал 7%.

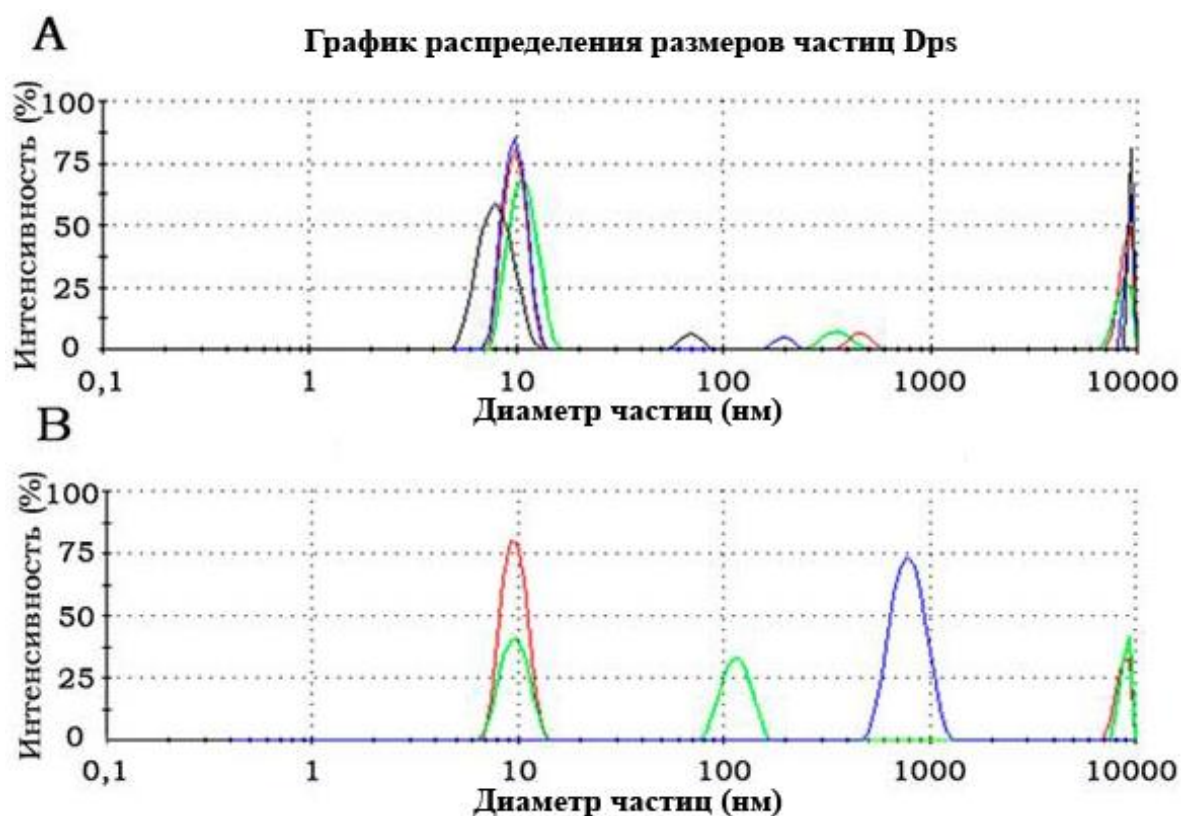


Рис. 48. Распределение размеров частиц Dps в растворе при различных температурах, полученное методом динамического светорассеяния. (А): красная линия – 25°C; зелёная линия – 35°C; синяя линия – 45°C; чёрная линия – 55°C; (В): – красная линия – 60°C; зелёная линия – 65°C; синяя линия – 70°C

Повышение температуры до 60°C привело к формированию единственного максимума, соответствующего величине 9.6 нм с интенсивностью 81.7% (Рис. 48В), дальнейшее увеличение температуры до 65°C сопровождалось формированием второго, достаточно четко выраженного максимума, с интенсивностью 38.1% в области 115.7 нм и снижению интенсивности максимума, соответствующего 9.6 нм до 45.5%, что свидетельствует о начале агрегации белка. Дальнейшее 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, можно сделать вывод о том, что Dps достаточно термостабилен в широком диапазоне температур. Причём в области 65°C происходит первичная денатурация белка с последующим формированием крупных агрегатов.

Метод динамического светорассеяния позволяет достаточно точно определить гидродинамический радиус только для сферических объектов, и этот факт делает его практически неприменимым к таким частицам, как фрагменты ДНК. Поэтому на следующем этапе использовали данный метод для изучения параметров нуклеопротеидных комплексов, которые имеют структуру, близкую к глобулярной (Рис. 49).

Для проведения данной серии экспериментов комплексы готовили согласно методике, описанной в Материалах и Методах (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 было зарегистрировано четыре типа частиц. Первый тип имел диаметр от 6.3 до 14.2 нм (средний диаметр частицы ~ 9.1 нм) и интенсивностью максимума 15.1%. Размеры частиц второго типа лежали в диапазоне 17.6 – 34 нм (средний диаметр частицы ~ 25.4 нм), а соответствующие пики имели меньшую интенсивность. Третий тип частиц, присутствующих в растворе, имел размеры 146.2 – 780.9 нм (средний диаметр частицы ~ 405 нм) и его вклад составлял около 30%. Четвёртый тип имел диаметр частиц свыше 5190 нм, а интенсивность пика была самой большой.

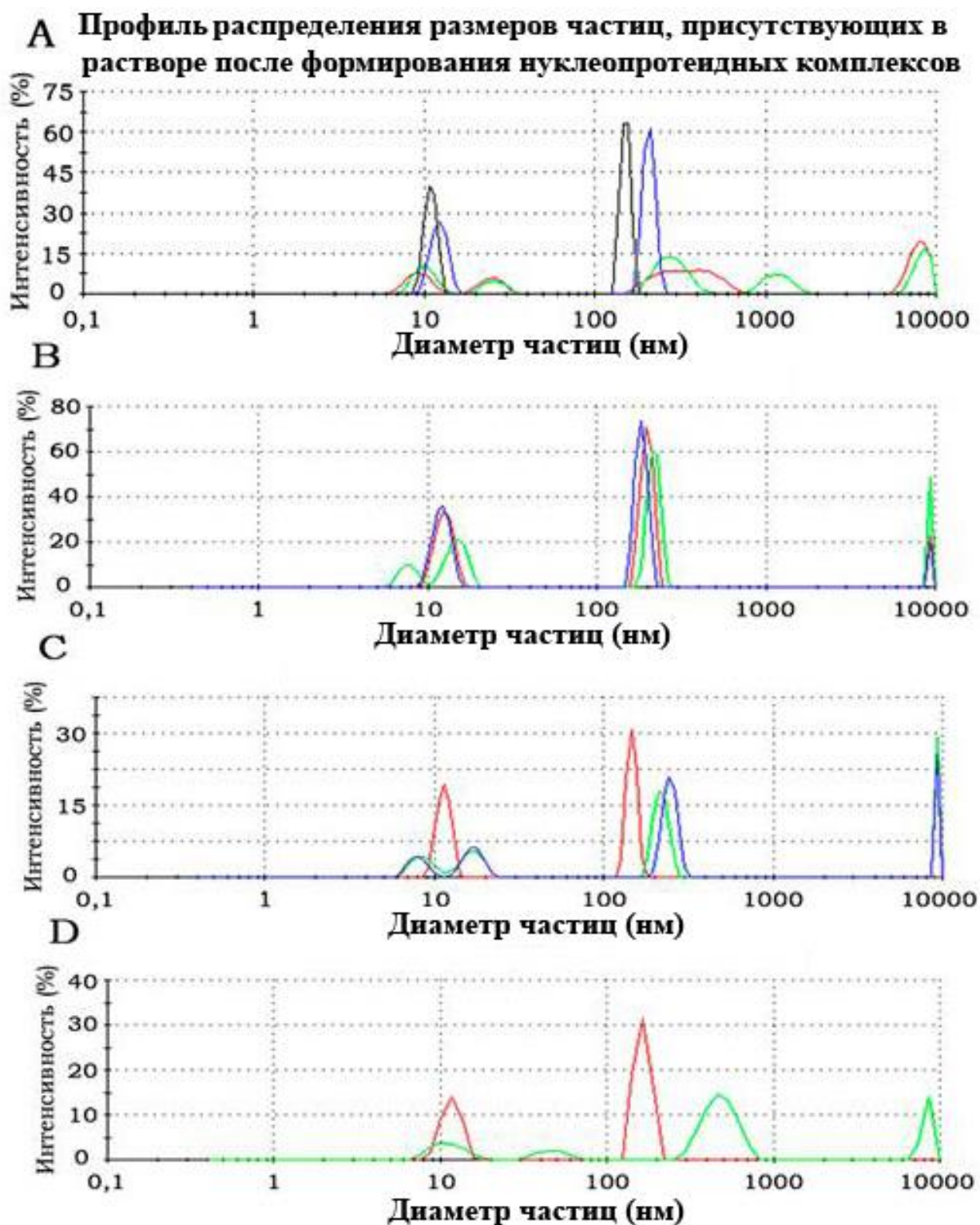


Рис. 49. Профиль распределения размеров частиц, присутствующих в растворе после формирования комплексов Dps-ДНК(*H*) при разных температурах. (А): красная линия – 20°C, зелёная линия – 25°C, синяя линия – 35°C, чёрная линия – 45°C; (В): красная линия – 55°C, зелёная линия – 60°C, синяя линия – 65°C; (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 в пропорции вышеперечисленных типов частиц. Однако частицы третьего типа разделились на две группы. Первая обладала диаметром 157.2 – 468.9 нм и интенсивностью максимума 35%, а частицы второй группы имели диаметр от 726 до 1872 нм, вклад которых был в полтора раза меньше (Рис. 49А). Это свидетельствует о появлении в растворе значительного количества крупных полидисперсных частиц, которые вполне могут отражать уже обсуждавшийся выше процесс агрегации, из-за которого при электрофоретическом фракционировании ДНК-белковые комплексы не входят в гель.

Увеличение температуры ещё на 10°C приводит к значительному изменению размеров частиц (Рис. 49А). Из четырёх групп остается 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 - от 169.1 до 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 предположение о том, что она преимущественно состоит из молекул белка, не связавшихся с фрагментами ДНК. Наибольшее количество частиц второй группы имеет размер 151.8 нм, что достаточно близко к размеру использованных фрагментов ДНК в комплексе с Dps.

Нагревание раствора до 55°C, 60°C и 65°C не приводит к значительному перераспределению размеров частиц (Рис. 49В), хотя на графике можно наблюдать максимум в области 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 с радиусом в области 1000нм, обнаруженные для чистого белка при такой же температуре (Рис. 48В). Поэтому была предпринята попытка найти температурный предел, при котором можно будет наблюдать необратимую денатурацию Dps в составе нуклеопротеидного комплекса.

Повышение температуры до 80°C (Рис. 49С) привело к формированию частиц размером около 109.9 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 (Рис. 49D), тогда как повышение температуры до 90°C привело к уменьшению фракции частиц размером 10.8 нм и формированию небольшого количества частиц размером 43.8нм, 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 повышении устойчивости Dps к тепловой денатурации в присутствии 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 широком диапазоне температур (Рис. 50). Растворы ДНК обладали очень низким уровнем флуоресценции (примерно в 10 раз меньше, чем уровень собственной флуоресценции белка), поэтому сравнивали кривые испускания растворов чистого белка и нуклеопротеидных комплексов, которая, согласно данным представленным на Рис. 22, в основном обусловлена флуоресценцией триптофанов.

Для формирования комплексов было выбрано несколько типов фрагментов ДНК (*H*, *S* и *Y5-Y6-Y7*), отличающихся структурой и

нуклеотидным составом. Измерения проводилось при длине волны возбуждения 280нм, трёхкратном усилении и размере щели 8x5 в диапазоне температур 20–80°C с шагом в 5°C. Как было установлено ранее (Рис. 22), максимум собственной флуоресценции Dps при комнатной температуре находится в области 332нм. Дальнейшее поэтапное нагревание образца до 55°C вызывает постепенное снижение эмиссии, что согласуется с представлением о температурном тушении флуоресценции. При переходе от 55°C к 65°C интенсивность флуоресценции падает сильнее, что, вероятно, вызвано тепловой денатурацией белковой молекулы Dps (Рис. 50), что согласуется с результатами экспериментов, полученными методом динамического светорассеяния. Они свидетельствуют, что необратимая денатурация молекул нативного белка Dps начинается при температуре выше 55°C (Рис. 48).

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. Её максимум был сдвинут примерно на 3-5 нм в коротковолновую область ~ 10 нм, что свидетельствует о некотором перемещении триптофанов на поверхность белка. Повышение температуры также приводило к снижению интенсивности флуоресценции, выявив небольшое относительное падение при переходе от 65°C к 70°C. Это может свидетельствовать о некотором протективном влиянии ДНК, защищающей белок от денатурации (Рис. 50).

Спектр, зарегистрированный для комплекса, состоящего из Dps и линейного фрагмента *S*, при комнатной температуре имел интенсивность и форму, идентичную спектру, зарегистрированному для нативного белка (Рис. 22). Однако при повышении температуры до 40°C его интенсивность снижалась более резко, а после 45°C снова наблюдалось увеличение интенсивности максимума. Так как при 55°C эмиссия Dps в этом комплексе стала практически такой же, как в комплексе белка с фрагментом *H*, по всей видимости связано с характером температурной зависимости в диапазоне от 20 до 40°C и отражает

конформационные особенности белка, формирующего особый комплекс с фрагментом *H*, который обеспечивает его конкурентоспособность с фрагментом *S* (Рис. 34). При высокой температуре специфика этого взаимодействия может нарушаться, что должно переводить белок в конформационное состояние, типичное для неспецифического связывания с ДНК.

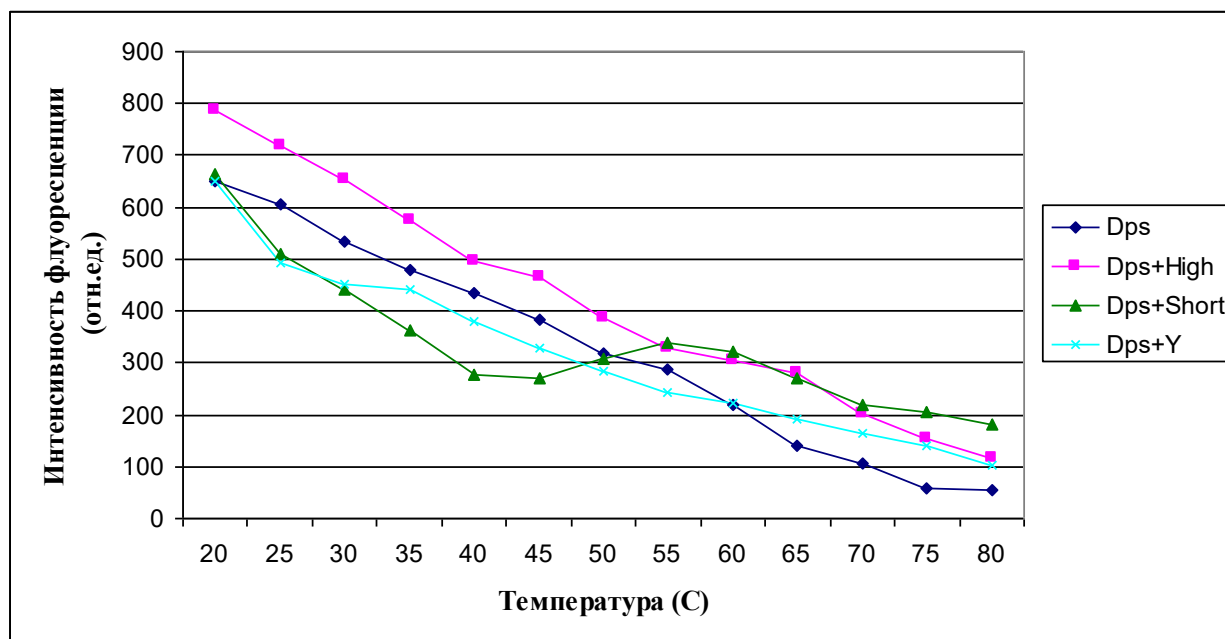


Рис. 50. Температурная усредненная зависимость интенсивности эмиссии при 322 нм для Dps и его комплексов с разными фрагментами ДНК

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, и был смещён в коротковолновую область, аналогично другим ДНК-белковым комплексам. Повышение температуры до 30°C сопровождалось таким же снижением флуоресценции, как и в случае комплекса Dps-S, что может свидетельствовать о взаимодействии Dps с разветвлённой структурой в *S*, потенциально формирующейся на участке, с тремя парами коротких прямых повторов, которые могут формировать сдвинутые структуры в ДНК (slipped loop structures, SLP). Дальнейшее нагревание комплекса Dps+Y не приводило к

повышению интенсивности флуоресценции, что может отражать стабильность связывания, не переходящего в неспецифическое взаимодействие.

Основываясь на полученных результатах можно сделать вывод о том, что при формировании нуклеопротеидных комплексов Dps с различными по структуре и организации молекулами ДНК происходят не равнозначные конформационные изменения белковой глобулы. Это может быть обусловлено разным набором формирующихся ДНК-белковых контактов. Если это так, то и энергии связей, стабилизирующих нуклеопротеидный комплекс, будут 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 *H* 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. 7 представлены полученные результаты.

Таблица 7. Результаты исследования кинетики формирования нуклеопротеидных комплексов

<i>Образец</i>	<i>Концентрация AT</i>	<i>Константа прямой реакции $k_{on} (s^{-1}M^{-1})$</i>	<i>Константа обратной реакции $k_{off} (s^{-1})$</i>	<i>Константа диссоциации $K_D (M)$</i>	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

Они свидетельствуют о том, что итоговые значения констант диссоциации отличаются почти на 2 порядка и составляют: 1.48×10^{-10} для разветвлённого фрагмента ДНК и 9.70×10^{-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. То есть, аппроксимацию полученных результатов можно считать удовлетворительной для интерпретации полученных результатов. Графическое отображение полученных данных приведено на Рис. 51. Величина отклика для комплекса, полученного с использованием разветвлённого фрагмента ДНК, более чем в 4 раза ниже, чем для нуклеопroteида, 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 комплекса с линейными молекулами ДНК монотонно снижался, тогда как для комплекса Dps с разветвлённым фрагментом ДНК, он оставался практически неизменным, что свидетельствует о большей энергетической стабильности последнего (Рис. 51).

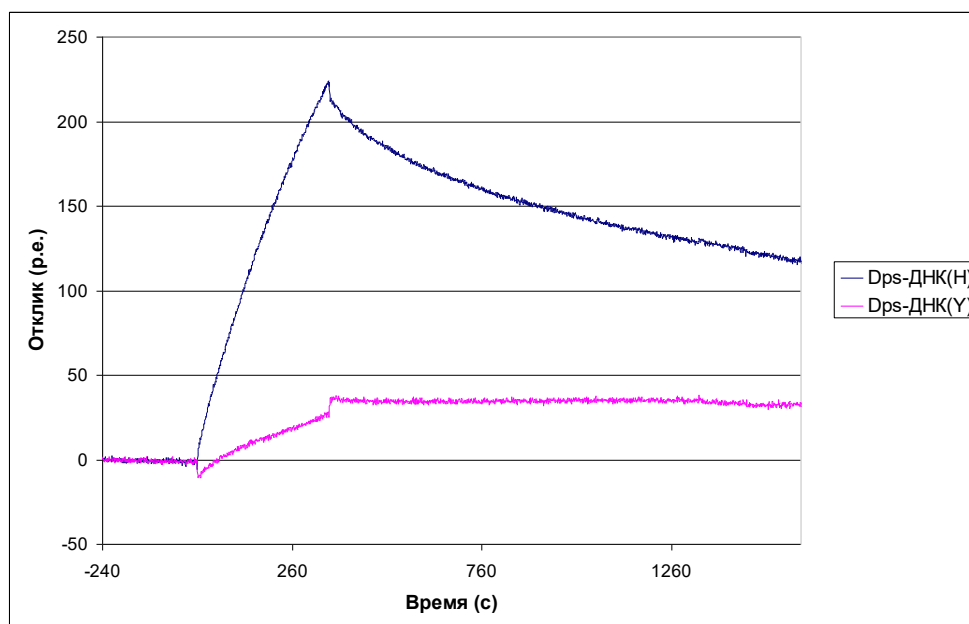


Рис. 51. Графики зависимости резонансного отклика для комплексов Dps-ДНК(Н), Dps-ДНК(У5-У6-У7) от времени, полученные методом плазмонного резонанса. р.е. – резонансная единица.

Полученные данные хорошо согласуются с результатами, полученными ранее, в первую очередь с данными атомно-силовой микроскопии (Рис. 45) и соответствуют представлению, что Dps формирует больше контактов с

разветвленной искусственной конструкцией, чем с линейным фрагментом. Известно, что содержащие остатки лизина ДНК-связывающие модули Dps сгруппированы в триплеты [30] и на поверхности белковой глобулы имеется четыре таких триплета. Каждый N-концевой модуль в составе триплета может связаться с ДНК. В случае линейных неизогнутых ДНК стерически должны формироваться 2 контакта, а для Y-подобной и изогнутых структур возможно взаимодействие со всеми тремя модулями, что полностью объясняет большую термодинамическую стабильность Dps-Y комплекса (Рис. 51, Таблица 7).

Двадцать одна аминокислота N-концевого участка каждой субъединицы Dps не структурирована, поэтому их расположение в белковой глобуле не удалось определить, хотя 13 аминокислотных остатков одного из мономеров были идентифицированы с помощью рентгеноструктурного анализа [67] (Рис. 52B). Это предоставляет возможность оценить, насколько протяженность и гибкость неструктурированных N-концов Dps позволяет белку формировать внутримолекулярные электростатические контакты. Для проверки такой возможности было проведено моделирование распределения электростатического потенциала на поверхности додекамера Dps с использованием программы Swiss-PdbViewer [69] (Рис. 52A).

На Рис. 52A видно, что практически вся поверхность молекулы заряжена отрицательно, что согласуется с литературными данными. Однако изменение порогового значения для белого цвета с -12 эВ до -4.8 эВ позволяет выявить области с особенно высоким отрицательным потенциалом (Рис. 52C). Стало ясно, что они расположены на расстоянии, достаточном для взаимодействия с лизинами K₅, K₈, K₁₀ N-концевых модулей соседних мономеров. Следовательно, в отсутствие ДНК все ДНК-связывающие модули белка могут находиться в контакте с рядом расположенными отрицательно заряженными доменами на поверхности белка. Такое расположение N-концевых модулей зарегистрировано кристаллографически для Dps *A. tumefaciens* [31].

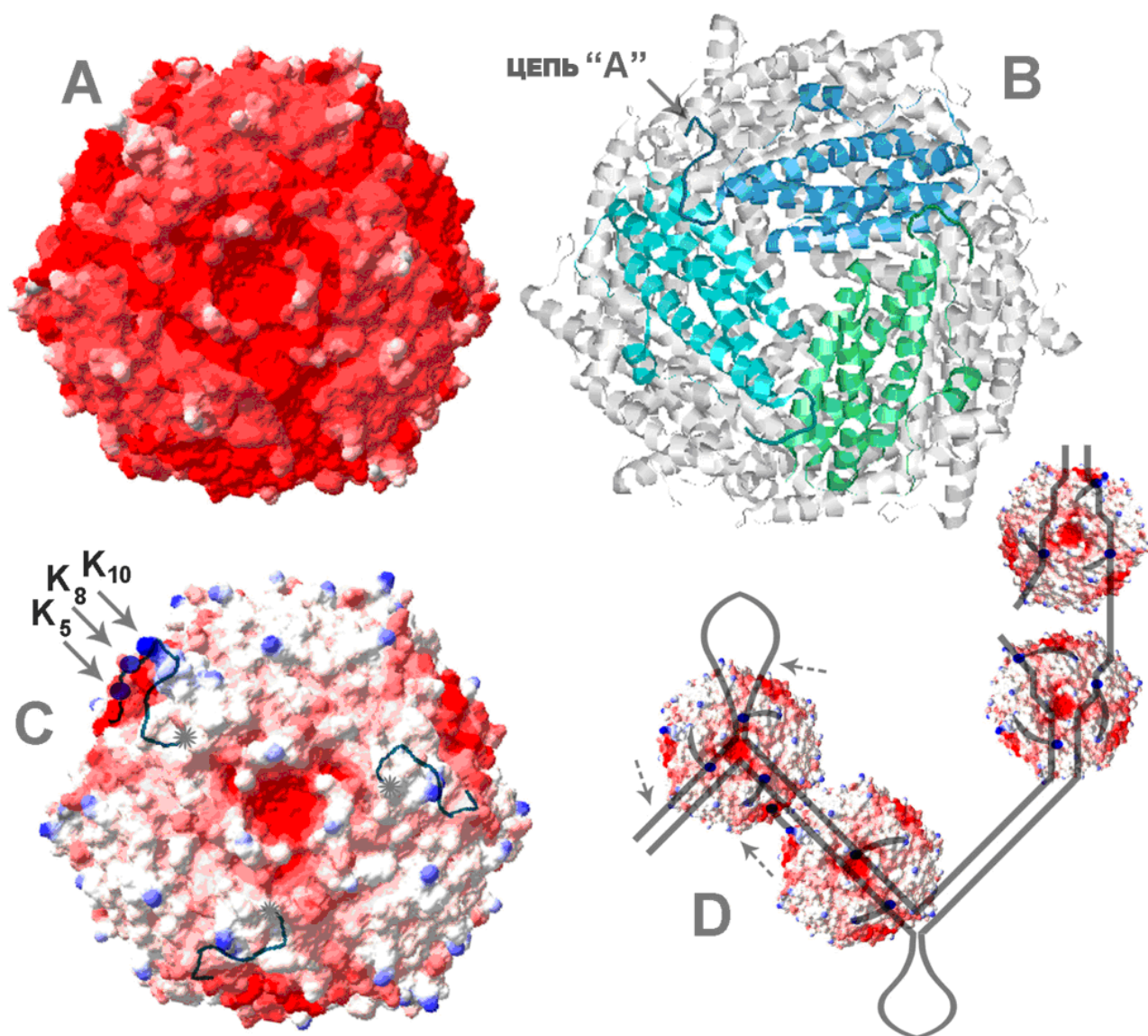


Рис. 52. Распределение электростатического потенциала (А и С) на поверхности додекамера Dps (В) и возможные способы формирования межмолекулярных контактов (D). А: распределение электростатического потенциала показано с использованием пороговых значений для отрицательного потенциала -12 эВ (красный) и -1.5 эВ (белый). С: то же, что А, но пороговые уровни -12 эВ и -4.8 эВ, соответственно. Синим цветом показаны области с потенциалом больше 0 эВ. K₅, K₈, K₁₀ – позиции остатков лизина; серые звездочки – соответствуют концам неструктурированных участков полипептидных цепей. В – кристаллическая структура Dps [67], отражающая расположение центральной поры, сформированной из трех мономеров Dps

Это важное обстоятельство, поскольку позволяет объяснить, почему способность Dps агрегировать и образовывать олигомерные структуры возрастает в присутствии ДНК. Согласно нашей гипотезе, ДНК, имеющая более

высокий отрицательный электростатический потенциал, чем пятна на поверхности белковой глобулы, перетягивает на себя один, два или три N-конца одной вершины. В результате отрицательно заряженные домены освобождаются и с ними могут связаться N-концевые модули соседних молекул Dps, если они находятся на доступном расстоянии. Схематично изображение такого способа взаимодействия для двух молекул Dps, связавшихся с соседними участками ДНК, показано на Рис. 52D (слева), но пространственное сближение возможно и для комплексов, образованных на удалённых друг от друга участках. В результате, могут образоваться крупные агрегаты, которые создают проблемы при электрофоретическом фракционировании [12, 20, 60, 152, 159, 172].

Согласно нашей гипотезе, в отсутствие ДНК N-концевые модули Dps не свободны, а закреплены на отрицательно заряженной поверхности белковой молекулы. Формально это противоречит данным рентгеноструктурного анализа, с помощью которого факт этого закрепления не был обнаружен. Это противоречие, тем не менее, можно объяснить не фиксированным расположением N-концевых лизинов в участках потенциального взаимодействия, которые содержат много остатков аспарагиновой и глутаминовой аминокислот, разная комбинация которых может стать мишенью для взаимодействия. Зато наша модель объясняет низкую способность свободных молекул Dps агрегировать между собой в отсутствие ДНК и, по-видимому, может объяснить образование высокоупорядоченных двумерных структур [70], формирующихся на твёрдой поверхности в высокой концентрации белка, которая обеспечивает необходимую для контакта близость.

Таким образом, присутствие ДНК стимулирует формирование белок-белковых взаимодействий за счет перераспределения внутримолекулярных контактов на поверхности белковой глобулы Dps, что приводит к освобождению потенциальных мишеней для взаимодействия с N-концевыми модулями других молекул Dps. Полученные данные свидетельствуют о наличии структурной специфичности у молекул Dps, которая, однако, была

зарегистрирована только *in vitro* с использованием искусственных молекул ДНК. Данное обстоятельство может не отражать реальных механизмов, используемых Dps для взаимодействия с природной ДНК в бактериальной хромосоме. Поэтому, на следующем этапе было изучено распределение этого белка на геномной ДНК *E.coli* с использованием метода ChIP-Seq (Chromatin immunoprecipitation with direct sequencing), а полученные результаты проанализированы с применением соответствующих биоинформатических подходов.

3.15 Белок Dps распределён по бактериальной ДНК неслучайным образом

Основной мотивацией для этого масштабного эксперимента были следующие факты. Во-первых, было установлено, что Dps *in vitro* предпочтительно взаимодействует с одним из двух фрагментов регуляторной области собственного гена, что предполагает присутствие в его структуре какой-то особенности, обеспечивающей эту селективность (Рис. 34). Во-вторых, с помощью атомно-силовой микроскопии было обнаружено повышенное сродство Dps к точкам ветвления Y-подобных молекул ДНК (Рис. 45), что предполагает его способность распознавать шпильчатые структуры в природных ДНК, формирующиеся в условиях небольшой отрицательной суперсперализации кольцевой хромосомы. В-третьих, константы связывания Dps с линейным фрагментом и Y-образной структурой отличались кардинальным образом. Основания против эксперимента ChIP-Seq тоже были. Во-первых, это отсутствие классического модуля для взаимодействия с ДНК, типа спираль-поворот-спираль, роу-домены, цинковые пальцы (Zn-fingers), что означало невозможность получить чёткие профили распределения Dps вдоль бактериальной хромосомы. Во-вторых, основной задачей эксперимента должна была стать проверка гипотезы о повышенном сродстве Dps к участкам ДНК, содержащим прямые или инвертированные повторы нуклеотидной последовательности. Однако таких участков в ДНК очень много.

Инвертированные повторы в большом количестве присутствуют во всех регуляторных участках генома. Поэтому статистический анализ полученных данных представлялся очень сложным. В-третьих, принято считать, что главной функцией Dps как белка нуклеоида является конденсация бактериальной хромосомы в условиях стационарного роста. Однако в этих условиях число молекул Dps достигает таких значений, когда весь геном становится покрыт этим белком и нет никакого смысла искать в нём сайты предпочтительной локализации (180000). Во время экспоненциального роста молекулы Dps в бактериях в 30 раз меньше, и их взаимодействие с геномом с учётом не очень высокой константы ассоциации с линейной ДНК (Табл. 7) и наличием в клетках множества других белков, поддерживающих рабочее состояние генома, в том числе 80000 молекул Fis могло оказаться плохо детектируемым. Тем не менее, этот эксперимент был поставлен и оказался чрезвычайно информативным.

Для изучения профиля распределения Dps вдоль бактериального генома были использованы бактериальные клетки, собранные на экспоненциальной фазе роста. Для получения результатов было проведено два независимых эксперимента с использованием приборов HiSeq 2000 и MiSeq (Illumina), обеспечивающих различную глубину секвенирования полученных библиотек. В первом эксперименте суммарно было получено 27850801 прочтений для контрольных образцов и 42133025 прочтений иммунопреципитированных опытных образцов, нуклеотидные последовательности которых были наложены на геном *E.coli* MG1655 с использованием базовых настроек программы CLCGW. Использование строгих критериев расчета позволили картировать 25682627 и 39199442 прочтений для контрольного и опытного набора данных, соответственно. В эксперименте с использованием прибора MiSeq было получено 5952682 и 7102289 выровненных прочтений с базовыми настройками программы CLCGW, в то время как использование строгих критериев позволило картировать 4341979 и 5788335 прочтений. В зависимости от использованных настроек программы, в первом эксперименте было получено 14875 или 14309 пиков длиной не менее 60 п.н. и р-значениями 5.9×10^{-3} или

6.4×10^{-3} . После объединения соседних пиков, находящихся на расстоянии меньшем, чем 90 п.н., их число снизилось до 10602 и 10462 соответственно, но все равно оставалось очень большим.

Для данных, полученных во втором эксперименте, было выявлено 5350 и 4772 комбинированных максимумов, обладающих p -значениями 7.5×10^{-3} и 9.2×10^{-3} . Около 85% пиков, обнаруженных во втором эксперименте с использованием стандартных и строгих критериев поиска, перекрывались с пиками, выявленными в первом эксперименте. Учитывая, что эксперименты проводились в разных лабораториях, а образцы были секвенированы на разных платформах, такую степень сходимости можно считать неожиданно хорошей, позволяющей надеяться на обнаружение основного набора предпочтительных сайтов связывания Dps в геноме.

Для валидации полученных данных были использованы профили распределения в геноме сайтов связывания Dps, полученных *in vitro* в экспериментах SELEX [320]. Эти данные хранятся в базе данных TEC (<https://shigen.nig.ac.jp/ecoli/tec/top/about>), которая позволила идентифицировать положение 371 пика с точностью 100 пар нуклеотидов, из которых 326 оказались перекрывающимися с выявленными в наших экспериментах областями ДНК, взаимодействующими с Dps *in vivo*. Таким образом, данные, полученные *in vivo* и *in vitro* свидетельствуют о наличии предпочтительных мишеней для Dps в геноме *E.coli*.

Тем не менее, перед подробным анализом полученных данных необходимо обратить внимание на два обстоятельства. Во-первых, полученные данные свидетельствуют о том, что в режиме автоматического формирования пиков, средние размеры сайтов связывания Dps по данным двух экспериментов оказались разными и составили 102 ± 104 п.н. и 214 ± 220 п.н., соответственно. Это может отражать некоторые функциональные особенности Dps, которые были по-разному реализованы в условиях двух экспериментов. Скорее всего эта разница возникает из-за особенностей автоматического картирования прочтений разной длины. В первом эксперименте все прочтения меньше 50

нуклеотидов были отфильтрованы программным обеспечением секвенатора, а все длинные последовательности укорочены до 50 нуклеотидов. Прочтения, полученные во втором эксперименте, имели длину от 35 до 150 нуклеотидов. Фильтрации и триммингу они не подвергались и напрямую использовались для картирования программным пакетом CLC WB.

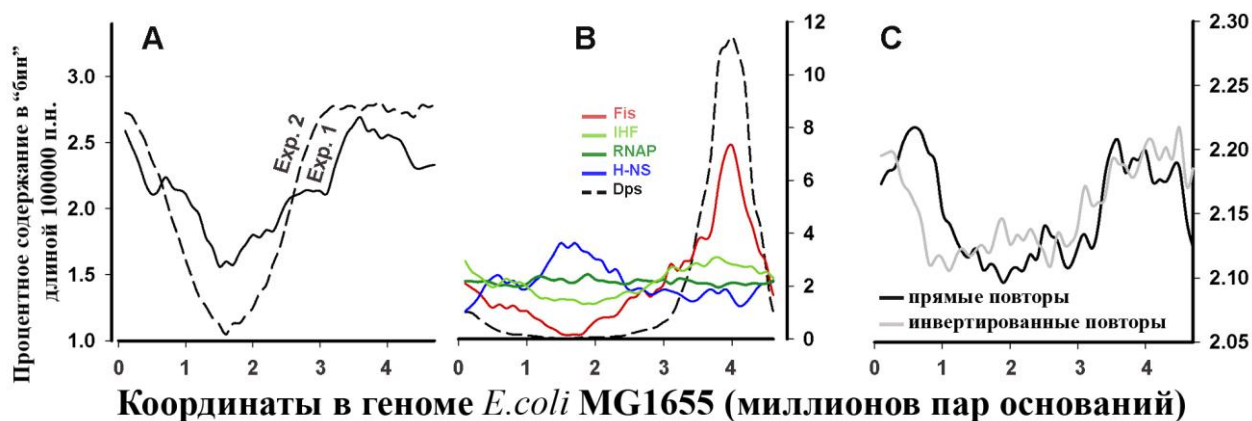


Рис. 53. Профиль распределения в геноме сайтов связывания Dps и их корреляция с позиционированием тандемных повторов и мест связывания основных белков нуклеоида. А: Распределение сайтов связывания Dps, найденных CLC GW по двум экспериментам. В: То же для комбинированного набора данных (CS) и областей контакта белков Fis [157], IHF [322], H-NS [323] и РНК-полимеразы [323] С: То же для прямых (длина 5-24 п.н., спейсер 1-15 п.н.) и инвертированных (длина 5-18 п.н., 1-15 п.н. и) повторов, полученных из генома *E. coli* MG1655 с помощью программы Unipro UGENE [192].

По этой причине следующее картирование было проведено для последовательностей одинаковой длины 50 нуклеотидов. В первом эксперименте это все прочтения, а в длинных последовательностях второго эксперимента были использованы их центральные части, что точнее соответствует сайту связывания, чем фрагменты, полученные в результате обрезания 3'-концов.

Во-вторых, анализ профиля распределения сайтов связывания Dps в масштабе всего бактериального генома в обоих экспериментах свидетельствует об их повышенной плотности вблизи ориджина репликации (Рис. 53А). Это может указывать на обогащение этого участка предпочтительными мишенями

для связывания Dps, или отражать различия в копиях ДНК, которое выше рядом с ориджином репликации (Рис. 54В, [321]).

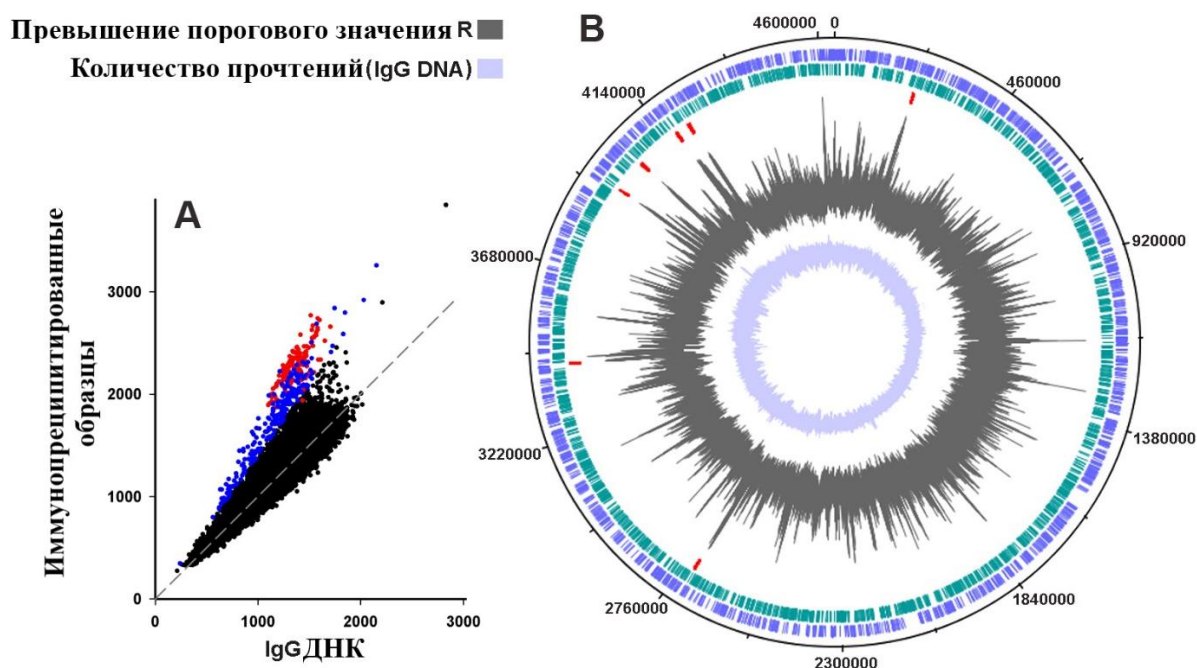


Рис. 54. Профиль распределения Dps на геномной ДНК *E. coli* MG1655 (первый эксперимент). **А:** Корреляция между числом прочтений, зарегистрированных для опытного и контрольного образцов (суммированы в бине размером 100 п.н.). Красные точки соответствуют генам рибосомных РНК. Голубые точки обладают $R \geq 1.4$. Пунктирная линия - биссектриса координатной плоскости. **В:** Профиль сайтов связывания Dps в геноме, рассчитанный по параметру R в «бегущем окне» 35 н.п. (четвёртая окружность). Два внешних кольца - распределение генов на генетической карте по верхней и нижней цепи генома *E. coli* MG1655. Красные черточки на третьей окружности - позиции оперонов рРНК. Пятая окружность: распределения прочтений, зарегистрированных в библиотеках контрольных образцов, посчитанных в «бегущем окне» размером 35 п.н.

В-третьих, при обработке данных программой CLC GW используются характеристики формы пика, рассчитанные в разностном режиме для экспериментальных и контрольных образцов во всем геноме и пики, превышающие амплитуду контрольного образца на заданное пороговое значение, предлагаются в качестве возможных мишеней связывания. Их оказалось слишком много и даже объединение близкорасположенных пиков кардинальным образом ситуацию не изменило. Это является прямым

следствием наличия многих мест связывания в геноме без формирования явно доминирующих пиков (Рис. 54В), что снижает величину полногеномного StD (стандартное отклонение), используемого для расчёта пороговых значений. В результате, статистически достоверными (т.е. превышающие контрольный уровень на 3 StD) становится больше пиков, чем для белков с малым числом мест сильного связывания. Поэтому во втором картировании использовали параметр **R**, рассчитанный как отношение суммы нормализованного числа прочтений, зарегистрированных в бегущем окне фиксированного размера для библиотек иммунопреципитированных и контрольных образцов.

Прочитанные нуклеотидные последовательности обоих экспериментов были наложены на бактериальный геном с использованием программы *Matcher* [285] и проанализированы согласно ранее описанной методике. График отражающий корреляцию между контрольными и иммунопреципитированными образцами для первого эксперимента приведен на Рис. 54А, а для второго на Рис. 55А. Они отражают высокий уровень нормализации числа прочтений в экспериментальных и контрольных образцах, а также указывают на наличие мест предпочтительного связывания *Dps*. Геномные области с $R \geq 1.4$, выявленные в первом эксперименте (Рис. 54А, синие точки), также были обнаружены среди участков повышенного сродства к *Dps* во втором эксперименте (Рис. 55А). Однако предпочтительное взаимодействие с рибосомными оперонами было обнаружено только в первом эксперименте (Рис. 54А и Рис. 55А, красные точки). Два эксперимента, таким образом, выявили общие закономерности и некоторые перестройки в профиле распределения *Dps*, которые могут быть вызваны большей близостью клеток первого эксперимента к стационарному росту.

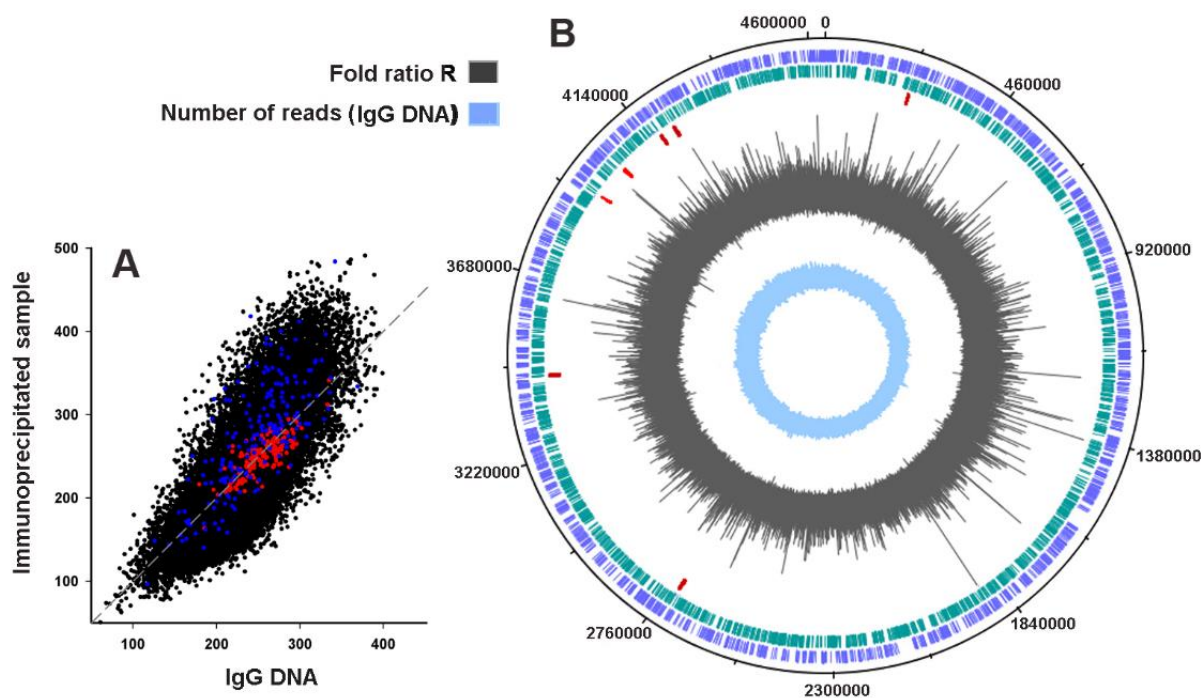


Рис. 55. Профиль распределения Dps на геномной ДНК *E. coli* MG 1655 (второй эксперимент). **А:** Корреляция между числом прочтений, зарегистрированных для опытного и контрольного образцов (суммированы в бине размером 100 п.н.). Красные точки соответствуют генам рибосомных РНК. Голубые точки – бинам, значения R для которых было ≥ 1.4 в первом эксперименте (Рис. 54). Пунктирная линия- биссектриса координатной плоскости. **В:** Профиль сайтов связывания Dps в геноме, рассчитанный по параметру R в «бегущем окне» 25 н.п. (четвёртая окружность). Два внешних кольца - распределение генов на генетической карте по верхней и нижней цепи генома *E. coli* MG 1655. Красные черточки на третьей окружности- позиции оперонов рРНК. Пятая окружность: распределения прочтений, зарегистрированных в библиотеках контрольных образцов, посчитанных в «бегущем окне» размером 35 п.н.

Анализ данных, полученных после второго картирования, осуществляли с использованием параметра R , рассчитанного в «бегущих окнах» разного размера: 25, 35 и 75 п.н. Короткие «окна» позволили получить лучшее соответствие выявленных максимумов в двух экспериментах и лучше соответствовали максимумам, обнаруженным с помощью компьютерной программы CLC GW. При этом использование величины «бегущего окна» равной 35 п.н. дало меньшее число не занятых Dps областей генома. Поэтому данные, полученные с использованием «бегущего окна» размером в 35 п.н., использовали для дальнейшего анализа.

В библиотеке, полученной с использованием программы *Matcher* для первого эксперимента, было идентифицировано только 193 сайта связывания для *Dps*, включая семь протяженных областей, имеющих длину более 5000 п.н. Они содержали гены рибосомных РНК (Рис. 54А, красные точки) и большое число генов, кодирующих тРНК. Эти геномные области имели низкую репрезентативность или отсутствовали вовсе в наборе, полученном с использованием программы *CLC GW*, поскольку прочитанные нуклеотидные последовательности с множественными совпадениями в геноме при поиске игнорировались. Тем не менее, 178 из 193 сайтов (92%), выявленных с использованием алгоритма «*Matcher*», по крайней мере частично перекрываются с пиками, обнаруженными программой *CLC GW*.

Значения параметра *R* для максимумов, выявленных в первом эксперименте, варьировали от 1.52 до 2.56. То есть, масштаб вариаций был довольно узким и примерно одинаковым по всему геному (рис. 54В). Геномные мишени *Dps*, обнаруженные при использовании компьютерного алгоритма «*Matcher*», оказались длиннее, чем те, которые были выявлены с использованием программы *CLC GW* (Рис. 56). Их средний размер, даже при исключении длинных оперонов рРНК, составил 292 п.н. (Рис. 56). Но гистограмма распределения сайтов связывания *Dps* по размеру имела максимум в диапазоне 110 - 130 п.н., что хорошо согласуется с величиной значений, полученных при скрининге с использованием *CLC GW* (100 - 110 п.н.).

Во втором эксперименте, с помощью алгоритма *Matcher* было найдено 1647 мест связывания *Dps*. Это только в 3 раза меньше, чем было обнаружено *CLC GW*. Область вариаций для параметра *R* в локальных максимумах этого эксперимента оказалась намного шире: от 1.67 до 9.63, но диапазон, всё-таки, остался уже, чем характерно для мест связывания факторов транскрипции, для которых *R* может быть на порядок больше. Большая часть мест связывания *Dps*, обнаруженных алгоритмом *Matcher* (83%), перекрывается с пиками, выявленными *CLC GW*, а средняя их длина оказалась равной 195 н.п., что немного меньше, чем размер, оценённый *CLC GW* (214-220 п.н.). Однако

максимум в гистограмме распределения сайтов связывания Dps по размеру при использовании программы Matcher сместился с 160-190 п.н. на 110-130 п.н., совпав с первым экспериментом (Рис. 56). Следовательно, 11-13 витков двойной спирали можно предложить в качестве предварительной оценки размера участка, занятого Dps в природной ДНК, хотя это в два раза длиннее размера определённого *in vitro* в работе [30] с помощью насыщающего титрования.

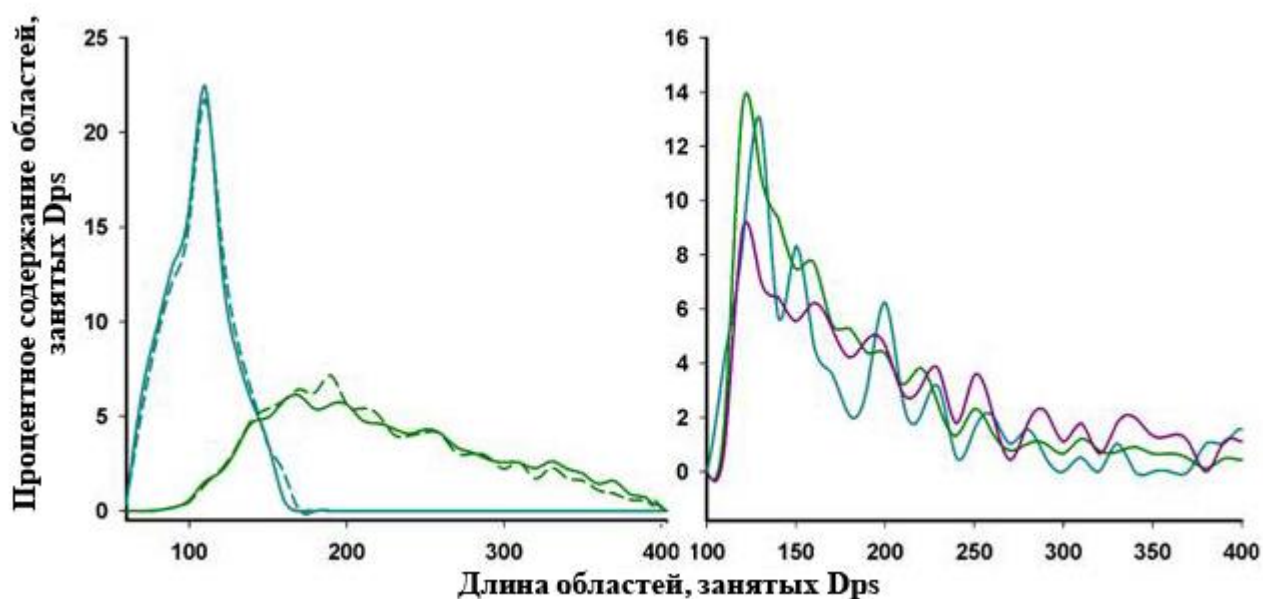


Рис. 56. Гистограммы распределения мест связывания Dps, выявленные CLCGW (слева) и Matcher (справа) для первого и второго экспериментов (голубые и зелёные графики, соответственно). Сплошные и пунктирные линии на левой панели относятся к пикам, полученным с использованием стандартных и строгих критериев, соответственно. Фиолетовый график на правой панели отражает распределение размеров для общего набора CS

Набор мишеней Dps, идентифицированный в обоих экспериментах, содержит 451 геномную область. Он был составлен из 1647 пиков, выявленных во втором эксперименте, из числа которых были удалены участки, не связанные с Dps в первом эксперименте. Использование параметра R практически компенсировало неравномерность в распределении сайтов связывания Dps в начале генома, но выявило их явно предпочтительную локализацию в последней четверти генома, то есть вблизи ориджина репликации (Рис. 52В,

пунктирная линия). Это предполагает формирование наиболее устойчивых комплексов именно в этой области бактериальной хромосомы и не исключено, что наличие тетрад реплицирующихся ДНК вносит определённый вклад в эту селективность. В дальнейшем при анализе полученных данных в экспериментах ChIP-Seq области генома, формирующие общий набор, будут обозначаться как «комбинированный набор» (CS), который сравнивали с 1227 локусами, отобранными по отсутствию контакта с Dps, и обозначенными как «не связанные области» (UR).

3.16 Сайты связывания Dps обогащены инвертированными повторами

Основной задачей ChIP-Seq эксперимента была проверка предположения о том, что повышенное сродство Dps к разветвлённым структурам в ДНК может быть реализовано *in vivo*. Такие разветвлённые структуры с участием двух молекул ДНК в большом количестве формируются при репликации и рекомбинации, а требующие репарации разрывы в ДНК вполне могут стать одноклеточными мишенями для Dps. Однако эти события не синхронизированы во времени и не локализованы в пространстве. Поэтому основная надежда возлагалась на оценку степени перекрытия мест связывания Dps с участками, содержащими прямые и/или инвертированные повторы, которые могут формировать шпилечные структуры за счет альтернативных взаимодействий с соседними комплементарными последовательностями на той же или противоположной цепи ДНК. Шпилечные структуры, образуемые инвертированными повторами, хорошо всем известны, а модель сдвинутой структуры, формирующейся с участием прямых повторов, показан на Рис. 52D.

Распределение прямых повторов размером 5-24 п.н., расположенных друг от друга на расстоянии от 1 до 20 нуклеотидов, и распределение инвертированных повторов длиной 5-18 п.н., удаленных друг от друга на расстояние от 3 до 20 п.н., в геноме *E.coli*, было получено с использованием программы Unipro UGENE [292]. Для того, чтобы оценить степень

перекрывания между множеством этих часто встречающихся элементов бактериального генома с выявленными сайтами связывания Dps, каждая их пара рассматривалась как целостная единица и степень её перекрывания с «комбинированным набором» мишеней Dps (CS) определялась с разрешением в 1 п.н. Перекрывание для каждого типа повторов суммировалось и число общих нуклеотидов сравнивалось с ожидаемой величиной, рассчитанной для случайного перекрывания. Например, бактериальный геном содержит 2993 пентануклеотидов, разделенных тремя парами оснований. Их совместная длина в геноме составляет 38909 п.н. (0.838%). Это предполагает, что 916 п.н. должны попасть в нуклеотидные последовательности набора CS, размер которого 109330 п.н. В реальности, мы выявили 1134 общих пар оснований, что в 1.24 раза превышает ожидаемое значение (Рис. 57). Соотношения K_{ij} (в данном случае $i=5$, $j=3$) использовали как меру отклонения от случайного перекрывания. Проблема заключалась в том, что каждый тип пар надо было анализировать независимо, чтобы вклады гомонуклеотидных повторов не мультиплицировались при одновременном анализе повторов разной длины. В результате полученное выше значение для $K_{5,3}$ дало одну из девяти точек в первый блочный график на левой панели (Рис. 57). Используя такой подход, мы оценили значение K_{ij} для всех пар повторов, но только те, которые имели длину 5-6 п.н. дали достоверные значения. Для более редких длинных повторов значение K_{ij} варьировало в широких пределах из-за небольшого числа перекрывающихся пар оснований (Рис. 55, $i=7$).

Было установлено, что пары инвертированных повторов чаще ожидаемого находятся в нуклеотидных последовательностях сайтов связывания Dps, но реже расчётного обнаруживаются в областях не занятых Dps. Это полностью соответствует нашему предположению и свидетельствует о биологической значимости контакта, первоначально обнаруженного методом атомно-силовой микроскопии с использованием искусственных модельных конструкций.

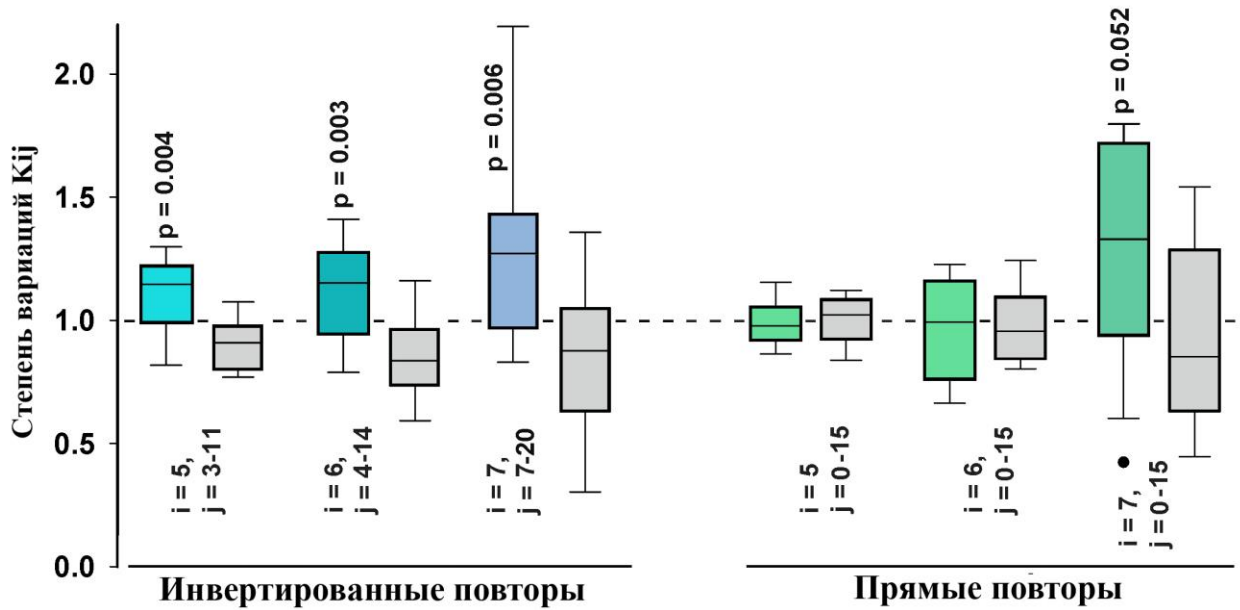


Рис. 57. Распределение показателей перекрытия CS-области (цветные столбики) и UR-области (серые столбики) с областями, содержащими прямые и инвертированные повторы, охарактеризованные с помощью значения K_{ij} . Черными точками обозначены выпавшие значения (Приложение 1).

Ситуация с прямыми повторами оказалась менее ожидаемой. Количество пента- и гексануклеотидов в областях CS и UR варьирует примерно в одинаковом диапазоне и имеет значение K_{ij} , близкое к ожидаемому (Рис. 57, правая панель). Однако количество гептануклеотидов, содержащихся в сайтах связывания Dps, несколько выше контрольного, а превышение лишь немного ниже статистически достоверного значения ($p = 0.056$).

3.17 Структурный белок нуклеоида обладает повышенным сродством к областям генома, содержащим REP-элементы и «промоторные островки»

В геноме *E.coli* существует два типа структурных элементов, для которых установлено повышенное содержание инвертированных повторов. Это REP-элементы (**R**epetitive **E**xtragenic **P**alindromic sequences) [274] и «промоторные островки» [274]. REP-элементы имеют длину около 25-35 п.н. Являясь палиндромами по определению, все REP-элементы могут формировать вторичные структуры. Кроме этого, они обычно присутствуют в виде

нескольких копий в одном генетическом локусе [274] и соседние копии всегда находятся в инвертированной ориентации, что способствует формированию протяжённых шпилечных структур. В работе было проанализировано перекрывание областей CS и UR со всеми 355 геномными локусами, содержащими REP-элементы, аннотированные в хромосоме *E.coli* [331]. Явно повышенная степень перекрывания с набором CS была выявлена для 302 нуклеотидных последовательностей с REP-элементами, содержащими их в количестве 1-3 копий (Рис. 58). Число REP-элементов в наборе UR было, наоборот, ниже нормы (Рис. 59). REP-элементы, таким образом, можно считать мишенями для взаимодействия с Dps.

«Промоторные островки» имеют высокую плотность близко расположенных или перекрывающихся промоторов, ориентированных в обоих направлениях генома [65], что закономерно приводит к появлению в них и прямых и инвертированных повторов. Два набора «промоторных островков» было использовано для сравнения. Первый набор (PIs) содержал 78 областей генома, богатых потенциальными промоторами, обнаруженными с помощью компьютерного алгоритма PlatProm учитывающего только промоторы, распознаваемые σ^{70} -субъединицей РНК-полимеразы [165]. Второй набор был составлен из смешанных «промоторных островков» (MPIs), выявленных с помощью унифицированной версии алгоритма PlatProm, способного обнаруживать промотор-подобные участки на основании их структурных особенностей без учёта информации о нуклеотидной последовательности консервативных элементов, специфически распознаваемых разными σ -факторами [285]. Оба набора сильно перекрывались с участками, занятыми Dps (Рис. 58), причём для набора PIs практически совсем не было обнаружено перекрытия с UR, а перекрытие с CS было максимальным среди всех исследованных областей. Dps, следовательно, обладает высоким сродством к «промоторным островкам» в геномной ДНК.

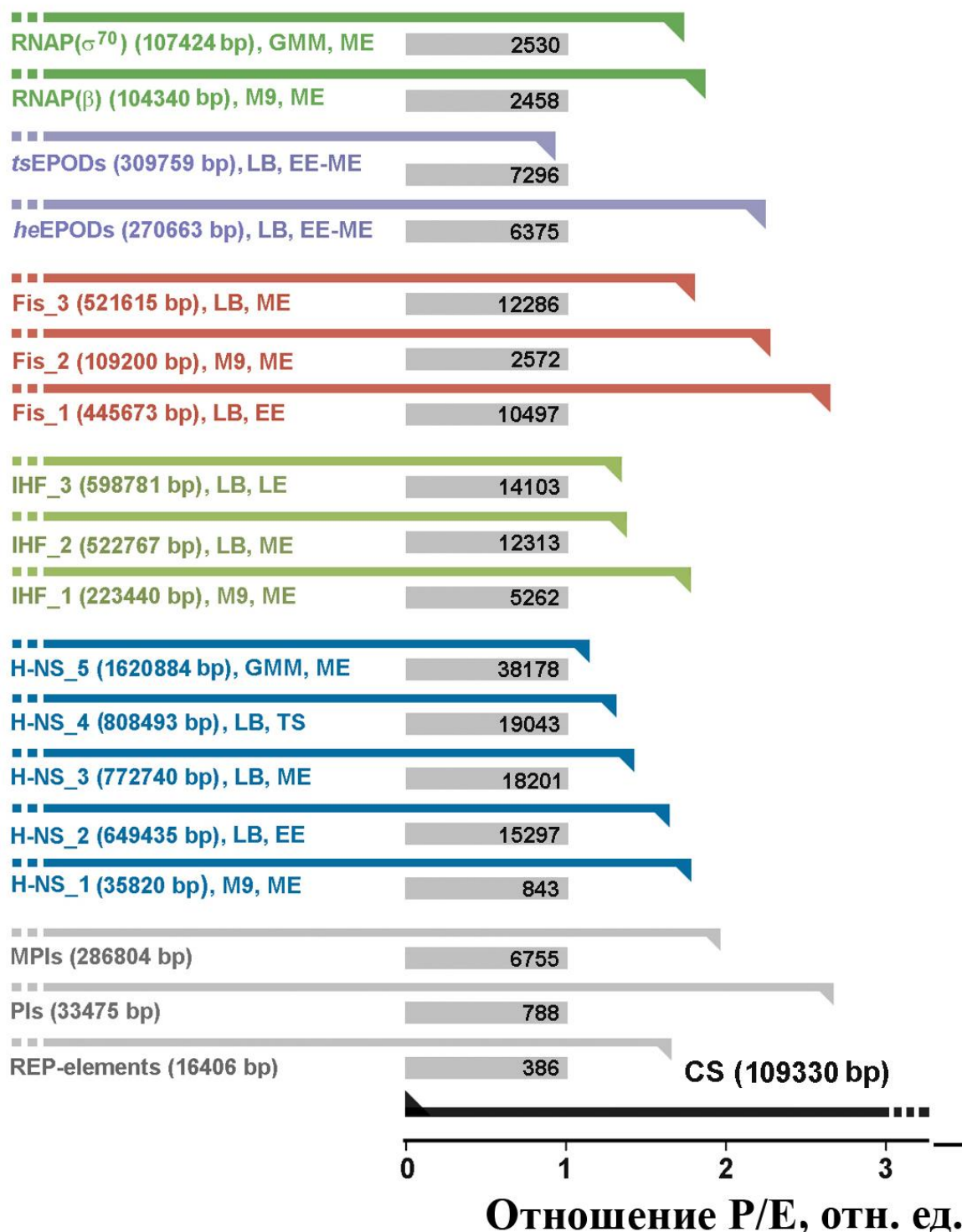


Рис.58. Уровни перекрытия мишеней Dps со структурными и функциональными элементами генома, рассчитанные так же, как описано для прямых и инвертированных повторов и показанные на графике в виде отношения обнаруженного перекрытия **P** (показано изогнутыми серыми и цветными линиями) к ожидаемому значению **E** (схематически показано серыми прямоугольниками). Цифрами указаны размеры каждого из наборов и ожидаемое число общих пар оснований. Черная линия внизу рисунка схематически показывает массив набора CS. (Приложение 1)

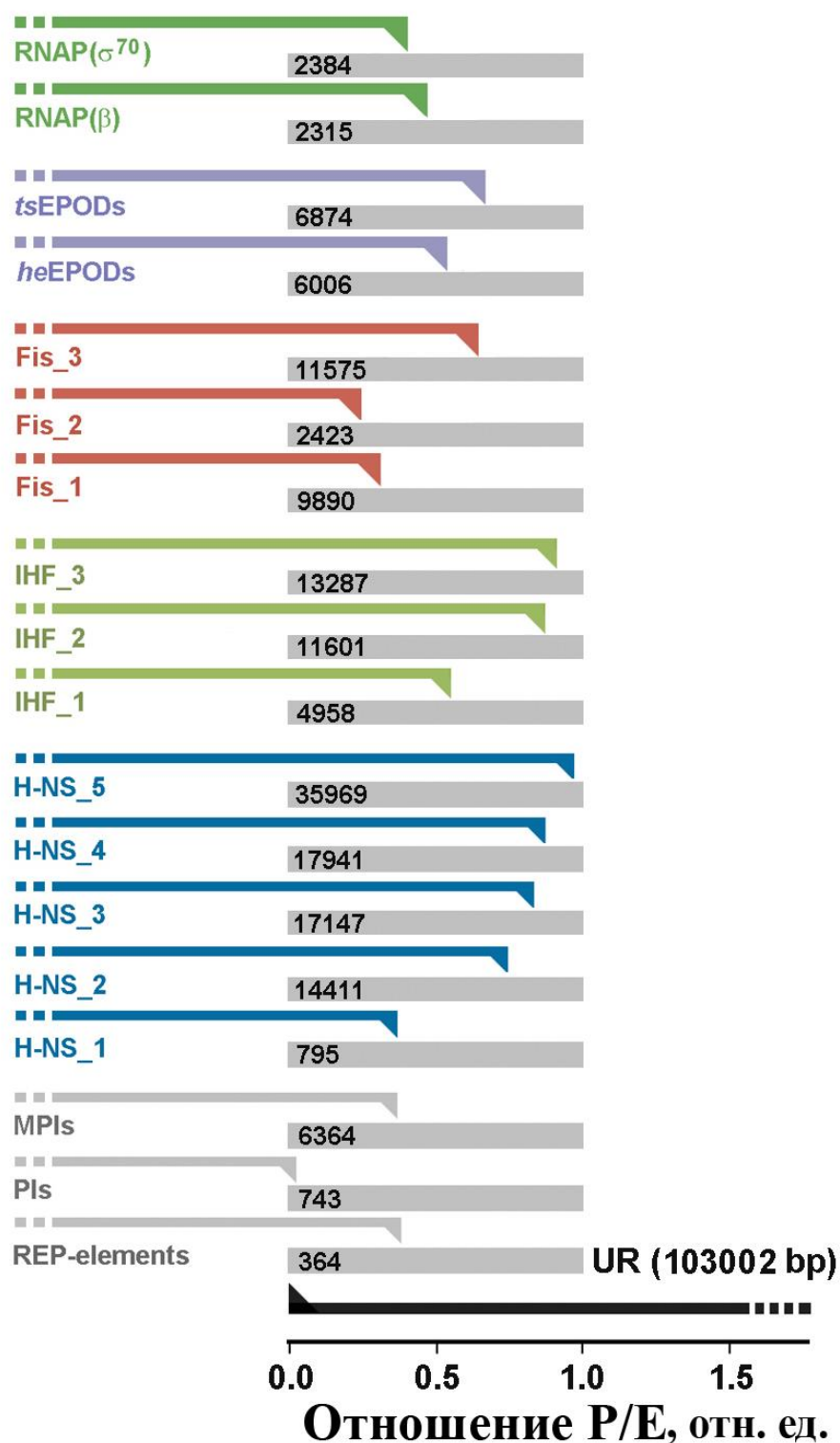


Рис. 59. Уровни перекрытия структурных и функциональных элементов генома с участками ДНК, не взаимодействующими с Dps, рассчитанные так же, как описано для прямых и инвертированных повторов и показанные на графике в виде отношения обнаруженного перекрытия (показано изогнутыми серыми и цветными линиями) к ожидаемому значению (схематически показано серыми прямоугольниками). Цифрами указаны размеры каждого из наборов и ожидаемое число общих пар оснований. Черная линия внизу рисунка схематически показывает массив набора UR. (Приложение 2)

Ранее уже упоминалось, что во время экспоненциального роста порядка 90% областей из набора PIs заняты H-NS [283]. Данные, полученные методом ChIP-Seq, свидетельствуют о том, что ~ 13% «*промоторных островков*» могут находиться в контакте с Dps. Это предполагает возможность их одновременного взаимодействия с двумя белками нуклеоида. Оказалось, что из 57 мест связывания Dps, перекрывающихся с «*промоторными островками*», 54 могут быть также заняты H-NS.

Проведенное картирование с использованием экспериментальных данных, полученных в работах [287, 290] свидетельствуют о том, что в наборе CS есть 181 место связывания Dps, каждое из которых может быть мишенью для H-NS. Их максимальное количество было выявлено для клеток, выращенных на минеральной среде M-9 и собранных во время экспоненциальной фазы роста (Рис. 58) [224]. При переходе к стационарному росту, степень перекрывания мест связывания H-NS и Dps уменьшается (Рис. 58). Количество совпадений для областей связывания Dps, содержащихся в наборе CS, с сайтами связывания белка IHF носит аналогичный характер. Всего в Cs обнаружено 177 областей с зарегистрированными в работах [290] местами взаимодействия с IHF и 91 из них (51%) может также связываться H-NS. Было установлено, что максимальное количество общих сайтов связывания Dps имеет с белком Fis. Такой результат является ожидаемым, так как Fis и Dps являются наиболее представленными белками бактериального нуклеоида в клетках во время экспоненциальной и стационарной фазы роста, соответственно. При этом Fis играет роль ингибитора конденсации бактериальной ДНК во время экспоненциального роста [332], то есть, в некотором смысле, роль «антагониста» Dps. Около 230 сайтов связывания Dps перекрываются с областями ДНК, контактирующими с Fis, при этом 63 области из этого набора могут взаимодействовать со всеми четырьмя белками нуклеоида, рассмотренными в данном разделе (H-NS, IHF, Fis и Dps). Таким образом, можно сделать вывод о том, что Dps имеет общие сайты связывания, по меньшей мере, с тремя структурными белками бактериального нуклеоида.

3.18 Нуклеотидные последовательности, которыми обогащены сайты связывания Dps, обладают общим мотивом с консенсусами других белков нуклеоида

Перекрытие областей генома, занятых Dps, с сайтами связывания других белков нуклеоида в значительной степени осложняет идентификацию его специфических мотивов. Предварительный поиск наиболее часто встречающихся нуклеотидных последовательностей был проведен с использованием набора компьютерных программ MEME [61] в 326 наиболее коротких областях из набора CS (общий размер - 49702 п.н., т.е., менее чем 50000 п.н., который предусмотрен программным обеспечением). Пакет программ, интегрированных в MEME-chip [284], запускался в дискриминационном режиме с использованием набора из 739 наиболее коротких нуклеотидных последовательностей из области UR (общий размер - 49011 п.н.). В результате было выявлено 3 доминирующих мотива: T(G/A)A(t/c)A, TA(c/t/g)(T/A), TT(T/a)(g/a), величина показателя достоверности для которых (E) варьировала в диапазоне: 4.6×10^{-22} - 1.0×10^{-11} . Кроме этого, была обнаружена одна длинная последовательность: (t/c)(g/c)(t/c)AGGCC(g/t)GATAAG(g/a)CG, хотя она присутствовала только в десяти областях. Пакет программ DMINDA [294] предсказал больше потенциальных кандидатов в виде консенсусов, рассортированных по подобию нуклеотидных последовательностей. Однако большинство из них содержало A/T-богатые мотивы, характерные для белков бактериального нуклеоида, таких как H-NS (консенсус: (a/g)ATA(A/t)(t/a) [289] или (T/g/c)(C/g/a)G(A/t)T(A/T)a(A/t)(t/a)t [316]), Fis (tG-t(g/t)(a/g)tTTTTT(c/g/a)-Ca [289]), IHF ((t/c)-(A/T)—(g/c)(t/c)-(A/t)(T/a)(t/a)(t/a) [291]) и других факторов транскрипции. Например, мотив TGAT является частью последовательности, распознаваемой Fis, а также FNR (aaa-tGAt-ta-(a/g)TCAAtta(a/t)t [224] или tGAt - aTCAa [290]). Несмотря на то, что во время экспоненциального роста FNR имеет мало сайтов связывания в геноме, степень их перекрытия с мишенями Dps по данным

[305] оказалась в 2-3 раза больше случайного уровня. Поэтому 336 геномных областей, взаимодействие которых с другими структурными белками нуклеоида уже установлено, были удалены из набора CS, а оставшиеся 115 областей, контактирующие с Dps и имеющие среднюю длину 207 п.н., были использованы для дальнейшего анализа нуклеотидной последовательности. В этом случае наиболее вероятный мотив, выявленный с использованием пакета программ MEME, имел вид (t/c)GATA ($E = 4.8e-007$), в то время как с использованием программы DMINDA было сформировано шесть групп с более длинными консенсусными последовательностями, которые включают: TG(G/a)(T/c)GAT ($E = 4.7e-025$), CTG(A/G)(T/c)AA ($E = 1.7e-011$), GATA-CG ($E = 3.6e-009$), cgCCTGATGC ($E = 9.9e-009$), C-GGCGAT ($E = 3.2e-007$) и CGATa-CG ($E = 3.6e-006$). Когда 84 области контакта, имеющие хотя бы один из этих мотивов были вновь использованы для поиска консенсусной последовательности. Доминирующим мотивом, обнаруженным программой MEME, стал GATA ($E = 1,0e-007$), тогда как с помощью DMINDA был выявлен мотив TG-tGAT как наиболее статистически достоверный ($E = 4.6e-018$). Таким образом, присутствие перепредставленных мотивов в областях связывания Dps нельзя игнорировать, и они могут быть важны для взаимодействия с ним. Однако отсутствие типичного ДНК-связывающего модуля в белке Dps, а также наличие выявленных мотивов в сайтах, распознаваемых другими белками бактериального нуклеоида и факторами транскрипции, не позволяют исключить возможность того, что наличие выявленных мотивов обусловлено предпочтительным взаимодействием Dps с участками ДНК, занятых другими белками нуклеоида.

3.19 Отсутствие молекул Dps в бактериальной клетке по-разному влияет на экспрессию генов

Большее половины выявленных сайтов связывания Dps с ДНК расположены внутри кодирующих частей генов. Оставшиеся - ассоциированы с

промоторами и/или терминаторами, в которых повторяющиеся последовательности выступают в роли компонентов связывающих модулей для факторов транскрипции, или являются стоп-сигналами транскрипции. Эти мишени включают 66 сайтов, расположенных между дивергентно транскрибируемыми генами и 33 сайта в промежутке между конвергентно транскрибируемыми генами. В бактериальном геноме содержится одинаковое число участков ДНК, разделяющих конвергентные и дивергентные гены. Обнаруженная диспропорция может свидетельствовать об участии Dps в регуляции транскрипции. Она объясняет перекрывание большого числа сайтов связывания РНК-полимеразы и Dps (Рис.58), и, наоборот, их меньшего перекрывания набором UR (Рис. 59). Ещё один аргумент в пользу регуляторной функции Dps был получен в результате анализа двух типов геномных доменов с высоким содержанием белков. Такого типа геномные домены называются EPOD (**E**xtensive **P**rotein **O**ccupancy **D**omains – домены ДНК, обильно заселенные белками). Они были выявлены без использования специфических антител и классифицированы авторами [288] на две функциональные группы: *he* (highly expressed) - высоко экспрессированные и *ts* (transcriptionally silent) - транскрипционно не активные. Оказалось, что Dps имеет избыточные области контакта только в *he*-EPODs (Рис.58). Поэтому было проведено тестирование способности Dps оказывать воздействие на эффективность экспрессии ряда генов с использованием клеток, в которых был делетирован ген *dps*.

Наиболее показательными в этом отношении являются гены рибосомных оперонов, для которых в двух экспериментах ChIP-seq была обнаружена принципиальная разница во взаимодействии с Dps. Поскольку результаты двух экспериментов ChIP-seq выявили принципиальные различия во взаимодействии Dps с рибосомными оперонами, было целесообразно проверить зависимость их экспрессии от присутствия Dps. Однако присутствие семи копий генов рРНК значительно осложняет интерпретацию данных, поэтому в качестве представителей генов, входящих в рибосомальный оперон, были использованы *rpoA* и *rpoB*, кодирующие α - и β -субъединицы РНК-полимеразы. На Рис. 56А

приведены профили областей контактов Dps в области гена *rpoB*. Существует три оперона рибосомальных генов. Результаты первого эксперимента свидетельствуют о том, что они полностью заняты молекулами Dps, включая кодирующую часть гена *rpoB*, тогда как во втором эксперименте в этой области сигнал не превышал уровень порогового значения контрольных образцов ($R \approx 1.0$) и даже находился ниже его значения для внутренней области оперона *rrsB*. Аналогичный результат был получен для *rpoA*, который транскрибируется в составе полицистрона *rpsMKD-rpoA-rplQ* (Рис. 57А).

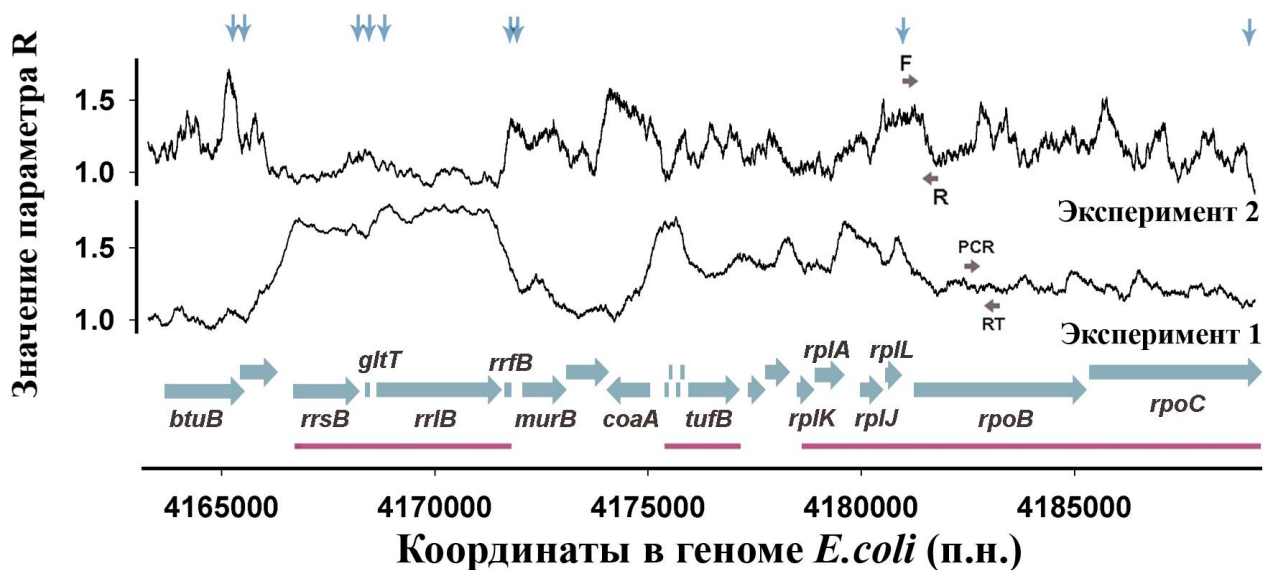


Рис. 60. Профиль распределения сайтов связывания Dps, зарегистрированных в двух экспериментах для геномной области с тремя оперонами рибосомных генов. Голубые горизонтальные стрелки - гены; фиолетовые линии - рибосомные опероны. Вертикальные стрелки - позиции инвертированных повторов. Горизонтальные серые стрелки - позиции праймеров, использованных для амплификации и qRT-PCR.

В первом эксперименте оперон, содержащий ген *rpoA*, и соседний оперон, состоящий из генов *rplNXE-rpsNH-rplFR-rpsE-rpmD-rplO-secY-rpmJ*, были достаточно плотно заняты молекулами Dps (Рис. 57В). Однако во втором эксперименте значения коэффициента R для этой области лишь немного превышали аналогичные значения для контрольного образца, а в области гена *rpoA* имели меньшую величину (Рис. 57В).

На Рис. 60 это переключение показано на примере одного из семи оперонов рибосомных РНК *rrsB-gltT-rrlB-rrfB*, который включает гены 16S-рРНК, транспортной РНК GltT, 23S-рРНК и 5S-рРНК. Остальные шесть оперонов имеют вариации по наличию тРНК и количеству 5S-рРНК, но профили их взаимодействия с Dps очень похожи. Кроме этого, рядом с опероном *rrsB-gltT-rrlB-rrfB* находятся два оперона с генами, кодирующими тРНК и белки аппарата трансляции и транскрипции. Это *thrU-tyrU-glyT-thrT-tufB*, включающий 4 гена транспортных РНК и *tufB*, кодирующий фактор элонгации Tu, и оперон с четырьмя генами рибосомных белков и двумя генами (*rpoB* и *rpoC*), кодирующими большие субъединицы РНК-полимеразы. Результаты первого эксперимента свидетельствуют о том, что все гены аппарата трансляции, включая промоторные области генов *rpoB-rpoC*, полностью покрыты Dps (параметр $R \geq 1.5$, Рис. 60), тогда как во втором эксперименте для оперонов *rrsB* и *tufB* сигнал не превышал уровень порогового значения контрольных образцов ($R \approx 1.0$) и даже находился ниже его для внутренней области оперона *rrsB*.

Аналогичный результат был получен для гена *rpoA*, который кодирует α -субъединицу РНК-полимеразы и транскрибируется в составе полицистрона *rpsMKD-rpoA-rplQ* (Рис. 61). В первом эксперименте оперон, содержащий ген *rpoA*, и соседний оперон, состоящий из генов *rplNXE-rpsNH-rplFR-rpsE-rpmD-rplO-secY-rpmJ*, был достаточно плотно занят молекулами Dps. Однако во втором эксперименте значения коэффициента R для этой области лишь немного превышали аналогичные значения для контрольного образца, а в области гена *rpoA* имели меньшую величину (Рис. 61).

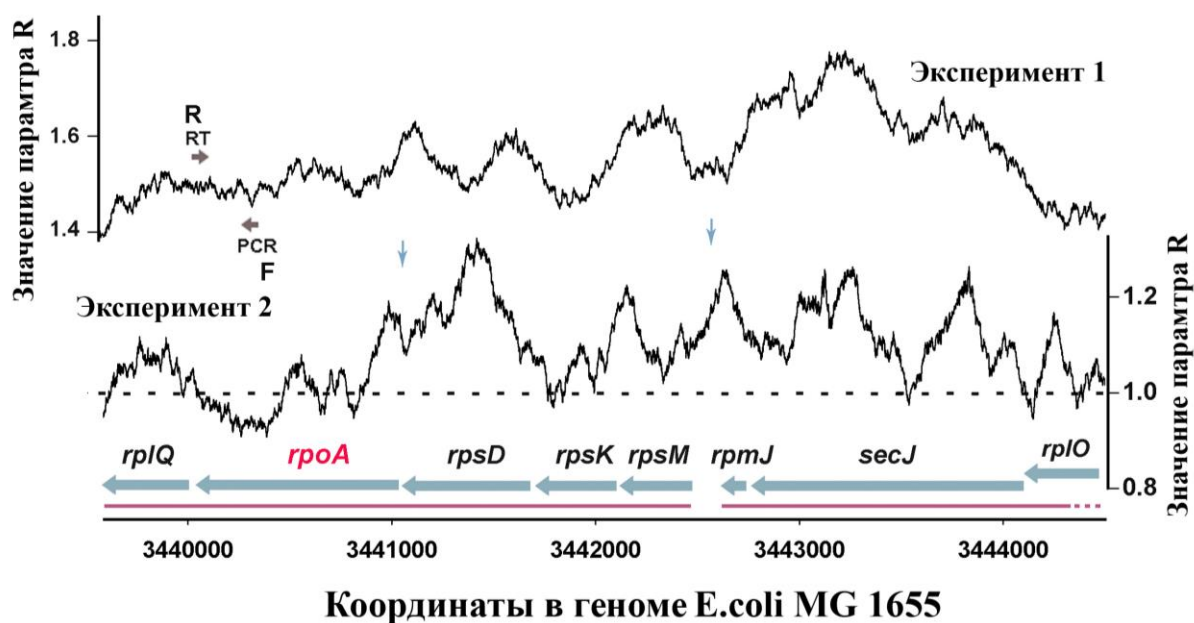


Рис. 61. Профиль распределения сайтов связывания Dps, зарегистрированных в двух экспериментах для геномной области с двумя оперонами рибосомных белков. Голубые горизонтальные стрелки - гены; фиолетовые линии - рибосомные опероны. Вертикальные стрелки - позиции инвертированных повторов. Горизонтальные серые стрелки - позиции праймеров, использованных для амплификации и qRT-PCR.

Стало ясно, что Dps может принимать участие в ремоделировании хроматина даже до достижения стационарной фазы роста и принципиально важным стало получение ответа на вопрос, влияет ли это ремоделирование на эффективность экспрессии рибосомных оперонов, и, если влияет, то каким образом. Стало также ясно, что имеется некоторая общность в опосредованном Dps ремоделировании хроматина для генов аппаратов трансляции и транскрипции. Так как присутствие семи копий оперонов рРНК в бактериальном геноме значительно осложняет интерпретацию данных, появилась возможность использовать *rpoA* и *rpoB*, кодирующие α - и β -субъединицы РНК-полимеразы в качестве представителей генов с изменяемым взаимодействием с Dps. В качестве одного из референсных продуктов для экспрессионного анализа была использована мРНК гена, транскрибируемая из области, практически не занятой Dps в обоих экспериментах Chip-Seq (Рис. 62).

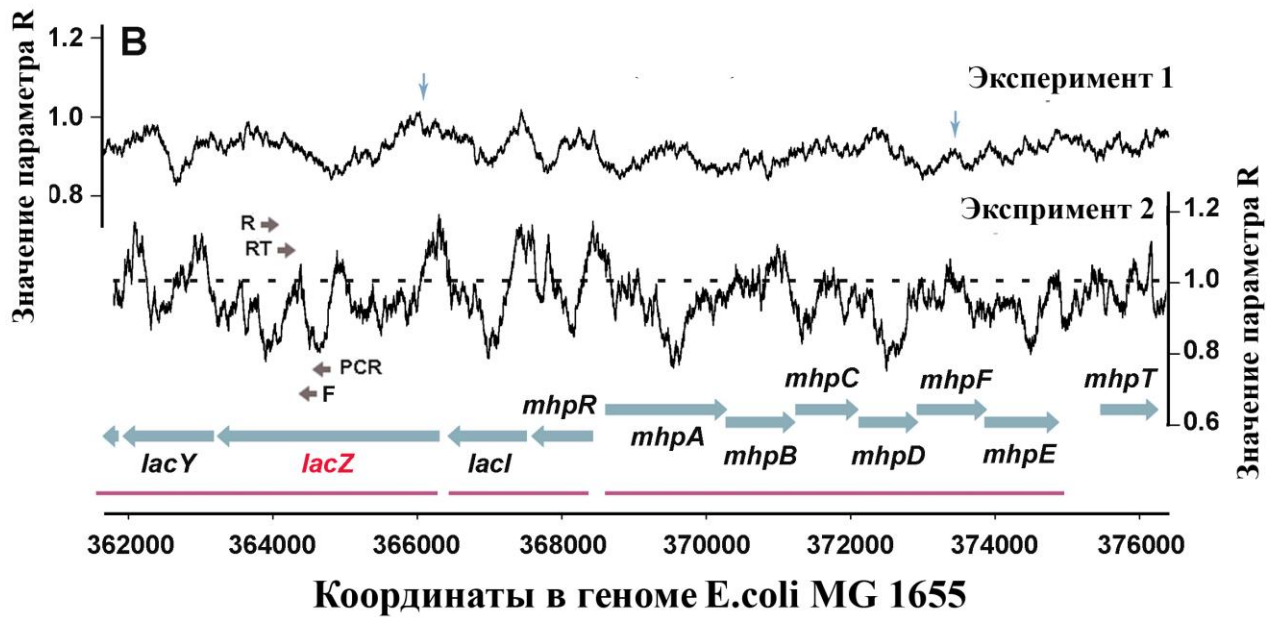


Рис. 62. Профиль распределения сайтов связывания Dps, зарегистрированных в двух экспериментах для геномной области с оперонами *lacZYA*, *mhpR-lacI* и *mhpABCD FE*. Голубые горизонтальные стрелки - гены; фиолетовые линии - опероны. Вертикальные стрелки - позиции инвертированных повторов. Горизонтальные серые стрелки - позиции праймеров, использованных для амплификации и qRT-PCR

Анализ профилей распределения Dps в двух экспериментах ChIP-Seq, проиллюстрированных на Рис. 60-62, выявил некоторую корреляцию между локализацией сайтов связывания и расположением инвертированных повторов (голубые вертикальные стрелки). Он также обнаружил близкое к регулярному чередование занятых Dps и свободных сегментов ДНК, прослеживаемое в большинстве участков генома за исключением генов рибосомных РНК. Аналогично нуклеосомному коду, эта периодичность может иметь значение для поддержания оптимальной конформации активного хроматина и его быстрого ремоделирования в условиях стресса и, по-видимому, заслуживает более детального исследования в дальнейшем.

Способность Dps связываться с выбранными участками ДНК была подтверждена для фрагментов, амплифицированных из нуклеотидных последовательностей генов *groA* и *groB* (Рис. 63А) В этих экспериментах в качестве положительного контроля был использован ранее исследованный фрагмент регуляторной области гена *dpsS*. Полученные результаты

подтверждают разное сродство Dps к разным фрагментам генома, но однозначной корреляции данных, полученных *in vitro* и *in vivo*, зарегистрировано не было. Фрагмент кодирующей части гена *lacZ*, например, который не взаимодействует с Dps *in vivo* (Рис. 62), при четырехкратном избытке белка проявлял хорошо детектируемую способность связываться с Dps *in vitro* (Рис. 63А). Возможно, это является ещё одним свидетельством того, что важным фактором, определяющим взаимодействие Dps с геномной ДНК является присутствие других белков нуклеоида, или каких-то других компонентов микро- и макроокружения.

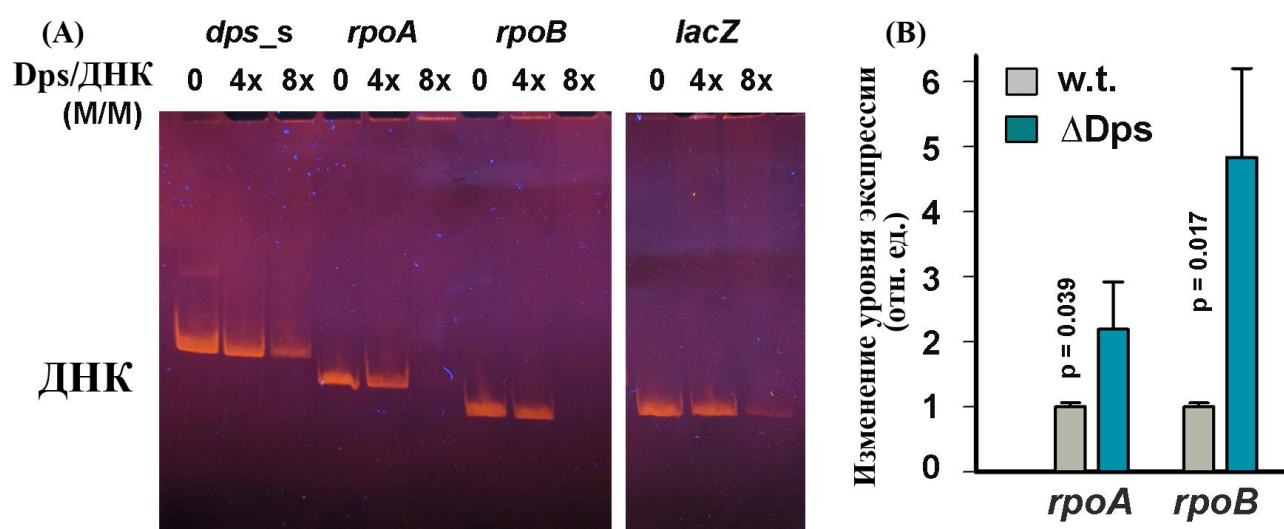


Рис. 63. *In vitro* Dps взаимодействует с фрагментами генов *rpoA*, *rpoB* и *lacZ* (А), а его удаление из клеток влияет на экспрессию *rpoA* и *rpoB* (В). Уровни экспрессии оценивались на основе 3 и 5 биологических образцов для *rpoA* и *rpoD* соответственно. Фрагмент кодирующей области гена *lacZ* был использован в качестве референсного продукта. Статистическое значение изменений эффективности экспрессии генов оценивали с использованием t-критерия Стьюдента. (Данные получены совместно с М.Н. Тутукиной).

Как и ожидалось, удаление гена *dps* оказало аналогичное влияние на экспрессию генов *rpoA* и *rpoB* (Рис. 63В). В обоих случаях, в делеционном мутанте было зарегистрировано больше мРНК *rpoA* и *rpoB*, что предполагает негативное влияние Dps на их экспрессию. Этот результат, по-видимому, можно экстраполировать на остальные рибосомальные гены, что позволяет объяснить сам факт различий двух экспериментов небольшим смещением бактериальной культуры в первом эксперименте к стационарному росту.

Степень вариабельности в количестве целевых РНК тоже оказалась относительно высокой. В одном из 5 экспериментов уровень экспрессии *groV* не менялся в мутантном штамме, что тоже указывает на нестабильное взаимодействие Dps с рибосомными оперонами.

Профиль распределения сайтов связывания Dps вблизи его собственного гена в двух экспериментах оказался схожим (Рис. 64А). Он подтверждает взаимодействие Dps с промоторной областью гена *dps in vivo*, которое на протяжении всей работы неоднократно было зарегистрировано *in vitro* (Рис. 34 и пр.). Для проверки способности Dps влиять на экспрессию собственного гена, область ДНК, содержащая всю промоторную область этого гена, включая все экспериментально-проверенные промоторы [224, 287], выявленные *in silico*, была встроена в плазмиду pET28b-eGFP перед геном *gfp* (Рис. 64В).

Удаление гена *dps* не влияло на флуоресценцию контрольных клеток, трансформированных плазмидой с беспромоторным геном *gfp*, но привело к снижению интенсивности флуоресценции клеток, трансформированных промотор-содержащей плазмидой в 1.5 раза (с 211.1 ± 21.8 до 140.5 ± 16.7 относительных единиц). Аналогичный эффект наблюдался и в случае исследований с помощью qRT-PCR для экспоненциально растущих клеток (Рис.64D).

Промоторная область *dps* имеет два участка первичных контактов с Dps, выявленных с помощью футпринтинга (Рис. 35). Один из этих участков расположен в области с 65 по 120 пар нуклеотидов выше промотора P_{dps} и содержит сайт связывания для белка-активатора ИФ. Эта зона соседствует с областью контакта для репрессора Fis (92-104 п.н. и 19-33 п.н. от P_{dps} , соответственно [324]). Другой участок (216-281 п.н. от P_{dps}) имеет в центре инвертированный повтор длиной 30 н.о. (Рис. 64А и 64В).

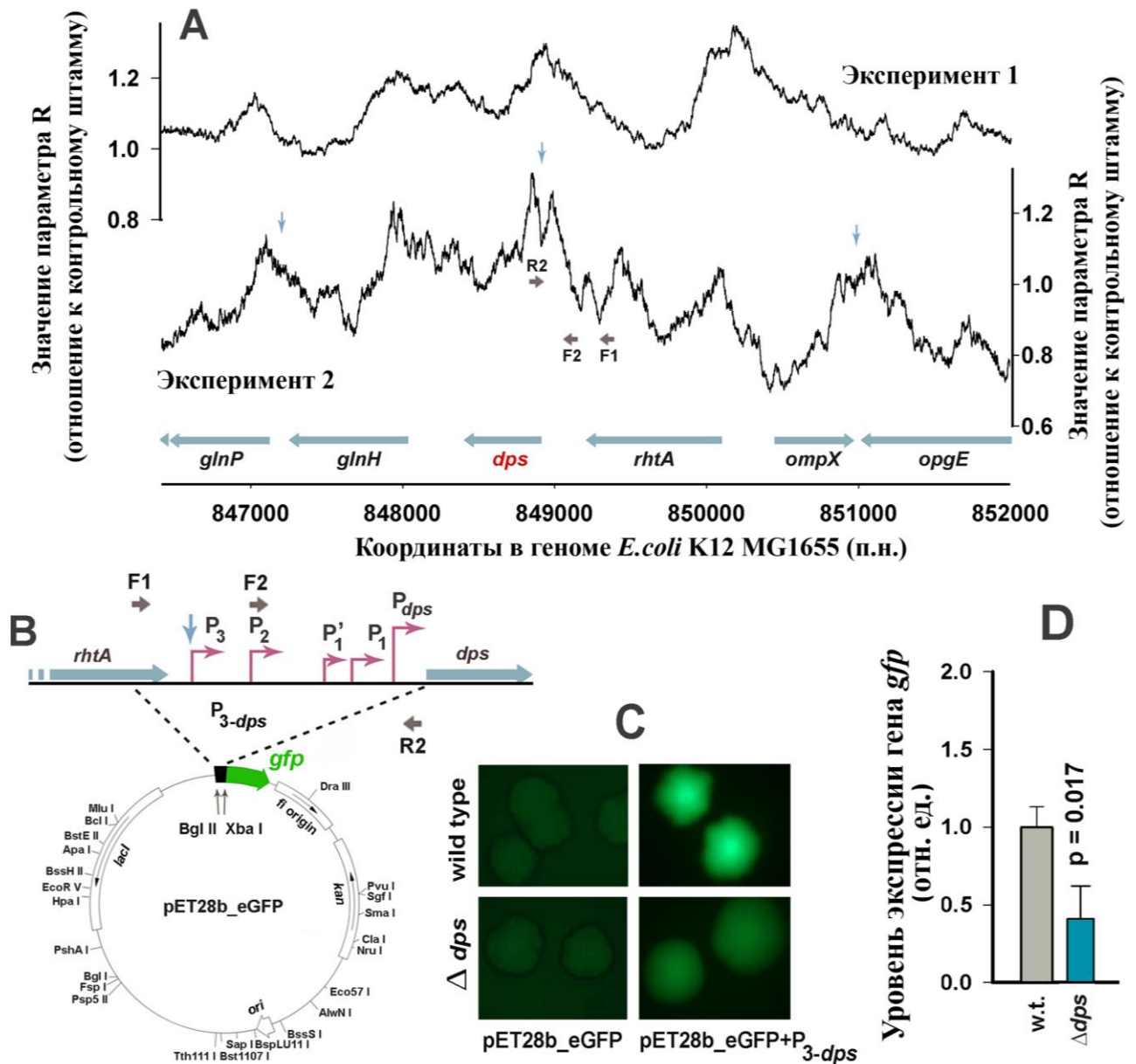


Рис. 64. Исследование авторегуляции гена *dpsA*: Профили сайтов связывания Dps в двух экспериментах для локуса, содержащего ген *dps*. Голубые горизонтальные стрелки - гены. Вертикальные стрелки - расположение инвертированных повторов длиной более чем 7 п.н. (голубые стрелки). **B**: Схема репортерного вектора pET28b-eGFP, содержащего вставку промоторной области *dps*. **C**: Фотография колоний клеток *E. coli* MG 1655, трансформированных плазмидой pET28b-eGFP, имеющей или нет промоторную вставку. **D**: Изменения эффективности экспрессии *gfp* в зависимости от делеции *dps*. Вертикальные черточки отражают величину стандартной ошибки. (Данные получены совместно с У.С. Швыревой)

Ослабление конкуренции с Fis в области расположения первого сайта связывания может объяснить ингибирующий эффект, вызываемый делецией *dps* (рис. 64D). Но его нельзя считать прямым регуляторным эффектом,

осуществляемым Dps. С другой стороны, утрата Dps как белка, связывающегося с инвертированным повтором, может нарушить топологическое состояние всей промоторной области. Это можно рассматривать, как прямое регуляторное воздействие, хотя оно нуждается в прямом доказательстве. Таким образом, данные, представленные на Рис. 63 и 64, являются весомыми указаниями на регуляторный потенциал Dps, а промоторную область *dps* можно рассматривать в качестве удобной модели для дальнейших исследований этого потенциала.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Белок Dps является основным архитектурным фактором бактериального нуклеоида, обеспечивающим его конденсацию на стационарной фазе роста и защищающим ДНК от воздействия различных стрессовых факторов. Это означает, что понимание механизмов, лежащих в основе его взаимодействия с ДНК, представляет собой важную фундаментальную задачу. Считается, что ключевая роль во взаимодействии Dps с ДНК принадлежит остаткам лизина в позициях 5, 8, 10 и 18 N-концевого модуля каждой из 12-ти субъединиц белка [30]. Его способность окислять и накапливать ионы металлов, в частности железа, дает возможность рассматривать Dps как перспективный гибридный контейнер наноразмерного диапазона.

Все использованные в работе фрагменты ДНК связывались с Dps, но эффективность этого взаимодействия оказалась разной, хотя Dps не содержит в своей структуре классических ДНК-связывающих модулей, способных дифференциально распознавать конкретные нуклеотидные последовательности. При изучении нуклеопротеидных комплексов Dps с использованием атомно-силовой микроскопии было выявлено два новых способа взаимодействия: с концевыми участками линейной ДНК и с точкой ветвления искусственной молекулы ДНК. При взаимодействии с линейными фрагментами ДНК, полученными в ПЦР (Рис. 39), или с плазмидной ДНК (Рис. 47), обработанной никазой, молекулы Dps обычно располагались на концах двойной спирали, либо в области одноцепочечного разрыва. Это соответствует представлению о том, что сродство к денатурированной ДНК у Dps выше, чем к внутренним участкам двойной спирали. Тем не менее, с помощью электрофоретического фракционирования смеси, полученной при самосборке искусственных разветвленных ДНК, было установлено, что Dps ещё эффективнее взаимодействует с триплексами, а не дуплексами (Рис. 46, дорожка 1–3). Анализ образующихся комплексов с помощью АСМ позволил локализовать это взаимодействие в точке ветвления Y-подобных конструкций (Рис. 45). Таким образом, можно сделать вывод, что разветвлённые структуры ДНК и стыки

двуспиральной ДНК с односторонними участками имеют важную особенность, обеспечивающую повышенное сродство к ним Dps. Мы считаем, что этой особенностью является наличие трех ветвей в Y-образной и частично денатурированной ДНК, которые одновременно могут связаться со сгруппированными в триплеты N-концевыми участками мономеров, прилегающих к каждой из четырех вершин додекамера Dps (Рис. 52B). Очевидно, что такое взаимодействие термодинамически более выгодно, чем гистон-подобное связывание двух N-концевых модулей с ДНК.

Способность Dps распознавать разветвленные участки в природной ДНК может иметь значение для репарации односторонних и двусторонних разрывов, а также для разворачивания шпильчатых структур. У *E. coli* в настоящее время известна только одна система, которая распознаёт разветвленные X-подобные структуры Холидея. Такие структуры формируются при рекомбинации и репарации ДНК и устраняются системой из трёх белков: RuvA, RuvB и RuvC [79]. Y-подобные структуры могут формироваться практически в любом сегменте ДНК, содержащем, как минимум два прямых повтора нуклеотидной последовательности [72] (Рис. 52D). В бактериальных геномах существуют тысячи таких мест, включая кассеты CRISPR-Cas систем, принадлежащие бактериальной «иммунной системе» и тандемные сайты связывания факторов транскрипции. В промоторной области самого гена *dps*, например, есть четыре пары коротких прямых нуклеотидных повторов, два из которых перекрываются с первичным сайтом связывания Dps. Структурное состояние областей генома, содержащих тандемные повторы, должно быть под специальным контролем клеточных регуляторных систем. Однако специальных механизмов, эволюционно адаптированных под эти задачи, в настоящее время у бактерий не обнаружено, так что белок Dps можно было бы рассматривать как один из участников данного процесса в клетке. Однако число прямых повторов в сайтах связывания Dps оказалось повышенным только для повторов длиной не менее 7 п.н.. И хотя почти все последовательности набора CS (94%) имеют тандемные повторы, они также присутствуют в 78,6% последовательностях из набора UR.

Это, однако, не исключает биологического значения взаимодействия с ними Dps, так как прямых повторов длиной от 5 до 7 нуклеотидных пар, разделённых спейсером от 0 до 15 п.н. в геноме кишечной палочки очень много – 79258, то есть, в среднем 1 повтор на 59 н.п. Это «насыщение» снижает информативность проведённого количественного анализа, а роль Dps в их распознавании осталось не до конца понятной.

Для инвертированных повторов, наоборот, обнаружено явное превышение числа присутствия в мишенях для Dps. Эта разница для двух типов повторов с перевесом в пользу энергетически более реалистичных симметричных шпилечных структур может служить дополнительным аргументом в пользу структурной специфичности Dps. Число инвертированных повторов длиной от 5 до 7 п.н., разделённых спейсером от 3 до 20 н.п. в геноме меньше – 61614 (один повтор на 75 п.н.). Это увеличило потенциал сравнительного анализа, и в наборе CS оказалось 380 областей (84%), содержащих инвертированные повторы, в то время как в наборе UR их только 54,8%. Мы заметили некоторую корреляцию между расположением инвертированных повторов и пиков в профиле связывания Dps (Рис 54А и 54С), которая свидетельствует об их участии в связывании с Dps. Кроме этого, оба эксперимента по иммунопреципитации хроматина выявили взаимодействие Dps либо непосредственно с *oriC*, либо в его окрестностях (позиции 3925744-3925975). Это важно, так как известно, что Dps может задерживать репликацию путем прямого взаимодействия с инициатором DnaA [292]. Участки генома, связанные с Dps в этой области, содержат множество повторяющихся последовательностей, включая 3 пары инвертированных гептануклеотидов, непосредственно в ориджине (подчёркнуты ниже). Одна пара перекрывается с двумя сайтами связывания IciA (выделены жирным шрифтом): **AGAGATCTGTTCTATTGTGATCTCTTATTAG** (позиция 3925757 на геномной карте). IciA ингибирует репликацию, блокируя расплетение ДНК с помощью DnaA. Другие 4 последовательности могут формировать альтернативные пары: **AGGATCATTAACSTGTGAATGATCGGTGATCCT**, или

GATCATTA ACTGTGAATGATC (позиция 3925844-46), перекрываясь с сайтом связывания DnaA (выделен жирным шрифтом). Вполне вероятно, что инвертированные повторы, образующие шпилечные структуры в ориджине репликации, создают платформу для взаимодействия с суб-молекулярным комплексом Dps-DnaA.

Несмотря на то, что в геноме имеется большое число сайтов связывания Dps, их распределение даже в макро-масштабе не однородно (Рис. 54). Самый оккупированный Dps участок имеет длину около 800 000 п.н.. Он включает ориджин репликации и 6 из 7 оперонов рРНК, для которых зарегистрированы самые большие отличия в двух экспериментах. Эта позиционная аномалия только частично объясняется повышенной копийностью генома рядом с точкой инициации репликации. Поэтому вполне вероятно, что присутствие большого числа молекул Dps в последней четверти генома является биологически значимыми и позволяет быстро его ремоделировать в условиях стресса путем выключения экспрессии рибосомных генов или за счет воздействия на процесс инициации репликации.

Существует один важный аспект комплексообразования Dps с разветвленными структурами ДНК, на который стоит обратить внимание. Если в формировании наиболее прочного комплекса действительно участвует три ветви ДНК, то при таком взаимодействии должно произойти максимальное приближение генетического материала к порам Dps, ведущим во внутреннюю полость белка, содержащую железо (Рис. 52С). В таком случае, даже малейшая утечка токсичных ионов Fe^{2+} может стать опасной для целостности генома. Такую угрозу тем более следует учесть, так как полученные нами данные с использованием XANES-спектроскопии и Мёссбауэровской спектроскопии свидетельствуют о наличии во внутренней полости Dps ионов железа в различном зарядовом состоянии. Причём процентное содержание двухвалентного железа оказалось неожиданно высоким. Не исключено, что помимо защиты ДНК от различных повреждающих агентов и удаления токсичных ионов железа с генома, Dps может участвовать в структурно -

специфическом разрушении нуклеиновых кислот, что может быть особенно актуальным для РНК. Учитывая электростатическую природу взаимодействия Dps с ДНК, нет ни каких причин исключать возможность образования им комплексов и с РНК, оказывая при этом влияние на их функциональные характеристики или просто разрушая их. Любопытно, например, что структуры типа «коралловых рифов», формируемые белком Dps2 *M. Smegmatis*, могут быть разрушены РНКазой А [65]. Если такого типа деструктивное или процессивное взаимодействие Dps с РНК будет доказано, то перечень функций, выполняемых Dps, может быть в значительной степени расширен.

Еще одним важным направлением исследования белка Dps и механизмов формирования нуклеопротеидных комплексов с его участием является возможность насыщать Dps разными металлами и возможность модифицировать его поверхность биологически активными соединениями. Понимание этих механизмов может найти самое широкое применение при создании квантовых точек транзистора, нанобатарей, реакторов для получения гомогенных частиц, а также в медицинских целях. Способность Dps распознавать особенности ДНК позволяет создавать упорядоченные конструкции на их основе с заданным расположением молекул. В рамках данной работы показана возможность проектирования элементарных двумерных самособирающихся структур ДНК и установлена локализация Dps на поверхности таких молекул ДНК. Целенаправленное исследование этих механизмов в перспективе может предоставить возможность создания трёхмерных искусственных нуклеопротеидных конструкций с заданными свойствами.

Во время экспоненциального роста бактериальные клетки содержат, как минимум, 6 000 мономеров Dps, которые относительно равномерно распределены по всему геному [17, 18]. Во время голодания Dps сокристаллизуется с ДНК [61] за счет механизма, который гипотетически не требует какой-либо специфичности белка к структуре или нуклеотидной последовательности. Поэтому, для того, чтобы выявить наличие у Dps

повышенного сродства к какому-либо сайту связывания, были использованы экспоненциально, а не стационарно растущие клетки. С использованием пакета программ CLCGW суммарно в двух экспериментах было выявлено несколько тысяч мишеней для Dps общей протяженностью 1-1,5 млн. п.н., а при картировании с использованием параметра **R** совокупный размер связавшихся последовательностей составил 90000 - 300000 н.п. В экспоненциально растущей культуре на одну клетку приходится 500 - 700 додекамеров Dps. Если один додекамер Dps может связать ~60 п.н. [30], на бактериальной хромосоме будет занято 30000 – 42000 н.п. Если верна наша оценка размера области контакта с Dps, ~120 п.н., то в комплексе с этим белком должно находиться 60 000 - 84 000 н.п. генома. Оба диапазона меньше, чем общий размер сайтов связывания, выявленных двумя методами в обоих экспериментах. Это значит, что в геноме имеется избыток мест связывания Dps, которые могут быть важны для компактизации ДНК. Но для поддержания функциональной целостности хромосомы во время экспоненциального роста Dps использует разные комбинации сайтов связывания в разных клетках.

Большое количество областей взаимодействия Dps с ДНК не является удивительным, так как белки нуклеоида Fis, IHF, H-NS и даже фактор транскрипции FNR (в условиях анаэробного роста) также связывают большое число мест в геноме, в особенности в условиях стресса (500,000-1,600,00 п.н.) [33, 70, 218, 322], что предполагает возможность значительного перекрытия мест контакта этих белков [157]. В результате проведенных экспериментов и расчетов было установлено, что сайты связывания Dps перекрываются с мишенями, как минимум, трех белков нуклеоида, из которых максимальное перекрытие зарегистрировано для мест, занимаемых Fis. Такой результат является в полне ожидаемым, так как считается, что при переходе к стационарному росту Dps замещает Fis, который поддерживает оптимальную структуру нуклеоида во время экспоненциальной фазы роста. Низкий уровень перекрытия с сайтами связывания H-NS, гистонподобного белка, функционирующего как фактор транскрипции или структурный белок [291,

165], был менее ожидаем, так как и H-NS и Dps имеют повышенное сродство к «*промоторным островкам*», т.е. участкам генома с высокой плотностью промотор-подобных мест, часто ассоциированных с чужеродными генами, которых довольно много в геноме. Мы обнаружили, что удаление H-NS значительно активировало транскрипционную активность «*промоторных островков*», а делеция *dps* вызывала дифференциальный эффект среднего масштаба. Не исключено, что избыточное количество сайтов связывания этих двух белков характерно только «*промоторных островков*», где их функциональное взаимодействие необходимо для сохранения экспрессии чужих генов на оптимальном уровне.

Самым неожиданным результатом полногеномного анализа сайтов связывания Dps было обнаружение в них доминирующих мотивов TG-tGAT или GATA. Очевидно, что их присутствие нельзя игнорировать, и они могут быть важны для взаимодействия с Dps. Однако отсутствие типичного ДНК-связывающего домена в белке Dps и наличие выявленных мотивов в сайтах, специфически распознаваемых другими белками бактериального нуклеоида также позволяют предположить, что Dps предпочитает связываться с ДНК вблизи областей, занятых другими белками. С другой стороны, определённый вклад в это доминирование могут вносить REP-элементы. Их много в сайтах связывания Dps, они могут распознаваться по наличию шпилечных структур, но также содержат мотив tGAT, который может «контаминировать» области взаимодействия с Dps. Консенсус REP-элементов: GCC(g/t)GATG-CG(a/g)CG(t/c)-----(g/a)CG(c/t)CTTATC(c/a)GGCCTAC. В нём подчёркнут вырожденный инвертированный повтор. В любом случае, текстуальная специфичность Dps заслуживает специального исследования, целесообразность которого возникла только в результате полногеномного анализа.

Обнаружение зависимости экспрессии трёх генов от присутствия в клетках Dps указывает на его регуляторную функцию. Эта функция уже обсуждалась для этого белка, но «регуляторный» эффект был объяснён изменением доступности промоторных областей для активаторов и/или

ингибиторов транскрипции. В данной работе, опосредованные отсутствием Dps изменения впервые были зарегистрированы на уровне мРНК для клеток экспоненциально растущих культур. С использованием метода репортёрной детекции установлено, что ген *dps* является саморегулируемым, как минимум во время экспоненциального роста (Рис. 61). Из-за относительной стабильности GFP и его мРНК такой вывод пока не может быть сделан для стационарно-растущих клеток. Однако, если эта тенденция сохраняется и во время стационарного роста, сопровождающегося опосредованной Dps конденсацией генома, то это создавало серьезную проблему в понимании механизмов его выхода из состояния гетерохроматизации при появлении питательных веществ. Поэтому концептуально значимыми оказались результаты тестирования зависимости олигомерного состояния белка от гексуронатов и ионов железа, которые выявили функционирование исследованных сахаров и оксидов железа в качестве лигандов Dps и позволили объяснить глобальные структурные перестройки генома пластичностью контактов, формируемых им с геномной ДНК.

ВЫВОДЫ

1. Предложена и впервые апробирована методика подготовки образцов, содержащих молекулы белка Dps для регистрации XANES-спектров в сверхвысоковакуумных условиях, неразрушающих его олигомеры.

2. Установлено, что неорганическое ядро белка Dps содержит атомы железа как в трехвалентном, так и в двухвалентном состояниях, причем в тетра- и октаэдрическом окружении атомами кислорода.

3. Доказано, что присутствие ионов двухвалентного железа способствует процессу формирования додекамерной формы Dps, что, согласно проведенным нами модельным экспериментам, может быть вызвано образованием дополнительных межсубъединичных контактов с участием оксидов железа: наблюдаемая олигомеризация не опосредована изменением ионной силы раствора.

4. Показано влияние клеточных компонентов сахарной природы (D-галактуронат и D-глюкуронат) на процесс олигомеризации Dps и формирование нуклеопроteidных комплексов с его участием. Следовательно, D-галактуронат и D-глюкуронат могут играть роль кофакторов Dps, модулирующих его ДНК-связывающую активность.

5. Выявлено не одинаковое сродство Dps к фрагментам ДНК различного нуклеотидного состава и охарактеризованы два новых способа взаимодействия Dps с линейными и разветвленными участками ДНК.

6. Результаты оценки термодинамических параметров комплексов, сформированных белком Dps с линейными и разветвленными фрагментами ДНК, доказывают его большее сродство к разветвленным структурам ДНК.

7. Спроектированы элементарные, самособирающиеся Y-подобные конструкции ДНК наноразмерного диапазона (20-60 нм), обеспечивающие управляемую иммобилизацию молекул Dps в структуре нуклеопроteidного комплекса для решения различных прикладных задач.

8. Проведен полногеномный поиск сайтов связывания Dps, в результате которого выявлено их неслучайное распределение по бактериальной хромосоме

на экспоненциальной фазе роста *E.coli* и предложены механизмы, лежащие в основе компактизации бактериальной ДНК в зависимости от условий микро- и макроокружения.

9. Показано, что белок Dps способен взаимодействовать с областями генома, формирующими вторичные структуры, в том числе с REP-элементами и «*промоторными островками*», что подтверждает его сродство к разветвлённым структурам в ДНК.

10. Сайты связывания Dps перекрываются с местами взаимодействия других структурных белков нуклеоида. Максимальное перекрывание обнаружено для белка Fis, заменяющего Dps на бактериальной хромосоме при переходе клеток к фазе активного роста. Структурно-функциональная организация генома, следовательно, может контролироваться разными белками с использованием одних и тех же мест связывания.

11. Обоснованно предположение о том, что белок Dps участвует в регуляции экспрессии генов, которая может быть опосредована интерференцией с РНК-полимеразой или белками, ингибирующими транскрипцию.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Характеристики комбинированного набора (CS), составленного на основе пиков, выявленных во втором эксперименте в результате скрининга с использованием программы Matcher и совпавшие с данными первого эксперимента (поиск с использованием программ CLC GW или Matcher)

Левая граница соответствует первой позиции в области максимума с $R \geq 1,5$					
Правая граница соответствует последней позиции максимума с $R \geq 1.5$ плюс 49 п.н. (длина прочтения)					
Коды для функциональных спецификаций					
g	кодирующие области генов или оперонов				
p	промоторные области или 5'-UTR				
t	3'-UTR или терминаторы транскрипции				
(div)	межгенное пространство между дивергентно транскрибируемыми генами				
(con)	межгенное пространство между конвергентно транскрибируемыми генами				
Общее количество максимумов	451		Количество сайтов, перекрывающихся с сайтами связывания H-NS	181	40%
Средняя длина (п.н.)	242		Количество сайтов, перекрывающихся с сайтами связывания Fis	230	51%
Общая длина	109330		Количество сайтов, перекрывающихся с сайтами связывания IHF	177	39%
Количество перекрывающихся сайтов с мишенями, выявленных с использованием программы SELEX	32	7%	Количество сайтов, перекрывающихся с сайтами связывания FNR	26	6%
Общее количество сайтов, перекрывающихся с прямыми повторами ($i=5-7, j=0-15$)	425	94%	Количество сайтов, перекрывающихся с сайтами	69	15%

			связывания heEPODS		
Количество сайтов, перекрывающееся с инвертированными повторами (i=5, j=3-11 + i=6, j=4-14 + i=7, j=7-20)	380	84%	Количество сайтов, перекрывающихся с сайтами связывания tsEPODS	28	6%
Количество сайтов, содержащих REP-элементы	16	4%	Количество сайтов, перекрывающихся с сайтами связывания RNAP	185	41%
Количество сайтов, ассоциированных с 78 «промоторными островками» (Pis)	10	2%	Количество сайтов, перекрывающихся с сайтами связывания σ-субъединицы RNAP	138	31%
Количество сайтов в 434 смешанных промоторных островках (MPIs)	57	13%	Количество сайтов, перекрывающихся с сайтами связывания β-субъединицы RNAP	76	17%

4	ω	ν	ι	Количество		Граница максимумов
				Левая	Правая	
29154	19631	16706	1784			
29595	19774	16852	1948			
442	144	147	165			Длина (п.н.)
2,69	1,87	3,57	2,11			Максимальное значение R
29178	19639	16720	1883			Положения с максимальным значением R
bge	e(conv)	ge(conv)	g			Функциональная принадлежность
+						Перекрытие с мишенями SALEX
+	+		+		i=5	Перекрывание с прямыми повторами
+			+		i=6	
			+		i=7	
+	+	+	+		i=5,j=3-11	Перекрывание с инвертированными повторами
+					i=6,j=4-14	
+					i=7,j=7-20	
						REFs
+						PIs
+						MPIs
					1	Перекрывание с сайтами связывания H-NS (BS)
+					2	
					3	
					4	
+	+	+			5	
	+				1	Перекрывание с Fis BS
	+				2	
+			+		3	
+					1	IHF BS
+					2	
+					3	
					Grainger et al., 2007	FNR BS
					Myers et al., 2013	
					he	EPODs
					ts	
+					σ-субъединица	RNAP
					β	
	TGGGGAT		TGCTGACG		Мотив	Присутствие TG(C/G)(t/c)G(A/g)TG
	3,30E-04		3,60E-04		p-значение	
			TGCTGACG		Мотив	Присутствие TG(g/c/a)TG(c/a)TG
			7,40E-04		p-значение	

48	1826905	1689905	1648137	1473322	1335479	1208267	1157774	1089552
1827091	1690020	1648274	1473479	1335624	1208463	1157937	1089684	
187	116	138	158	146	197	164	133	
2,69	2,28	2,87	2,50	2,41	2,94	2,76	3,01	
1827016	1689953	1648201	1473380	1335503	1208330	1157788	1089576	
bge	g	g	b	eb	g	bge	g	
+	+	+	+	+	+	+	+	
+		+		+	+		+	
TGCCGATC		TGGCGATG	TGGTGATG			CGCTGATG	TGCTGATG	
6,30E-04		5,40E-05	1,20E-05			4,20E-04	2,70E-05	
TACTGCTG		TGGTGTG	TGGTGATG	TGGTCCTG	TGATGATG	TGATGCTG	TGCTGATG	
2,90E-04		1,50E-04	5,00E-05	3,20E-04	8,30E-05	5,00E-05	6,50E-05	

231	3804614	3803916	230	239	238	237	236	235	234	233
	3804807	3804100	3803258	3800125	3798229	3793946	3792446	3792152	3788466	
	194	185	195	404	272	137	490	175	198	
	2,05	2,05	2,19	2,59	2,53	2,04	2,41	2,85	1,95	
3804745	3803984	3803349	3800138	3798297	3794006	3792761	3792178	3788500		
g	g	g	bge	ge(conv)	bg(div)	bge	g	g	g	
+										
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+						
		+	+							
			TGCCGATT	TGGTGAAG	TGGTGGTG	TGGGGATG	TGGGGATG	AGCCGATG	AGCCGATG	
			2,50E-04	1,90E-04	6,20E-05	3,30E-04	3,30E-04	5,90E-04	5,90E-04	
				TGATGATG	TGTTGCTG	TGATGCTA	TGATGCTA	TGATGCAG	TGATGCAG	
				8,30E-05	1,00E-04	9,10E-04	9,10E-04	7,40E-04	7,40E-04	

24 7	3883635	3882210	3867067	3865896	3860343	3853603	3842087	3837003
	3883896	3882434	3867827	3866390	3860735	3854118	3842220	3837472
	262	225	761	495	393	516	134	470
	2,43	2,07	2,82	2,25	2,13	2,30	2,49	3,38
	3883694	3882246	3867756	3866050	3860366	3853883	3842145	3837118
	bg(div)	bge	bg(div)	bge	g	bge	g	g
					+			
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	GGGTGACC		TGGTGGTG		TGCTGAAG	TGCTGACC	TGCAGGTG	
	9,10E-04		6,20E-05		1,90E-04	3,60E-04	7,40E-04	
			TGATGATG	TAGTGCTG	TGCTGAAG	TGATGCTG		
			8,30E-05	2,90E-04	5,90E-04	5,00E-05		

Контрольный набор областей, не обогащенных Dps в двух экспериментах (UR)

Левая граница соответствует первой позиции в области с $R < 0,975$ в обоих экспериментах					
Правая граница соответствует последней позиции в области с $R < 0,975$ в обоих экспериментах					
Общее количество максимумов	1227		Количество сайтов, перекрывающихся с сайтам связывания H-NS	430	35,0%
			Количество сайтов, перекрывающихся с сайтам связывания Fis	139	11,3%
Средняя длина (п.н.)	83,9		Количество сайтов, перекрывающихся с сайтам связывания IHF	221	18,0%
Общая длина	103002		Количество сайтов, перекрывающихся с сайтам связывания FNR	4	0,3%
Количество сайтов, перекрывающихся с прямыми повторами ($i=5-7, j=0-15$)	965	78,6%	Количество сайтов, перекрывающихся с сайтам связывания heEPODS	36	2,9%
Количество сайтов, перекрывающихся с инвертированными повторами ($i=5, j=3-11 + i=6, j=4-14 + i=7, j=7-20$)	673	54,8%	Количество сайтов, перекрывающихся с сайтам связывания tsEPODS	63	5,1%
Количество сайтов, содержащих REP-элементы	5	0,4%	Количество сайтов, перекрывающихся с сайтам связывания RNAP	73	5,9%
Количество сайтов, ассоциированных с 78 «промоторными островками» (Pis)	1	0,1%	Количество сайтов, перекрывающихся с сайтам связывания σ -субъединицей РНКП	42	3,4%
Количество сайтов «промоторных островков» в 434 смешанных областях (MPIs)	37	3,0%	Количество сайтов, перекрывающихся с сайтам связывания β -субъединицей РНКП	32	2,6%

№	1	2	3	4	5	6	7	8	№	Границы
49294	48950	47469	43548	43428	40937	39388	36461	36461	1	Левая
49358	49036	47539	43640	43489	41008	39472	36522	36522	1	Правая
65	87	71	93	62	72	85	62	62	62	Длина (п.н.)
+			+	+						Перекрытие с прямыми повторами
+		+	+			+			i=5	
									i=6	
									i=7	
			+						i=5,j=3-11	
									i=6,j=4-14	
		+							i=7,j=7-20	Перекрытие с инвертированными повторами
									REPs	
									PIs	
									MPIs	
									1	
									+	2
									+	3
									+	4
									+	5
									1	Перекрытие с H-NS BS
									2	
									+	3
									1	Fis BS
									2	
									+	3
									1	IHF BS
				+					2	
				+					3	
									Grainger et al., 2007	FNR BS
									Myers et al., 2013	
									he	EPODs
									ts	
					+				s-70	RNAP
									b	
8	7	6	5	4	3	2	1	1	Мотив	Процентное содержание TG(C/G)(t/c)G(A/g)TG
									p-значение	
									Мотив	Процентное содержание TG(g/c/a)TG(c/a)TG
									p- значение	

34		33		31	30	29	28	27	26	25	24	23
266028	254032	251280	250369	249895	247233	242878	241283	241186	237568	216417	206174	
266088	254092	251352	250429	249969	247296	242947	241448	241249	237633	216482	206269	
61	61	73	61	75	64	70	166	64	66	66	66	96
+	+	+	+				+	+			+	
	+			+								
								+				
34	33	32	31	30	29	28	27	26	25	24	23	

46	45	44	43	42	41	40	39	38	37	36	35
287181	286544	286063	285476	285161	284925	282551	278482	277134	272861	270102	268034
287247	286611	286161	285635	285226	285007	282678	278559	277201	272929	270166	268097
67	68	99	160	66	83	128	78	68	69	65	64
+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+
			+		+		+	+			+
		+	+	+	+	+					
	+	+	+						+		
46	45	44	43	42	41	40	39	38	37	36	35

58	57	56	55	54	53	52	51	50	49	48	47
315744	310500	309604	306949	306213	306046	301816	300851	300650	299828	289127	287766
315946	310575	309668	307023	306272	306108	301902	300914	300765	300045	289194	287860
203	76	65	75	60	63	87	64	116	218	68	95
+						+		+	+	+	+
			+				+		+		+
							+				
	+		+	+			+		+		
	+				+					+	
								+			
58	57	56	55	54	53	52	51	50	49	48	47

94	93	92	91	90	89	88	87	86	85	84	83
391060	386541	385971	382095	381921	381475	372623	371461	367188	364735	364101	359900
391182	386617	386041	382329	382032	381726	372712	371539	367294	364824	364190	359960
123	77	71	235	112	252	90	79	107	90	90	61
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
			+	+		+		+	+		+
+			+		+			+		+	
94	93	92	91	90	89	88	87	86	85	84	83

118	117	116	115	114	113	112	111	110	109	108	107
520640	505937	497526	493527	484992	482416	477078	474635	474277	473257	473068	470845
520714	506028	497594	493596	485051	482529	477138	474696	474337	473324	473134	470905
75	92	69	70	60	114	61	62	61	68	67	61
+	+	+	+	+			+				
	+		+				+				+
									+		
			+								
118	117	116	115	114	113	112	111	110	109	108	107

154	153	152	151	150	149	148	147	146	145	144	143
599872	598090	595800	595574	594945	591734	591556	590509	590137	581167	573574	571175
599933	598149	595885	595644	595006	591828	591628	590586	590253	581226	573634	571255
62	60	86	71	62	95	73	78	117	60	61	81
+	+	+		+	+		+				+
						+				+	
						+					
	+				+		+			+	
	+					+					
		+									
154	153	152	151	150	149	148	147	146	145	144	143

202	201	200	199	198	197	196	195	194	193	192	191
734552	732681	732551	732119	730005	728576	725087	724068	723214	723099	722745	720289
734635	732764	732611	732184	730077	728831	725155	724127	723293	723182	722905	720351
84	84	61	66	73	256	69	60	80	84	161	63
		+		+	+	+	+	+	+		
		+			+	+	+		+	+	+
+	+					+					
			+	+	+				+	+	+
										+	
											+
					+						
											+
											+
											+
202	201	200	199	198	197	196	195	194	193	192	191

226	225	224	223	222	221	220	219	218	217	216	215
810683	806141	805368	804513	804105	802008	793096	792903	790923	789465	789113	788127
810794	806218	805450	804573	804180	802067	793191	792991	790992	789573	789187	788189
112	78	83	61	76	60	96	89	70	109	75	63
+	+					+	+	+		+	+
			+	+		+	+		+		
	+	+				+			+		+
						+					+
					+						
					+						
					+						
226	225	224	223	222	221	220	219	218	217	216	215

238	237	236	235	234	233	232	231	230	229	228	227
853751	842791	842277	836743	836042	834880	834746	833739	817852	815041	813656	812496
853825	842886	842352	836819	836104	834952	834808	833807	817922	815120	813751	812562
75	96	76	77	63	73	63	69	71	80	96	67
+		+	+	+	+		+		+	+	
			+				+	+			+
			+								
					+			+		+	+
			+	+				+			
238	237	236	235	234	233	232	231	230	229	228	227

250	249	248	247	246	245	244	243	242	241	240	239
870372	867999	864617	863263	862764	861542	860592	858981	858794	857850	856684	855293
870431	868096	864702	863344	862829	861633	860688	859064	858913	857919	856793	855361
60	98	86	82	66	92	97	84	120	70	110	69
	+		+				+	+	+	+	
+									+		+
											+
											+
	+					+					
250	249	248	247	246	245	244	243	242	241	240	239

262	261	260	259	258	257	256	255	254	253	252	251
894024	889980	889679	889455	883075	881170	880733	880036	877441	877053	876918	876199
894121	890135	889756	889534	883170	881239	880853	880112	877522	877120	877012	876270
98	156	78	80	96	70	121	77	82	68	95	72
+	+		+	+		+		+	+	+	+
	+						+			+	
						+					
	+			+		+		+			+
262	261	260	259	258	257	256	255	254	253	252	251

317	316	315	314	313	312	311	310	309	308
1047319	1047034	1046519	1045197	1044797	1044599	1043761	1042767	1042239	1042066
1047381	1047153	1046625	1045277	1044866	1044659	1043828	1042832	1042304	1042141
63	120	107	81	70	61	68	66	66	76
	+	+		+		+		+	+
+	+		+			+			+
		+							
		+			+	+	+	+	+
+			+				+		
									+
		+							
		+							
		+							
317	316	315	314	313	312	311	310	309	308

327	326	325	324	323	322	321	320	319	318
1058580	1057659	1057153	1055744	1055407	1054766	1054364	1054021	1053587	1053126
1058642	1057720	1057264	1055845	1055477	1054833	1054437	1054083	1053658	1053230
63	62	112	102	71	68	74	63	72	105
	+	+	+		+	+	+		+
		+			+				
			+						
								+	
327	326	325	324	323	322	321	320	319	318

337	336	335	334	333	332	331	330	329	328
1069316	1067273	1065415	1064331	1063080	1062096	1060568	1059487	1058902	1058799
1069404	1067386	1065484	1064406	1063144	1062175	1060674	1059552	1059045	1058860
89	114	70	76	65	80	107	66	144	62
+	+	+	+		+	+	+	+	+
			+						
		+			+	+			
			+						
		+							
		+							
		+							
	+	+	+						
				+					
				+					
							+		
			+					+	
								+	+
		+							
337	336	335	334	333	332	331	330	329	328

467	466	465	464	463	462	461	460	459	458
1416211	1416091	1415934	1414968	1412111	1409378	1403982	1402367	1402169	1389045
1416270	1416164	1416021	1415057	1412173	1409476	1404045	1402451	1402239	1389110
60	74	88	90	63	99	64	85	71	66
+		+	+	+	+	+	+		
+		+	+		+				
				+				+	+
				+					
			+	+	+				
			+						
				+					
					+				
467	466	465	464	463	462	461	460	459	458

477	476	475	474	473	472	471	470	469	468
1429929	1429398	1429277	1428603	1427999	1427898	1424725	1423021	1422171	1419226
1429988	1429553	1429366	1428665	1428062	1427963	1424787	1423080	1422329	1419309
60	156	90	63	64	66	63	60	159	84
+	+		+	+	+				+
+	+	+		+					+
	+							+	
	+	+	+	+	+				+
	+								
477	476	475	474	473	472	471	470	469	468

527	526	525	524	523	522	521	520	519	518
1541575	1541448	1540106	1539575	1539413	1538690	1538357	1537941	1537677	1537411
1541656	1541522	1540225	1539635	1539491	1538789	1538426	1538031	1537787	1537494
82	75	120	61	79	100	70	91	111	84
+	+	+	+	+	+	+	+		+
+	+	+			+		+	+	
+									
+		+		+		+	+		+
					+				+
527	526	525	524	523	522	521	520	519	518

617	616	615	614	613	612	611	610	609	608
1749437	1748692	1748570	1740241	1738721	1736971	1731889	1728815	1728596	1728413
1749539	1748754	1748638	1740353	1738809	1737085	1731959	1728875	1728655	1728475
103	63	69	113	89	115	71	61	60	63
	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+			+	+	+			+	
		+							
	+	+	+	+		+	+	+	
				+		+	+		
617	616	615	614	613	612	611	610	609	608

697	696	695	694	693	692	691	690	689	688
1959716	1959544	1957363	1956345	1955659	1953704	1952695	1949119	1943097	1938830
1959777	1959622	1957444	1956418	1955724	1953769	1952757	1949179	1943180	1938924
62	79	82	74	66	66	63	61	84	95
+			+		+	+	+	+	+
		+			+	+	+		
		+			+				+
	+	+	+			+	+		
									+
697	696	695	694	693	692	691	690	689	688

827	826	825	824	823	822	821	820	819	818
2164805	2161632	2160060	2159381	2158475	2158033	2157829	2157205	2156749	2156046
2164868	2161772	2160128	2159445	2158548	2158121	2157912	2157281	2156810	2156105
64	141	69	65	74	89	84	77	62	60
+	+	+	+	+	+		+		
	+		+			+			
				+	+				
+				+					
	+						+		
					+				
827	826	825	824	823	822	821	820	819	818

837	836	835	834	833	832	831	830	829	828
2186467	2183258	2180922	2180661	2179557	2170689	2169288	2167618	2166558	2164952
2186527	2183338	2180986	2180724	2179616	2170891	2169393	2167679	2166705	2165026
61	81	65	64	60	203	106	62	148	75
+		+	+		+	+		+	+
+	+	+		+					
+		+						+	
					+			+	
						+			
						+			
+						+			
+	+				+	+	+		
837	836	835	834	833	832	831	830	829	828

927	926	925	924	923	922	921	920	919	918
2328819	2327480	2325195	2324571	2324246	2323613	2323050	2322741	2322386	2321652
2328882	2327562	2325271	2324653	2324325	2323728	2323115	2322815	2322494	2321735
64	83	77	83	80	116	66	75	109	84
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
					+	+			
	+	+				+		+	+
		+				+	+		+
			+				+		
927	926	925	924	923	922	921	920	919	918

1197	1196	1195	1194	1193	1192	1191	1190	1189	1188
4492035	4491332	4461299	4456021	4453095	4452466	4434286	4433315	4415406	4342178
4492144	4491395	4461364	4456109	4453155	4452537	4434360	4433396	4415475	4342251
110	64	66	89	61	72	75	82	70	74
+		+	+	+	+	+			
	+	+					+	+	+
					+				
			+						
			+						
	+								
								+	
								+	
1197	1196	1195	1194	1193	1192	1191	1190	1189	1188

БЛАГОДАРНОСТИ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЭМИ СВЧ – электромагнитное излучение сверхвысоких частот

АСМ – атомно-силовая микроскопия

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

ПААГ – полиакриламидный гель

EtOH – этиловый спирт

EMSA – метод оценки электрофоретической подвижности (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

Sulfo-NHS – N-гидроксисукцинимид

EDAC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид

п.о. – пары оснований

п.н. – пары нуклеотидов

IPTG – изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид

PMSF – фенилметилсульфонилфлуорид

TrisHCl – трис(гидроксиметил)аминометан

EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота

BSA – бычий сывороточный альбумин

DTT – дитиотреитол

DMS – диметилсульфат

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Antipov S.S., Ozoline O.N., Fesenko E.E. Low intensity microwave irradiation of *Escherichia coli* cells affects the spectrum of synthesized proteins // Biophysics. 2005. V. S50. P.30–35
2. Веденкина Н.С. Триптофановая флуоресценция белков в растворах. Положение максимума спектра флуоресценции // Молекулярная биология. 1970. Т. 4(5). С.743–748
3. Никандров В.В. Неорганические полупроводники в биологических и биохимических системах: биосинтез, свойства и фотохимическая активность // Успехи биологической химии. 2000. Т.40. С.357–396
4. Пучков Е. О. Флуоресцентные репортеры и их репортажи // Химия и жизнь - XXI век. 2014. Т.9. С.8–13
5. 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
6. Статическая Магнитно-Силовая Микроскопия [<http://www.ntmdt-si.ru/spm-principles/view/dc-mfm>]
7. Тутукина М. Н., Шавкунов К. С., Масулис И. С., Озолин О. Н. Антисмысловая транскрипция в локусе *hns* *Escherichia coli* // Молекулярная биология. 2010. Т. 44. С.497–506
8. Alaleona F., Franceschini, S., Ceci P., Iari A. Chiancone E. *Thermosynechococcus elongatus* DpsA binds Zn(II) at a unique three histidine containing ferroxidase center and utilizes O₂ as iron oxidant with very high efficiency, unlike the typical Dps proteins // The FEBS Journal. 2010. V.277(4). P.903–917
9. 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. V.42(20). P.6300–6305

10. Allen M., Willits D., Mosolf J., Young M., Douglas T. Protein cage constrained synthesis of ferrimagnetic iron oxide nanoparticles // *Advanced Materials*. 2002. V.14(21). P.1562–1565
11. Almiron M., Link A. J., Furlong D. Kolter R. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli* // *Genes & Development*. 1992. V.6. P.2646–2654
12. 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. V.13(2). P.265–272
13. Andrews S.C., Robinson A.K., Rodriguez-Quinones F. Bacterial iron homeostasis // *FEMS Microbiology Reviews*. 2003. V.27. P.215–237
14. Andrews S.C. Iron storage in bacteria // *Advances in Microbial Physiology*. 1998. V.40. P.281–351
15. Andrews S.C. The ferritin-like superfamily: evolution of the biological iron storeman from a rubrerythrin-like ancestor // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010. V.1800(8). P.691–705
16. Arnold A.R., Barton J.K. DNA protection by the bacterial ferritin Dps via DNA charge transport // *Journal of the American Chemical Society*. 2013. V.135(42). P.15726–15729
17. 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. V.5(8). P.613–626
18. Azam T.A., Ishihama A. Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli* // *The Journal of Biological Chemistry*. 1999. V.274(46). P.33105 – 33113
19. 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. V.181(20). P.6361–6370

20. Bellapadrona G., Ardini M., Ceci P., Stefanini S., Chiancone E. Dps proteins prevent Fenton-mediated oxidative damage by trapping hydroxyl radicals within the protein shell // *Free Radical Biology & Medicine*. 2010. V.48(2). P.292–297
21. 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. V.284(28). P.19101–19109
22. Bou-Abdallah F. The iron redox and hydrolysis chemistry of the ferritins // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010. V.1800. P.719–731
23. Bozzi M., Mignogna G., Stefanini S., Barra D., Longhi C. et al. 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. V.272(6). P.3259–3265
24. Bsai 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. V.178(22). P.6579–6586
25. Bui H., Onodera C., Kidwell C., Tan Y., Graugnard E. et al. Programmable periodicity of quantum dot arrays with DNA origami nanotubes // *Nano Letters*. 2010. V.10(9). P.3367–3372
26. Bulte J.W.M., Douglas T., Mann S., Frankel R.B., Moskowitz B.M., et al. Magnetoferritin: characterization of a novel superparamagnetic MR contrast agent // *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. 1994. V.4(3). P.497–505
27. 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. V.110(2). P.375–386
28. 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. V.37(3). P.261–5

29. Carrondo M. Ferritins, iron uptake and storage from the bacterioferritin viewpoint // *The EMBO Journal*. 2003. V.22(9). P.1959–1968
30. Ceci P., Cellai S., Falvo E., Rivetti C., Rossi G. L. et al. DNA condensation and self-aggregation of *Escherichia coli* Dps are coupled phenomena related to the properties of the N-terminus // *Nucleic Acids Research*. 2004. V.32(19). P.5935–5944
31. 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. V.278(22). P.20319–20326
32. 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. V.280(41). P.34776–34785
33. 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. V.35(7). P.2247–2256
34. 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. V.10(29). P.4327–4332
35. Chen J., Seeman N.C. Synthesis from DNA of a molecule with the connectivity of a cube // *Nature*. 1991. V.350(6319). P.631–633
36. Chen L., Helmann J.D. *Bacillus subtilis* MrgA is a Dps(PexB) homologue: evidence for metalloregulation of an oxidative-stress gene // *Molecular Microbiology*. 1995. V.18(2). P. 295–300
37. Chiancone E., Ceci P., Ilari A., Ribacchi F. Stefanini S. Iron and proteins for iron storage and detoxification // *BioMetals*. 2004. V.17. P.197–202
38. 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. V.1800(8). P.798 – 805

39. Chu S. H., Choi S. H., Kim J. W., Lillehei P. T., Park Y. et al. Multilayer Ferritin Array for Bionanobattery // US Patent. US 2007/0134552 A1
40. Crichton R.R., Declercq J.P. X-ray structures of ferritins and related proteins // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010. V.1800. P.706–718
41. Cooksley C., Jenks P.J., Green A., Cockayne A., Logan R.P. et al. NapA protects *Helicobacter pylori* from oxidative stress damage, and its production is influenced by the ferric uptake regulator // *Journal of Medical Microbiology*. 2003. V.52(6). P.461–469
42. Cvetkovic A., Menon A.L., Thorgersen M.P., Scott J.W., Poole II F.L. et al. Microbial metalloproteomes are largely uncharacterized // *Nature*. 2011. V. 466(7303). P.779–782
43. Davis B.J. Disc electroforesis II. Method and application to human serum protein // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1964. V.121. P.404–427
44. Delius M., Leigh D.A. Walking molecules // *Chemical Society Reviews*. 2011. V.40(7).P.3656–3676
45. 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. V.8(5). P.875–889
46. Diederich F., Gomes-Lopez M. Supramolecular fullerene chemistry // *Chemical Society Reviews*. 1999. V.28. P.263–277
47. Domashevskaya E.P., Storozhilov S.A., Turishchev S.Y., Kashkarov V.M., Terekhov V.A. et al. 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. V.156. P.180 – 185
48. 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. V. 33(3). P.587–92
49. Dorman C.J. Nucleoid-associated proteins and bacterial physiology // *Advances in Applied Microbiology*. 2009. V.67. P.47–64

50. Douglas T., Bulte J.W.M., Dickson D.P.E., Frankel R.B., Pankhurst Q.A. et al. Inorganic-protein Interactions in the Synthesis of a Ferrimagnetic Nanocomposite // American Chemical Society. 1995. V.585(3). P.19–28
51. Douglas T., Stark V.T. Nanophase cobalt oxihydroxide mineral synthesized within the protein cage of ferritin // Inorganic Chemistry. 2000. V.39(8). P.1828–1830
52. Douglas T., Dickson D.P.E., Betteridge S., Charnock J., Garner C.D. et al. Synthesis and structure of an iron(III) sulfide–ferritin bioinorganic nanocomposite // Science. 1995. V.269(5220). P.54–57
53. 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. V.42(6). P.367–372
54. Endo M., Sugiyama H. Chemical approaches to DNA nanotechnology // ChemBioChem. 2009. V.10(15). P.2420–2443
55. Ensign D., Young M., Douglas T. Photocatalytic synthesis of copper colloids from Cu(II) by the ferrihydrite core of ferritin // Inorganic Chemistry. 2004. V.43(11). P.3441–3446
56. Erben C.M., Goodman R.P., Turberfield A.J. Single-molecule protein encapsulation in a rigid DNA cage // Angewandte Chemie. 2006. V.45(44). P.7417–7417
57. 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. V.37(5). P.2450 – 2464
58. Franceschini S., Ceci P., Alaleona F., Chiancone E., Ilari A. Antioxidant Dps protein from the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongates* // The FEBS Journal. 2006. V.273(21). P.4913-4928
59. 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. V.156(2). P.311–319

60. Frenkiel-Krispin D., Ben-Avraham I., Englander J., Shimoni E., Wolf S.G. et al. Nucleoid restructuring in stationary-state bacteria // *Molecular Microbiology*. 2004. V.51(2). P.395–405
61. Frenkiel-Krispin D., Levin-Zaidman S., Shimoni E., Wolf S.G., Wachtel E.J. et al. Regulated phase transitions of bacterial chromatin: a non-enzymatic pathway for generic DNA protection // *The EMBO Journal*. 2001. V.20(5). P.1184–1191
62. Gaastra W. Chemical cleavage (Maxam and Gilbert) for DNA sequence determination // *Methods on molecular biology* (Clifton N.J.). 1985. V.2. P.333–341
63. Galvez N., Fernandez B., Valero E., Sanchez P., Cuesta R. et al. Apoferritin as a nanoreactor for preparing metallic nanoparticles // *Comptes Rendus Chimie*. 2008. V.11(10). P.1207–1212
64. Galvez N., Sanchez P., Dominguez-Vera J.M., Soriano-Portillo A., Clemente-Leon M. et al. Apoferritin-encapsulated Ni and Co superparamagnetic nanoparticles // *Journal of Materials Chemistry*. 2006. V. 16. P.2757–2761
65. Ghatak P., Karmakar K., Kasetty S., Chatterji D. Unveiling the role of Dps in the organization of mycobacterial nucleoid // *PLoS One*. 2011. V. 6(1). P.e16019
66. Goodman R.P., Berry R.M., Turberfield A.J. The single-step synthesis of a DNA tetrahedron // *Chemical Communications*. 2004. V.12. P.1372–1373
67. Grant R.A., Filman D.J., Finkel S.E., Kolter R., Hogle, J.M. The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA // *Nature Structural Biology*. 1998. V.5. P.294–303
68. Grunwaldt J.D., Baiker A. *In situ* spectroscopic investigation of heterogeneous catalysts and reaction media at high pressure // *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2005. V.20. P.3526–3539
69. Guex N., Peitsch M.C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling // *Electrophoresis*. 1997. V.18(15). P.2714–2723
70. Gupta S., Chatterji D. Bimodal protection of DNA by *Mycobacterium smegmatis* DNA-binding protein from stationary phase cells // *The Journal of Biological Chemistry*. 2003. V.278. P.5235–5241

71. 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. V.398(3). P.361–365
72. Halsey T.A., Vazquez-Torres A., Gravdahl 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. V.72(2). P.1155–1158
73. Harrison P.M., Hempstead P.D., Artymiuk P.J. Andrews S.C. Structure-function relationships in the ferritins // Metal Ions in Biological Systems. 1998. V.35. P.435–477
74. Harrison P.M., Arosio P. The ferritins, molecular properties, iron storage and cellular regulation // Biochimica et Biophysica Acta. 1996. V.1275(3). P.161–203
75. Hemmilä I., Mikkala V.M. Time-resolution in fluorometry technologies, labels, and applications in bioanalytical assays // Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. 2001. V.38(6). P.441–519
76. 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. V.42. P.L398
77. 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. V.277(40). P.37619–37623
78. Ilari A., Stefanini S., Chiancone E., Tsernoglou D. The dodecameric ferritin from *Listeria innocua* contains a novel intersubunit iron-binding site // Nature Structural Biology. 2000. V.7. P.38–43
79. Ingleston S.M., Dickman M.J., Grasby J.A., Hornby D.P., Sharples G.J. et al. Holliday junction binding and processing by the RuvA protein of *Mycoplasma pneumoniae* // European Journal of Biochemistry. 2002. V.269(5). P.1525 – 1533
80. Ishihama Y., Asakawa N. Characterization of Lipophilicity scales using vectors from Solvation Energy Descriptors // Journal of Pharmaceutical Sciences. 1999. V.82(12). P.1305–1312

81. Ishikawa T., Mizunoe Y., Kawabata S., Takade A., Harada M. et al. The iron-binding protein Dps confers hydrogen peroxide stress resistance to *Campylobacter jejuni* // *Journal of Bacteriology*. 2003. V.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. V.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. –V. 19(49). P.495601
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. V.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. V.8. P. 181
86. Jeong G.H., Yamazaki A., Suzuki S., Yoshimura H., Kobayashi Y. et al. Cobalt-filled apoferritin for suspended single-walled carbon nanotube growth with narrow diameter distribution // *Journal of the American Chemical Society*. 2005. V.127(23). P.8238-8239
87. Kanekiyo M., Wei C., Yassine H., McTamney P., Boyington J. et al. Self-assembling influenza nanoparticle vaccines elicit broadly neutralizing H1N1 antibodies // *Nature*. 2013. V.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. V.48(26). P.4772–4776
89. Kang S., Lucon J., Varpness Z., Liepold L., Uchida M. et al. Monitoring Biomimetic Platinum Nanocluster Formation Using Mass Spectrometry and Cluster-Dependent H₂ Production // *Angewandte Chemie*. 2008. V.47(41). P.7845–7848
90. Katz E., Willner I. Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: synthesis, properties, and applications // *Angewandte Chemie*. 2004. V.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. V.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. V.601(1). P.8–16
93. Kim J.W., Yoshimura S.H., Hizume K., Ohniwa R.L., Ishihama A. et al. Fundamental structural units of the *Escherichia coli* nucleoid revealed by atomic force microscopy // *Nucleic Acids Research*. 2004. V.32(6). P.1982–1992
94. Kirimura H., Uraoka Y., Fuyuki T., Okuda M., Yamashita I. Study of low temperature crystallization of amorphous Si films obtained using ferritin with Ni nanoparticles // *Appl. Phys. Lett.* 2005. V.86(28). P.262106
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. V.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. V.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. V.126(41). P.13282–13286
98. Kumagai S., Yoshii S., Yamada K., Matsukawa N., Iwahori K. et al. Electrostatic placement of nanodots onto silicon substrate using ferritin protein supramolecules with control of electrostatic Interaction in solution // *Japanese Journal of Applied Physics*. 2006. V.45(10B). P.8311–8316
99. Kumagai S., Yoshii S., Yamada K., Matsukawa N., Fujiwara T. et al. Electrostatic placement of single ferritin molecules // *Applied Physics Letters*. 2006. V.88. P.153103

100. Kumagai S., Ono T., Yoshii S., Kadotani A., Tsukamoto R. et al. Position-controlled vertical growths of individual carbon nanotubes using a cage-shaped protein // *Applied Physics Express*. 2010. V.3(1). P. 015101
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. V.186(21). P.7186–7195
102. Lawson D.M., Artymiuk P.J., Yewdall S.J., Smith J.M., Livingstone J.C. et al. Solving the structure of human H ferritin by genetically engineering intermolecular crystal contacts // *Nature*. 1991. V.349(6309). P.541–544
103. Lewin A., Moore G.R., Le Brun N.E. Formation of protein-coated iron minerals // *Dalton Transactions*. 2005. V.22. P.3597–3610
104. Li M., Wong K.K., Mann S. Organization of inorganic nanoparticles using Biotin-Streptavidin connectors // *Chemistry of Materials*. 1999. V.11(1). P.23–26
105. Li Y., Kim W., Zhang Y., Rolandi M., Wang D. et al. Growth of single-walled carbon nanotubes from discrete catalytic nanoparticles of various sizes // *The Journal of Physical Chemistry B*. 2001. V.105(46). P.11424–11431
106. Lin X., Xie J., Niu G., Zhang F., Gao H. et al. Chimeric Ferritin Nanocages for Multiple Function Loading and Multimodal Imaging // *Nano Letters*. 2011. V.11(2). P.814–819
107. Lin X., Xie J., Zhu L., Lee S., Niu G. et al. Hybrid Ferritin Nanoparticles as Activatable Probes for Tumor Imaging // *Angewandte Chemie*. 2011. V.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. V.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. V.79(15). P.5614–5619

110. Liu H., Liu D. DNA nanomachines and their functional evolution // *Chemical Communications*. 2009. V.19. P.2625–2639
111. Liu J., Geng Y., Pound E., Gyawali S., Ashton J.R. et al. Metallization of branched DNA origami for nanoelectronic circuit fabrication // *ACS Nano*. 2005. V.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. V.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. V.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. V.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. V.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. V.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 $\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3 \times$ // *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 2004. V.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. P.545
119. Mann S. Molecular tectonics in biomineralization and biomimetic materials chemistry // *Nature*. 1993. V.365(6446). P.499–505
120. Marken F., Patel D., Madden C.E., Millward R.C. et al. The direct electrochemistry of ferritin compared with the direct electrochemistry of nanoparticulate hydrous ferric oxide // *New Journal of Chemistry*. 2002. V.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. V.179(16). P.5188–5194
122. Masover W.H. Ultrastructure of Ferritin and Apoferritin: A Review // *Micron*. 1993. V.24. P.389–486
123. Mathieu F., Liao S., Kopatsch J., Wang T., Mao C. et al. Six-helix bundles designed from DNA // *Nano Letters*. 2005. V.5(4). P.661–665
124. 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. V.183(2). P.371–379
125. Matzanke B.F., Ecker D.J., Yang T.S., Huynh B.H., Muller G. et al. *Escherichia coli* iron enterobactin uptake monitored by Mössbauer spectroscopy // *Journal of Bacteriology*. 1986. V.167(2). P.674–680
126. Maune H.T., Han S., Barish R.D., Bockrath M., Goddard III W.A. et al. Self-assembly of carbon nanotubes into two-dimensional geometries using DNA origami templates // *Nature Nanotechnology*. 2010. V.5. P.61–66
127. Meldrum F.C., Heywood B.R., Mann S., Magnetoferritin: in vitro synthesis of a novel magnetic protein // *Science*. 1992. V.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. V.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. V.349(6311). P.684–687
130. 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. V.382. P.607–609
131. Miura A., Uraoka Y., Fuyuki T., Kumagai S., Yoshii S. et al. Bionanodot monolayer array fabrication for nonvolatile memory application // *Surface Science Letters*. 2007. V.601(15). P.L81–L85

132. Miura A., Hikono T., Matsumura T., Yano H., Hatayama T. et al. Floating nanodot gate memory devices based in biomineralized inorganic nanodot array as a storage node // *Japanese Journal of Applied Physics*. 2005. V.45(1). P.L1
133. 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. V.103(7). P. 074503
134. Miura A., Tsukamoto R., Yoshii S., Yamashita I., Uraoka Y. et al. Non-volatile flash memory with discrete bionanodot floating gate assembled by protein template // *Nanotechnology*. 2008. V. 19(25). P. 255201
135. Miura A., Tanaka R., Uraoka Y., Matsukawa N., Yamashita I. et al. The characterization of a single discrete bionanodot for memory device applications // *Nanotechnology*. 2009. V.20(12). P.125702
136. Morikawa K., Ohniwa R. L., Kim J., Takeshita S. L., Maruyama A. et al. Biochemical, molecular genetic, and structural analyses of the staphylococcal nucleoid // *Microscopy and Microanalysis*. 2007. Vol.13(1). P.30–35
137. Nair S., Finkel S.E. Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase // *Journal of Bacteriology*. 2004. V.186(13). P.4192–4198
138. Niemeyer C.M., Mirkin C.A. *Nanobiotechnology: Concepts, Applications and Perspectives* // Wiley-VCH, Weinheim. 2004. P.492
139. Okuda M., Iwahori K., Yamashita I., Yoshimura H. Fabrication of nickel and chromium nanoparticles using the protein cage of apoferritin // *Biotechnology and Bioengineering*. 2003. V.84(2). P.187–193
140. Omabegho T., Sha R., Seeman N.C. A bipedal DNA brownian motor with coordinated legs // *Science*. 2009. V.324(5923). P.67–71
141. 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. V.417(5). P.406–412
142. Papinutto E., Dundon W.G., Pitulis N., Battistutta R., Montecuccio C. et al. Structure of two iron-binding proteins from *Bacillus anthracis* // *The Journal of Biological Chemistry*. 2002. V.277(17). P.15093–15098

143. Park S.H. Yin P., Liu Y., Reif J.H., LaBean T.H. et al. Programmable DNA self-assemblies for nanoscale organization of ligands and proteins // *Nano Letters*. 2005. V.5(4). P.729–733
144. Pead S., Durrant E., Webb B., Larsen C., Heaton D. et al. Metal ion binding to apo, holo, and reconstituted horse spleen ferritin // *Journal of Inorganic Biochemistry*. 1995. V.59(1). P.15–27
145. 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. V.270(38). P.22478 – 22482
146. Perriman A.W., Cölfen H., Hughes R.W., Barrie C.L., Mann S. Solvent-free protein liquids and liquid crystals // *Angewandte Chemie*. 2009. V.48(34). P.6242–6246
147. 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. V.286(40). P.34872–34882
148. Ping L., Platzer M., Wen G., Delaroque N. Coevolution of *aah*: a dps-like gene with the host bacterium revealed by comparative genomic analysis // *Scientific World Journal*. 2012. V.2012. P.504905
149. Pinheiro A.V., Han D., Shih W.M., Yan H. Challenges and opportunities for structural DNA nanotechnology // *Nature Nanotechnology*. 2011. V.6(12). P.763–772
150. Pulliainen A.T., Haataja S., Kahkonen S. Finne J. Molecular basis of H₂O₂ resistance mediated by *Streptococcal* Dps. Demonstration of the functional involvement of the putative ferroxidase center by site-directed mutagenesis in *Streptococcus suis* // *The Journal of Biological Chemistry*. 2003. V.278(10). P.7996–8005
151. 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. V.30(4). P.713–715

152. 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
153. 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. V. 329(3). P.467–477
154. Regan T. J., Ohldag H., Stamm C., Nolting F., Lüning J. et al. Chemical effects at metal/oxide interfaces studied by x-ray-absorption spectroscopy // *Physical Review B*. 2001. Vol. 64(21). P. 214422
155. Rothmund P.W. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns // *Nature*. 2006. V.440(7082). P.297–302
156. Roy S., Gupta S., Das S., Sekar K., Chatterji D. et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of *Mycobacterium smegmatis* Dps // *Acta Crystallographica. Section D. Biological Crystallography*. 2003. V.59. P.2254–2256
157. 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. V.375(4). P.948–959
158. Saccà, B. Meyer R., Erkelenz M., Kiko K., Arndt A. et al. Orthogonal protein decoration of DNA origami // *Angewandte Chemie*. 2010. V.49(49). P.9378–9383
159. Schreiber R., Kempter S., Holler S., Schüller V., Schiffels D. et al. DNA origami-templated growth of arbitrarily shaped metal nanoparticles // *Small*. 2011. V.7(13). P.1795–1799
160. Seeman N.C. Construction of three-dimensional stick figures from branched DNA // *DNA and Cell Biology*. 1991. V.10(7). P.475–486
161. Seeman N.C. DNA in material world // *Nature*. 2003. V.421(6921). P.427–431
162. Seeman N.C. Nucleic acid junctions and lattices // *Journal of Theoretical Biology*. 1982. V.99(2). P.237–247
163. Seeman N.C. The design and engineering of nucleic acid nanoscale assemblies // *Current Opinion in Structural Biology*. 1996. V.6(4). P.519–526

164. Sharma, J., Ke Y., Lin C., Chhabra R., Wang Q. et al. DNA-tile-directed self-assembly of quantum dots into two-dimensional nanopatterns // *Angewandte Chemie*. 2008. V.47(28). P.5157–5159
165. 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. V.37(15). P.4919–4931
166. Sherman W.B., Seeman N.C. A precisely controlled DNA biped walking device // *Nano Letters*. 2004. V.4(7). P.1203–1207
167. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels // *Analytical Chemistry*. 1996. V.68(5). P.850–858
168. Shevchenko E.V., Talapin D.V., Kotov N.A., Brien S.O., Murray C.B. Structural diversity in binary nanoparticle superlattices // *Nature*. 2006. V.439. P.55 – 59
169. Shih W.M., Quispe J.D., Joyce G.F. A 1.7-kilobase single-stranded DNA that folds into a nanoscale octahedron // *Nature*. 2004. V.427(6975). P.618–621
170. Stephanopoulos, N. Liu M., Tong G.J., Li Z., Liu Y. et al. Immobilization and one-dimensional arrangement of virus capsids with nanoscale precision using DNA origami // *Nano Letters*. 2010. V.10(7). P.2714–2720
171. 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. V.44(15). P.5572–5578
172. Suzuki M., Abe M., Ueno T., Abe S., Goto T. et al. Preparation and catalytic reaction of Au/Pd bimetallic nanoparticles in Apo-ferritin // *Chemical Communications*. 2009. V.32. P.4871–4873
173. Takagi D., Yamazaki A., Otsuka Y., Yoshimura H., Kobayashi Y., et al. Goldfilled apo-ferritin for investigation of single-walled carbon nanotube growth on substrate // *Chemical Physics Letters*. 2007. V.445(4). P.213–216
174. Takeyasu K., Kim J., Ohniwa R. L., Kobori T., Inose Y. et al. Genome architecture studied by nanoscale imaging: analyses among bacterial phyla and their

- implication to eukaryotic genome folding // *Cytogenetic and Genome Research*. 2004. V.107(1-2). P.38–48
175. 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. VI.114. P.895–900
176. Thieme D. Grass G. The Dps protein of *Escherichia coli* is involved in copper homeostasis // *Microbiological Research*. 2010. V.165(2). P.108–115
177. Tikhomirov T., Hoogland S., Lee P.E., Fischer A., Sargent E.H. et al. DNA-based programming of quantum dot valency, self-assembly and luminescence // *Nature Nanotechnology*. 2011. V.6. P.485–490
178. 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
179. 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. V.156. P.445–451
180. Turishchev S.Y. Terekhov V.A., Nesterov D.N., Koltygina K.G., Sivakov V.A. et al. 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. V.41(4). P.344–347
181. Uchida M., Flenniken M.L., Allen M., Willits D.A., Crowley B.E. et al. Targeting of Cancer Cells with Ferrimagnetic Ferritin Cage Nanoparticles // *Journal of the American Chemical Society*. 2006. V.128(51). P.16626–16633
182. Uchida M., Kang S., Reichhardt C., Harlen K., Douglas, T. The ferritin superfamily: supramolecular templates for materials synthesis // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010. V.1800. P.834–845

183. Ueno T., Suzuki M., Goto T., Matsumoto T., Nagayama K. et al. Size-selective olefin hydrogenation by a Pd nanocluster provided in an apo-ferritin cage // *Angewandte Chemie*. 2004. V.43(19). P.2527-2530
184. Ueshima J., Shoji M., Ratnayake D.B., Abe K., Yoshida S. et al. Purification, gene cloning, gene expression, and mutants of Dps from the obligate anaerobe *Porphyromonas gingivalis* // *Infection and Immunity*. 2003. V.71(3). P.1170–1178
185. Vlahoviček K., Kajan L., Pongor S. DNA analysis servers: plot.it, bend.it, model.it and IS // *Nucleic Acids Research*. 2003. V.31(13). P.3686–3687
186. Wang G., Alamuri P., Maier R.J. The diverse antioxidant systems of *Helicobacter pylori* // *Molecular Microbiology*. 2006. V.61(4). P.847–860
187. 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. V.36(5). P.3009–3011
188. Watt G.D., Kim J.W., Zhang B., Miller T., Harb J.N. et al. A Protein-Based Ferritin Bio-Nanobattery // *Journal of Nanotechnology*. 2012. V.2012. P.9
189. Wiedenheft B., Mosolf J., Willits D., Yeager M., Dryden K. A. et al. 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. V.102(30). P.10551–10556
190. Wilchek M., Bayer E.A. Foreword and introduction to the book streptavidin-biotin system // *Biomolecular Engineering*. 1999. V.16. P. 1–4
191. 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. V.46(17). P.3051–3054
192. Wolf S.G., Frenkiel D., Arad T., Finkel S.E., Kolter R. et al. DNA protection by stress-induced biocrystallization // *Nature*. 1999. V.400. P.83–85
193. Wong K.K.W., Mann S. Biomimetic synthesis of cadmium sulfide-ferritin nanocomposites // *Advanced Materials*. 1996. V.8(11). P.928–932

194. 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. V.(16). P. 1621–1622
195. Yamada K., Yoshii S., Kumagai S., Miura A., Uraoka Y. et al. Effects of dot density and dot size on charge injection characteristics in nanodot array produced by protein supramolecules // *Japanese Journal of Applied Physics*. 2007. V.46(11). P.7549–7553
196. Yamashita I. Biosupramolecules for nano-devices: biomineralization of nanoparticles and their applications // *Journal of Materials Chemistry*. 2008. V.18. P.3813–3820
197. Yamashita I., Hayashi J., Hara M. Bio-template synthesis of uniform CdSe nanoparticles using cage-shaped Protein, Apoferritin // *Chemistry Letters*. 2004. V.33(9). P.1158–1159
198. Yamashita I. Fabrication of a two-dimensional array of nano-particles using ferritin molecule // *Thin Solid Films*. 2001. V.393(1). P.12–18
199. Yamashita I., Iwahori K., Kumagai S. Ferritin in the field of nanodevices // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010. V.1800(8). P.846–857
200. 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. V.301(5641). P.1882–1884
201. Yan R., Gargas D., Yang, P. Nanowire photonics // *Nature Photonics*. 2009. V.3. P.569–576
202. Yoshii S., Kumagai S., Nishio K., Kadotani A., Yamashita I., Electrostatic self-aligned placement of single nanodots by protein supramolecules // *Applied Physics Letters*. 2009. V.95. P133702
203. Yoshii S., Yamada K., Matsukawa N., Yamashita I. Making monolayer of inorganic nanoparticles on silicon substrate // *Japanese Journal of Applied Physics*. 2005. V.44(3). P.1518
204. 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

- Bsp*D6I gene form a restriction endonuclease complex // *Biochemistry*. 2006. V.71(7). P.815-20
205. Zadegan R.M., Norton M.L. Structural DNA Nanotechnology: From Design to Applications // *International Journal of Molecular Sciences*. 2012. V.13(6). P.7149-7162.
206. Zanotti G., Papinutto E., Dundon W.G., Battistutta R., Seveso M. et al. Structure of the neutrophil-activating protein from *Helicobacter pylori* // *Journal of Molecular Biology*. 2002. V.323(1). P.125–130
207. Zapfen D.C., Johnson M.A. Direct electron transfer of ferritin adsorbed at bare gold electrodes // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2000. V.494(2). P.114–120
208. Zborowski M., Bor Fur C., Green R., Baldwin N.J., Reddy S. et al. Immunomagnetic isolation of magnetoferritin-labeled cells in a modified ferrograph // *Cytometry*. 1996. V.24(3). P.251–259
209. Zeth K. Dps biomineralizing proteins: multifunctional architects of nature // *The Biochemical Journal*. 2012. V.445(3). P.297–311
210. 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. V.101(38). P.13780–13785
211. Zhang B., Harb J. N., Davis R. C. Choi S., Kim J.W. et al. Electron exchange between Fe(II) – horse spleen ferritin and Co(III)/Mn(III) reconstituted horse spleen and *Azotobacter vinelandii* ferritins // *Biochemistry*. 2006. V.45(18). P.5766–5774
212. Zhang F., Jiang S., Wu S., Li Y., Mao C. et al. Complex wireframe DNA origami nanostructures with multi-arm junction vertices // *Nature Nanotechnology*. 2015. V.10(9). P.779–784
213. 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. V.20. P.1907–1917

214. Zhang Y., Orner B.P. Self-Assembly in the Ferritin Nano-Cage Protein Superfamily // *International Journal of Molecular Sciences*. 2011. V.12(8). P.5406–5421
215. Zhao G., Ceci P., Ilari A., Giangiacomo L., Laue T.M. et al. 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. V.277(31). P.27689–27696
216. Zhen Z., Tang W., Chen H., Lin X., Todd T. et al. RGD Modified Apoferritin Nanoparticles for Efficient Drug Delivery to Tumors // *ACS Nano*. 2013. V.7(6). P.4830–4837
217. Zheng J., Birktoft J.J., Chen Y., Wang T., Sha R. et al. From molecular to macroscopic via the rational design of a self-assembled 3D DNA crystal // *Nature*. 2009. V.461. P.74–77
218. Stillman T.J., Connolly P.P., Latimer C.L. Andrews S. C., Treffry A. et al., Insights into the effects on metal binding of the systematic substitution of five key glutamate ligands in the ferritin of *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem*. 2003. V.278. P.26275-26286.
219. Швырева У.С., Тутукина М. Н., Озолинь О.Н. Бактериоферритин: свойства и структурно-функциональная организация регуляторной области гена *Dps* // *Биофизика*. 2011. Т.56(2). С.821-830
220. Shane C. Dillon and Charles J. Dorman Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression // *Nature reviews*. 2010. V.8. P.185 – 195
221. Deng S., Stein R.A., Higgins N.P. Organization of supercoil domains and their reorganization by transcription // *Mol. Microbiol*. 2005.V.57. P.1511–1521
222. Postow L., Hardy C.D., Arsuaga J., Cozzarelli N. R. Topological domain structure of the *Escherichia coli* chromosome // *Genes Dev*. 2004. V.18. P.1766–1779
223. Stein R.A., Deng S., Higgins N.P. Measuring chromosome dynamics on different time scales using resolvases with varying half-lives // *Mol. Microbiol*. 2005. V.56, P.1049–1061

224. Grainger, D.C., Hurd, D., Goldberg, M.D., Busby, S.W.J. Association of nucleoid proteins with coding and non-coding segments of the *Escherichia coli* genome //Nucleic Acids Res. 2006. V.34. P.4642–4652
225. Oshima T., Ishikawa S., Kurokawa K., Aiba H., Ogasawara N. *Escherichia coli* histone-like protein H-NS binds to horizontally acquired DNA in association with RNA polymerase // DNA Res. 2006. V.13. P.141–153
226. Zimmerman S. B. Cooperative transitions of isolated *Escherichia coli* nucleoids: implications for the nucleoid as a cellular phase //J. Struct. Biol. 2006. V.153. P.160–175
227. Atlung, T., H. Ingmer. H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression // Mol. Microbiol. 1997. V.24. P.7–17
228. Finkel, S.E., Johnson R.C. The Fis protein: it's not just for DNA inversion anymore // Mol. Microbiol. 1992. V.6. P.3257–3265
229. Hengge-Aronis R. Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli* //Curr. Opin. Microbiol. 1999. V.2(2) P.148-152
230. Ishihama, A. Modulation of the nucleoid, the transcription apparatus, and the translation machinery in bacteria for stationary phase survival // Genes Cells. 1999. V.3. P.135–143
231. Williams R.M., Rimsky S. Molecular aspects of the *E. coli* nucleoid protein, H-NS: a central controller of gene regulatory networks // FEMS Microbiol. Lett. 1987. V.156. P.175–185
232. Hwang D.S., Kornberg A. A novel protein binds a key origin sequence to block replication of an *E.coli* minichromosome // Cell. 1990. V.63(2). P.325-331
233. Swinger K.K., Rice P.A. IHF and HU: flexible architects of bent DNA // Curr. Opin. Struct. Biol. 2004. V.14. P.28–35
234. Arfin S.M., Long A.D., Ito E.T., Toller L., Riehle M.M. et al. Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K-12. The effects of integration hostfactor // J. Biol. Chem. 2000. V.275. P.29672–29684

235. Macchi R., Montesissa L., Murakami K., Ishihama A., de Lorenzo V. et al. Recruitment of σ^{54} -RNA polymerase to the Pu promoter of *Pseudomonas putida* through integration host factor-mediated positioning switch of α subunit carboxyl-terminal domain on an UP-like element // *J. Biol. Chem.* 2003. V.278. P.27695–27702
236. Santero E., Hoover T.R., North A.K., Berger D.K., Porter S.C. et al. Role of integration host factor in stimulating transcription from the σ^{54} -dependent *nifH* promoter // *J. Mol. Biol.* 1992. V.227. P.602–620
237. Liu Y., Chen H., Kenney L.J., Yan J. A divalent switch drives H-NS/DNA-binding conformations between stiffening and bridging modes // *GENES & DEVELOPMENT.* 2010. V.24. P.339–344
238. Dame R. T., Wyman C., Wurm R., Wagner R., Goosen N. Structural basis of H-NS-mediated trapping of RNA polymerase in the open initiation complex at *rrnB* P1 // *J. Biol. Chem.* 2002. V.277. P.2146–2150
239. Luijsterburg M.S., White M.F., van Driel R., Dame R.T. The major architects of chromatin: architectural proteins in bacteria, archaea and eukaryotes // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2008. V.43. P.393–418
240. Nye M.B., Taylor R.K. *Vibrio cholerae* H-NS domain structure and function with respect to transcriptional repression of ToxR regulon genes reveals differences among H-NS family members // *Mol. Microbiol.* 2003. V.50. P.427–444
241. Tanaka H., Goshima H., КоноК., Кано Y., Imamoto F. Properties of DNA-binding of HU heterotypic and homotypic dimers from *Escherichia coli*.// *J. Biochem.* 1993. V.113. P.568–572.
242. Claret L., Rouvière-Yaniv J. Variation in HU composition during growth of *Escherichia coli*: the heterodimer is required for long term survival // *J. Mol. Biol.* 1997. V.273. P. 93–104
243. Drlica K., Rouviere-Yaniv J. Histone-like proteins of bacteria.// *Microbiol. Rev.* 1987.V.51. P.301–319
244. Johnson R. C., Bruist M.F., Simon M.I. Host protein requirement for *in vitro* site-specific DNA inversion // *Cell.* 1986. V.46. P.531–539.

245. Cho B.K., Knight E.M., Barrett C.L., Palsson B.O. Genome-wide analysis of Fis binding in *Escherichia coli* indicates a causative role for A-/AT-tracts // *Genome Res.* 2008. V.18. P.900–910
246. Pan C.Q., Finkel S.E., Cramton S.E., Feng J.A., Sigman D.S. et al. Variable structures of Fis-DNA complexes determined by flanking DNA-protein contacts // *J. Mol. Biol.* 1996. V. 264. P. 675–695
247. Skoko D., Yoo D., Bai H., Schnurr B., Yan J. et al. Mechanism of chromosome compaction and looping by the *Escherichia coli* nucleoid protein Fis // *J. Mol. Biol.* 2006. V.364. P.777–798
248. Pedersen A.G., Jensen L.J., Brunak S., Staerfeldt H.H., Ussery, D.W. A DNA structural atlas for *Escherichia coli* // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 299. P.907–930
249. Grainger D.C., Goldberg M.D., Lee D.J., Busby, S.J.W. Selective repression by Fis and H-NS at the *Escherichia coli* *dps* promoter // *Mol. Microbiol.* 2008. V.68. P.1366–1377
250. McLeod S.M., Aiyar S.E., Gourse R.L., Johnson R.C. The C-terminal domains of the RNA polymerase α subunits: contact site with Fis and localization during co-activation with CRP at the *Escherichia coli* *proP* P2 promoter // *J. Mol. Biol.* 2002. V.316. P. 517–529
251. Mallik, P., Pratt T.S., Beach M.B., Bradley M.D., Undamatla J. et al. Growth phase-dependent regulation and stringent control of *fis* are conserved processes in enteric bacteria and involve a single promoter (*fisP*) in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* 2004. V.186. P.122–135
252. Kajitani M., Kato A., Wada A., Inokuchi Y., Ishihama A. Regulation of the *Escherichia coli* *hfq* gene encoding the host factor for phage Qb // *J. Bacteriol.* 1994. V.176. P.531–534.
253. Ueguchi C., Kakeda M., Yamada H., Mizuno T. An analogue of the DnaJ molecular chaperon in *Escherichia coli* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V.91. P.1054–1058.

254. Chenoweth M.R., Wickner S. Complex regulation of the DnaJ homolog CbpA by the global regulators σ^S and Lrp, by the specific inhibitor CbpM, and by the proteolytic degradation of CbpM // *J. Bacteriol.* 2008. V.190. P.5153–5161
255. Yamashino T., Kakeda M., Ueguchi C., Mizuno T. An analogue of the DnaJ molecular chaperone whose expression is controlled by sigma S during the stationary phase and phosphate starvation in *Escherichia coli* // *Mol. Microbiol.* 1994. V.13. P.475–483.
256. Kakeda M., Ueguchi C., Yamada H., Mizuno T. An *Escherichia coli* curved DNA-binding protein whose expression is affected by the stationary phase-specific sigma factor σ^S // *Mol. Gen. Genet.* 1995. V.248. P.629–634.
257. Cui Y., Wang Q., Stormo G.D., Calvo J.M. A consensus sequence for binding of Lrp to DNA // *J. Bacteriol.* 1995. V.177. P.4872–4880
258. Wang Q., Calvo J.M. Lrp, a major regulatory protein in *Escherichia coli*, bends DNA and can organize the assembly of a higher order nucleoprotein structure // *EMBO J.* 1993. V.12. P. 2495–2501
259. Zhang, Z., Belfort M. Nucleotide sequence of a newly identified *Escherichia coli* gene, *stpA*, encoding an H-NS-like protein // *Nucleic Acids Res.* 1992. V.20, P.6734-6742.
260. Johansson J., Eriksson S., Sonden B., Wai S.N., Uhlin B.E. Heteromeric Interactions among Nucleoid-Associated Bacterial Proteins: Localization of StpA-Stabilizing Regions in H-NS of *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* 2001. V.183(7). P.2343–2347
261. Wolf T., Janzen W., Blum C., Schnetz K. Differential dependence of StpA on H-NS in autoregulation of *stpA* and in regulation of *bgl* // *J. Bacteriol.* 2006. V. 188. P. 6728–6738
262. Donato G., Kawula T. H. Enhanced Binding of Altered H-NS Protein to Flagellar Rotor Protein FliG Causes Increased Flagellar Rotational Speed and Hypermotility in *Escherichia coli* // *J. of Biol. Chem.* 1998. V. 273(37). P.24030 – 24036.

263. Browning D.F., Busby S.J.W. The regulation of bacterial transcription initiation // *Nature Rev. Microbiol.* 2004. V.2. P.57–65
264. Grainger D.C., Hurd D., Harrison M., Holdstock J., Busby S.J.W. Studies of the distribution of *Escherichia coli* cAMP-receptor protein and RNA polymerase along the *E. coli* chromosome // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V.102. P.17693–17698
265. Lee J.H., Jang H., Cho E.J., Youn H.D. Ferritin binds and activates p53 under oxidative stress // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. V.389(3). P.399-404
266. Choi S.H., Baumler D.J., Kaspar C.W. Contribution of *dps* to acid stress tolerance and oxidative stress tolerance in *Escherichia coli* O157:H7 // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V.66. P.3911–3916
267. Hong Y., Wang G.E., Maier R.J. *Helicobacter hepaticus* Dps protein plays an important role in protecting DNA from oxidative damage // *Free Rad. Res.* 2006. V.40. P. 597–605
268. Yu M.J., Ren J., Zeng Y.L., Zhou S.N., Lu Y.J. The *Legionella pneumophila* Dps homolog is regulated by iron and involved in multiple stress tolerance // *J. Basic Microbiol.* 2009. V.49(1). P. 79–86.
269. Smith J.L. The role of gastric acid in preventing foodborne disease and how bacteria overcome acid conditions // *J. Food Prot.* 2003. V.66. P.1292–1303
270. Friedberg E.C., Walker C.G., Wolfram S., Wood D. R., Schultz A.R et al. DNA Repair and Mutagenesis (2nd ed.) // DC: ASM Press, Washington. 2006. 1118p.
271. Castanie-Cornet M.P., Penfound T.A., Smith D., Elliott J.F., Foster J.W. Control of acid resistance in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* 1999. V.181. P.3525–3535
272. Lacqua A., Wanner O., Colangelo T., Martinotti M.G., Landini P. Emergence of biofilm-forming subpopulations upon exposure of *Escherichia coli* to environmental bacteriophages // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V.72. P.956–959
273. Li H., Wang B.C., Xu W.J., Lin X.M., Peng X.X. Identification and network of outer membrane proteins regulating streptomycin resistance in *Escherichia coli* // *J. Proteome Res.* 2008. V.7. P.4040–4049.

274. Datsenko K.A., Wanner B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000 V.97. P.6640-6645
275. Thomason L.C., Constantino N., Court D.L. *E.coli* genome manipulation by P1 transduction // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Chapter 1. 2007. Unit 1.17
276. Pouyez J., Mayard A., Vandamme A.M., Roussel G., Perpète E.A. et al. First crystal structure of an endo-inulinase, INU2, from *Aspergillus ficuum*: discovery of an extra-pocket in the catalytic domain responsible for its endo-activity // *Biochimie.* 2012. V.94(11) P.2423-30
277. O'Boyle N.M., Banck M., James C.A., Morley C., Vandermeersch T. et al. Open Babel: An open chemical toolbox // *J. Cheminform.* 2011 V.3(33) doi: 10.1186/1758-2946-3-33.
278. Trott O., Olson A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading // *J. Comput. Chem.* 2010 V.31(2). P.455-61
279. Morris G.M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M.F., Belew R.K. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility // *J. Comput. Chem.* 2009 V.30(16). P.2785-91
280. Hanwell M.D., Curtis D.E., Lonie D.C., Vandermeersch T., Zurek E. et al. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J. Cheminform.* 2012, V.4(1). P.17
281. Grodzki A.C., Berenstein E. Antibody purification: ion-exchange chromatography // *Methods Mol. Biol.* 2010. V.588. P.27-32
282. Singh S.S., Grainger D.C. H-NS Can Facilitate Specific DNA-binding by RNA Polymerase in AT-rich Gene Regulatory Regions // *PLoS Genet.* 2013. V.9. P.e1003589
283. Afgan E., Baker D., van den Beek M., Blankenberg D., Bouvier D. et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update // *Nucl. Acids Res.* 2016. v.44. P.W3-10

284. Edgar R., Domrachev M., Lash A.E. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository // *Nucl. Acids Res.* 2002. V.30. P.207-210
285. Panyukov V.V., Kiselev S.S., Shavkunov K.S., Masulis I.S., Ozoline O.N. Mixed promoter islands as genomic regions with specific structural and functional properties // *Mathem. Biol. Bioinf.* 2013. V.8. P.t12-t26.
286. Aleksic J., Carl S., Frye M. Beyond library size: a field guide to NGS normalization. bioRxiv preprint first posted online. 2014; doi: <http://dx.doi.org/10.1101/006403>.
287. Grainger D.C., Aiba H., Hurd D., Browning D.F., Busby S.J.W. Transcription factor distribution in *Escherichia coli*: studies with FNR protein // *Nucl. Acids Res.* 2007. V.35. P.269-278
288. Vora T., Hottes A.K., Tavazoie S. Protein Occupancy Landscape of a Bacterial Genome // *Mol. Cell.* 2009. V.35. P.247-253.
289. Kahramanoglou C., Seshasayee A.S.N., Prieto A.I., Ibberson D., Schmidt S. et al. Direct and indirect effects of H-NS and Fis on global gene expression control in *Escherichia coli* // *Nucl Acids Res.* 2011. V.39 P.2073-2091
290. Myers K.S., Yan H., Ong I.M., Chung D., Liang K. et al. Genome-scale Analysis of *Escherichia coli* FNR Reveals Complex Features of Transcription Factor Binding // *PLoS Genet.* 2013 V.9. P.e1003565
291. Prieto A.I., Kahramanoglou C., Ali R.M., Fraser G.M., Seshasayee A.S.N. et al. Genomic analysis of DNA binding and gene regulation by homologous nucleoid-associated proteins IHF and HU in *Escherichia coli* K12 // *Nucl. Acids Res.* 2012 V.40. P.3524-3537
292. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // *Bioinformatics.* 2012. V.28. P.1166-1167
293. Bailey T.L., Boden M., Buske F.A., Frith M., Grant C.E. et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching // *Nucl. Acids Res.* 2009. V.37. P.W202-W208
294. Ma Q., Zhang H., Mao X., Zhou C., Liu B. et al. DMINDA: an integrated web server for DNA motif analyses // *Nucl. Acids Res.* 2014. V.42: P.W12-W19.

295. Masulis I.S., Babaeva Z.S., Chernyshov S.V., Ozoline O.N. Visualizing the activity of *Escherichia coli* divergent promoters and probing their dependence on superhelical density using dual-colour fluorescent reporter vector // *Sci. Rep.* 2015. V.5. P.11449
296. Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis // *Nat. meth.* 2012. V.9. P.671-675
297. Suslov O., Steindler D.A. PCR inhibition by reverse transcriptase leads to an overestimation of amplification efficiency / *Nucl. Acids Res.* 2005. V. 33. P.e181
298. Huergo L.F. Rahman H., Ibrahimovic A., Day C.J., Korolika V. The *Campylobacter jejuni* Dps protein binds DNA in the presence of iron or hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* 2013. V.195. P.1970–1978
299. Grove A. Wilkinson S.P. Differential DNA binding and protection by dimeric and dodecameric forms of the ferritin homolog Dps from *Deinococcus radiodurans* // *J. Mol. Biol.* 2005. V.347. P.495–508
300. Chowdhury R.P., Vijayabaskar M.S., Vishveshwara S., Chatterji D. Molecular mechanism of *in vitro* oligomerization of Dps from *Mycobacterium smegmatis*: Mutations of the residues identified by “Interface cluster” analysis // *Biochemistry.* 2008. V.47. P.11110–11117
301. Goya G.F., Berquo T.S., Fonseca F.C., Morales M.P. Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles // *J. Chem. Phys.* 2003. V.94. P.3520
302. St. Pierre T.G., Bell S.H., Dickson D.P., Mann, S., Webb J. et al. Mössbauer spectroscopic studies of the cores of human, limpet and bacterial ferritins // *Biochem. Biophys. Acta.* 1986. V.870. P.127–134.
303. Walker L.R., Werthheim G.K., Jaccarino V. Interpretation of the Fe⁵⁷ isomer shift // *Phys. Rev. Lett.* 1961. V.6. P.98
304. Sayle R.A., Milner-White E.J. RasMol: Biomolecular graphics for all. // *Trends Biochem. Sci.* 1995. V.20. P.374–376
305. Panyukov V.V., Ozoline O.N., Promoters of *Escherichia coli* versus promoter islands: function and structure comparison // *PLoS One.* 2013. V.8(5). P.e62601

306. Lucchini S., Rowley G., Goldberg M.D., Hurd D., Harrison M. et al. H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria // *PLoS Pathog.* 2006. V.2(8). P.e81
307. Dorman C.J. H-NS, the genome sentinel // *Nat. Rev. Microbiol.* 2007. V. 5(2). P. 157–161
308. Keseler I.M., Collado-Vides J., Santos-Zavaleta A., Peralta-Gil M., Gama-Castro S. et al. EcoCyc: a comprehensive database of *Escherichia coli* biology// *Nucleic Acids Res.* 2011. V.39(S1). P.D583-D590
309. Tramonti A., De Canio M., De Biase D., GadX/GadW-dependent regulation of the *Escherichia coli* acid fitness island: transcriptional control at the gadY-gadW divergent promoters and identification of four novel 42 bp GadX/GadW-specific binding sites // *Mol. Microbiol.* 2008. V.70(4). P.965-982
310. Nakamura Y., Itoh T., Matsuda H., Gojobori T., Biased biological functions of horizontally transferred genes in prokaryotic genomes // *Nat. Genet.* 2004. V36(7). P.760–766
311. Langille M.G., Brinkman F.S. IslandViewer: an integrated interface for computational identification and visualization of genomic islands // *Bioinformatics.* 2009. V.25(5). P. 664–665
312. Seth D., Hausladen A., Wang Y.J., Stamler J.S., Endogenous protein S-nitrosylation in *E. coli*: regulation by OxyR // *Science.* 2012. V.336(6080) P.470-473
313. Vassinova N, Kozyrev D, A method for direct cloning of fur-regulated genes: identification of seven new fur-regulated loci in *Escherichia coli* // *Microbiology.* 2000 V.146(12) P.3171-3182
314. Koch D., Nies D.H., Grass G., The RcnRA (YohLM) system of *Escherichia coli*: a connection between nickel, cobalt and iron homeostasis // *Biometals.* 2007. V.20(5) P.759-771
315. Bueno E., Mesa S., Bedmar E.J., Richardson D.J., Delgado M.J. Bacterial adaptation of respiration from oxic to microoxic and anoxic conditions: redox control // *Antioxid. Redox. Signal.* 2012. V.16(8) P.819-852,

316. Münch R., Hiller K., Grote A., Scheer M., Klein J. et al. Virtual Footprint and PRODORIC: an integrative framework for regulon prediction in prokaryotes // *Bioinformatics*. 2005. V.21(22). P.4187–4189
317. Dornenburg J.E., DeVita A.M., Palumbo M.J., Wade J.T., Widespread antisense transcription in *Escherichia coli* // *mBio*. 2010. V.1(2). P.e00024–10
318. Salgado H., Peralta M., Gama-Castro S., Santos-Zavaleta A., Muniz-Rascado L.J. et al. RegulonDB (version 8.0): omics data sets, evolutionary conservation, regulatory phrases, cross-validated gold standards and more // *Nucleic. Acids Res.* 2013. V.41(D1). P.D203–D213
319. Shimada T., Tanaka K., Ishihama A. Transcription factor DecR (YbaO) controls detoxification of L-cysteine in *Escherichia coli* // *Microbiology*. 2016. V.162. P.1698–
320. Ishihama A., Shimada T., Yamazaki Y. Transcription profile of *Escherichia coli*: Genomic SELEX search for regulation targets of transcription factors // *Nucl. Acids Res.* 2016. V.44 P.2058-2074
321. Ivanova D., Taylor T., Smith S.L., Dimude J.U., Upton A. et al. Shaping the landscape of the *Escherichia coli* chromosome: replication-transcription encounters in cells with an ectopic replication origin // *Nucl. Acids Res.* 2015 V.43. P.7865-7877
322. Saraswathi R., Chowdhury R.P., Williams S.M., Ghatak P., Chatterji D. The mycobacterial MsDps2 protein is a nucleoid-forming DNA binding protein regulated by sigma factors sA and sB // *PLoS One*. 2009. V.4. P.e8017
323. Chowdhury R.P., Saraswathi R., Chatterji D. Mycobacterial stress regulation: The Dps «twin sister» defense mechanism and structure-function relationship // *IUBMB Life*. 2010. V.62. P.67-77
324. Gama-Castro S., Salgado H., Peralta-Gil M., Santos-Zavaleta A., Muniz-Rascado L. et al. RegulonDB version 7.0: transcriptional regulation of *Escherichia coli* K-12 integrated within genetic sensory response units (Gensor Units) // *Nucl. Acids Res.* 2011.V.39. P.D98-D105
325. Schuck P. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling // *Biophys J.* 2000. V.78(3). P.1606-19

326. Serdyuk I.N., Zaccai N.R., and Zaccai J. *Methods in Molecular Biophysics: Structure, Dynamics, Function* // Cambridge University Press, Cambridge U.K., 2007. 1120P.
327. Zamyatnin A.A. Amino Acid, Peptide, and Protein Volume in Solution // Annual Review of Biophysics and Bioengineering. 1984. V.13. P.145-165
328. Bates Utz C., Nguyen A.B., Smalley D.J., Anderson A.B., Conway T. GntP is the *Escherichia coli* Fructuronic acid transporter and belongs to the UxuR regulon // J. Bacteriol. 2004 V.186(22). P.7690-6.
329. Tutukina M.N., Potapova A.V., Vlasov P.K., Purtov Y.A., Ozoline O.N. Structural modeling of the ExuR and UxuR transcription factors of *E. coli*: search for the ligands affecting their regulatory properties // J. Biomol. Struct. Dyn. 2016 V.34(10) P.2296-304
330. Tutukina M.N., Potapova A.V., Cole J.A., Ozoline O.N. Control of hexuronate metabolism in *Escherichia coli* by the two interdependent regulators, ExuR and UxuR: derepression by heterodimer formation // Microbiology. 2016. V.162(7) P.1220-31
331. Igarashi K., Ishihama A. Bipartite functional map of the *E. coli* RNA polymerase alpha subunit: involvement of the C-terminal region in transcription activation by cAMP-CRP // Cell. 1991. V.65. P.1015-1022
332. Ohniwa R.L., Morikawa K., Kim J., Ohta T., Ishihama A. et al. Dynamic state of DNA topology is essential for genome condensation in bacteria // EMBO J. 2006. V.25 P.5591-5602
333. Ninnemann O., Koch C., Kahmann R. The *E. coli* *fis* promoter is subject to stringent control and autoregulation // EMBO J. 1992. V.11 P.1075-1083
334. Pratt T.S., Steiner T., Feldman L.S., Walker K.A., Osuna R. Deletion analysis of the *fis* promoter region in *Escherichia coli*: antagonistic effects of integration host factor and Fis // J. Bacteriol. 1997. V.179. 6367-6377