

На правах рукописи



Мелехов Владислав Викторович

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНОГО БЕЛКА DPS *Escherichia coli* С ДНК**

Специальность 03.01.02 – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Воронеж – 2018

Работа выполнена в лаборатории новых методов в биологии Института биологического приборостроения с опытным производством Российской академии наук

Научный руководитель кандидат биологических наук
Антипов Сергей Сергеевич

Официальные оппоненты: **Вихлянцев Иван Милендьевич**
доктор биологических наук, ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН», лаборатория структуры и функций мышечных белков, заведующий

Кабанов Артём Валерьевич
кандидат физико-математических наук, ООО "Инновационный центр "Бирюч - новые технологии", управление биотехнологий, ведущий биоинформатик

Ведущая организация: ФГАОУ ВО "Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского"

Защита диссертации состоится 27 апреля 2018 г. в 15:10 на заседании диссертационного совета Д212.038.03 при Воронежском государственном университете по адресу: 394018 г. Воронеж, Университетская пл., д.1, ауд. 59.

С диссертацией можно ознакомиться в зональной научной библиотеке Воронежского государственного университета и на сайте <http://www.science.vsu.ru>.

Автореферат разослан

«__»_____2018г.

Учёный секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук



Грабович Маргарита Юрьевна

Актуальность исследования

Мультифункциональный белок Dps играет важную роль в усвоении железа и ключевую роль в упаковке бактериального генома. Его мономеры формируют сферические додекамеры, способные накапливать до ~400 ионов окисленного железа во внутренней полости белка. Кроме того, каждый мономер имеет гибкий N-терминальный конец для взаимодействия с ДНК. Депонирование железа внутрь белковой полости Dps является хорошо изученным процессом, благодаря чему клетки убирают токсичные ионы Fe^{2+} от генетического материала и хранят их в легкодоступной форме.

Однако информации о способах и особенностях взаимодействия Dps с ДНК мало. Считается, что белок формирует только неспецифические комплексы с отрицательно заряженным сахаро-фосфатным остовом ДНК, тем не менее, некоторые факты говорят о способности различать генные последовательности, что подразумевает определённую специфичность [Almiron et al., 1992; Azam et al., 1999; Ceci et al., 2004; Grant et al., 1998]. Таким образом, изучение проблемы формирования упорядоченной структуры нуклеоида с участием Dps требует более детального рассмотрения с привлечением различных методологических подходов и учёта организации конкретных участков ДНК, что является актуальной фундаментальной задачей биофизики. Кроме того, структурные особенности Dps, его способность накапливать ионы железа в своей внутренней полости, а также высокое сродство к ДНК позволяют рассматривать данный белок как весьма перспективный объект для прикладных исследований.

Цель исследования

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

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

- 1) Изучить физико-химические особенности как отдельных молекул белка Dps, так и их концентрированных растворов в различных условиях;
- 2) Исследовать характер взаимодействия белка Dps как с линейными фрагментами ДНК, так и с искусственными разветвлёнными структурами ДНК и изучить морфологию полученных комплексов;
- 3) Спроектировать искусственные самособирающиеся структуры на основе ДНК и изучить их физико-химические и морфологические характеристики;

4) Изучить физико-химические свойства сформированных нуклеопротеидных комплексов Dps-ДНК, в частности, кинетику их формирования с использованием различных биофизических и биохимических методов.

Научная новизна и практическая ценность работы

Результаты диссертационной работы расширяют понимание процессов, происходящих в нуклеоиде бактериальной клетки, а именно – особенностей формирования нуклеопротеидных комплексов с участием основного архитектурного фактора бактериального нуклеоида на стационарной фазе роста *E.coli* – белка Dps. Изучены физико-химические свойства нуклеопротеидных комплексов и их компонентов с использованием разнообразных методов, в частности, атомно-силовой микроскопии, метода поверхностного плазмонного резонанса и метода задержки в геле нуклеопротеидных комплексов. Проведена оценка особенностей линейных размеров и морфологии отдельных молекул Dps, ДНК и их нуклеопротеидных комплексов. Зарегистрировано изменение гидродинамического радиуса молекул белка Dps в различных условиях, а также исследовано изменение интенсивности его флуоресценции в составе нуклеопротеида. Проведена оценка константы диссоциации Dps с фрагментами ДНК различной структуры. Получены температурные зависимости гидродинамического радиуса и собственной флуоресценции молекул в широком диапазоне температур. На основании полученных данных предложена модель, описывающая взаимодействие белка Dps с различными фрагментами ДНК. На основе исследованных нуклеопротеидных комплексов спроектированы элементарные конструкции нанометрового диапазона для решения прикладных задач.

Методы исследования

В диссертационной работе были использованы следующие методы и подходы:

1) Для экспериментов использовался штамм *E.coli* BL21*(DE3), трансформированный вектором pGEM-dps, и *E.coli* K-12;

2) Выделение и очистка белка Dps проводились при помощи ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-Сефадекс-A25 (medium), гель-фильтрации на Сефадекс-G200, после чего белок высаливался, диализовался и концентрировался на колонках Vivaspin 20;

3) Электрофоретическое фракционирование белка осуществлялось в нативных и в денатурирующих условиях (по модифицированному методу Дэвиса);

4) Амплификация фрагментов проводилась в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием соответствующих праймеров на программируемых термостатах. Праймеры были выровнены по GC-составу, поэтому программа

амплификации ДНК была одинаковой и состояла из следующих циклов: 94°C – 4 мин; 94°C – 20 сек.; 55°C – 30 сек.; 71°C – 40 сек.;

5) Фрагменты экстрагировали из геля путём вырезания соответствующего участка, затем измельчали, гомогенизировали, элюировали и осаждали. Полученную смесь центрифугировали, удаляли надосадочную жидкость, а осадок промывали 70% этанолом;

6) Оценка эффективности взаимодействия белка Dps с фрагментами ДНК осуществлялась методом задержки в геле (EMSA);

7) Окрашивание гелей нитратом серебра проводилось методом, предложенным А. Шевченко, включающим фиксацию образцов в ПААГ, сенсбилизацию, насыщение геля ионами серебра, проявление краски, остановку реакции восстановления серебра;

8) Для определения нуклеотидной последовательности экстрагированный из геля фрагмент ДНК, модифицированный [γ - ^{32}P], обрабатывался какодилатом натрия и диметилсульфатом (DMS). Продукты реакции осаждались этанолом, промывались, высушивались и растворялись в 1 М пиперидина. Пробу прогревали при 95°C, затем высушивали, растворяли и кипятили, после чего наносили на 8% ПААГ. Гель экспонировали на экран Imaging Screen K и визуализировали с помощью сканера Bio-Rad Personal Molecular Imager FX;

9) Для изучения способности фрагментов ДНК формировать изгибы двойной спирали использовалась программа DNA Tools, визуализация проводилась посредством программы RasMol;

10) Для футпринтинга 5'-концы праймеров dps_2 (5'-GGAAGATCTT CCTCGGAGAAACACT-3') и dps_3 (5'-TCCTCTAGATGTTATGTCCCAGT-3') были помечены изотопами фосфора ^{32}P при помощи полинуклеотидкиназы T4 согласно стандартному протоколу. Продукты реакции осаждали этанолом и наносили на 6% ПААГ, гель визуализировали радиоавтографически;

11) Сборка Y-образного нуклеопротеидного комплекса осуществлялась за счёт плавления одноцепочечных участков ДНК при 98°C в течение 5 минут по отдельности и смешивания их в прогретой пробирке. Далее смесь переносили на 10 минут в термостат, прогретый до 70°C, и плавно охлаждали до комнатной температуры;

12) Для подготовки образцов ДНК с одноцепочечными разрывами двойной спирали плазмиду pET28b обрабатывали никазой Nt.BspD6I согласно стандартному протоколу, после чего смесь обрабатывалась фенол-хлороформом, осаждалась этанолом, высушивалась и растворялась в воде;

13) Методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) проводилось исследование морфологии образцов и их магнитных свойств. Полученные изображения обрабатывались при помощи программного обеспечения Nova (NT-MDT, Россия);

14) Регистрация спектров флуоресценции раствора Dps и его комплексов осуществлялась на спектрофотометре Perkin Elmer 44В при длине волны возбуждения 280 нм;

15) Оценка гидродинамического радиуса молекул осуществлялась с помощью прибора Zetasizer Nano, оснащённого гелий-неоновым лазером ($\lambda=633$ нм) мощностью 4 мВт. Полученные данные обрабатывались программой Malvern Instruments;

16) Исследование кинетики формирования нуклеопротеидных комплексов Dps с фрагментами проводилось на приборе ProteOn XPR согласно протоколу производителя;

17) Для регистрации XANES-спектров раствор белка наслаивали на кремниевую подложку и высушивали. Процедуру повторяли 3-5 раз. XANES-спектры были получены на российско-германском канале (RGL) синхротрона BESSY II в Гельмгольц-центре (Берлин, Германия).

Положения, выносимые на защиту

1. Разработана и апробирована методика подготовки биологического образца для регистрации XANES-спектров в условиях, не разрушающих олигомер Dps: полученные результаты доказывают присутствие в составе неорганического ядра Dps ионов железа в различном зарядовом состоянии.

2. Показано, что белок Dps проявляет повышенное сродство к термодинамически нестабильным участкам ДНК и выявлено два новых способа их взаимодействия: с концевыми участками линейных ДНК и с точкой ветвления Y-подобных молекул.

3. Продемонстрирована возможность создания нуклеопротеидных комплексов на базе Y-подобных структур ДНК, обеспечивающих управляемую иммобилизацию Dps в их составе.

4. Предложена и обоснована модель взаимодействия белка Dps с разветвлёнными участками ДНК, учитывающая возможность формирования максимального числа контактов олигомера Dps с ДНК.

Апробация работы

Результаты работы были представлены на 5 международных и всероссийских конференциях и опубликованы в соответствующих сборниках трудов, в том числе: «Proceedings of the International Summer School on Application of Scanning Probe Microscopy in Life Sciences, Soft Matter and Nanofabrication» (Ольборг, Дания, 2013), «Современные проблемы биофизики сложных систем.

Информационно-образовательные процессы» (Воронеж, Россия, 2013), «STRANN '14» (Санкт-Петербург, Россия, 2014), «Биология – наука XXI века» (Пушино, Россия, 2013, 2014).

Публикации

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

Личный вклад автора

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

Объём и структура работы

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

Основное содержание работы

Диссертационная работа состоит из введения, трёх глав и заключения. Во введении обоснована актуальность темы диссертационной работы, сформулированы цель, задачи и методы исследования, показана научная новизна работы и её практическая значимость. Перечислены конференции, на которых представлена работа, а также приведён список публикаций по данной теме.

Первая глава представляет собой литературный обзор современного состояния проблемы, а именно: описано строение белка Dps, его особенности, приведены модели его взаимодействия с ДНК, рассмотрены прикладные аспекты использования белка Dps, различных ДНК-конструкций, а также нуклеопротеидных комплексов на их основе.

Вторая глава включает в себя описание материалов, оборудования и методов, использованных в ходе выполнения диссертационной работы. Описаны процедуры получения и очистки белка Dps, нативных и искусственных самособирающихся фрагментов ДНК, нуклеопротеидных комплексов на их основе. Описаны процедуры приготовления образцов для используемых методов исследования, а также сами методы.

В третьей главе представлены экспериментальные результаты работы. Белок Dps был проанализирован при помощи различных методов, в частности, атомно-силовой микроскопии, метода динамического светорассеяния и абсорбционной XANES-спектроскопии.

Выбор участков ДНК для оценки эффективности их взаимодействия с белком Dps. На первом этапе было проведено моделирование пространственной структуры фрагментов ДНК, содержащих регуляторную область гена *dps*, с использованием программы DNA Tool. Все три фрагмента ДНК обладали высоким содержанием А/Т-пар, что предполагает повышенную термодинамическую подвижность молекулы. Выявлено, что фрагменты *S* и *H* являются наименее изогнутыми, а фрагмент *L* – обладает максимальной способностью формировать анизотропные изгибы. Выбранные области потенциально обладают высоким сродством к Dps, что является перспективным для дальнейшего их использования в исследованиях морфологии нуклеопротеидных комплексов Dps-ДНК методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) (Рис. 1).

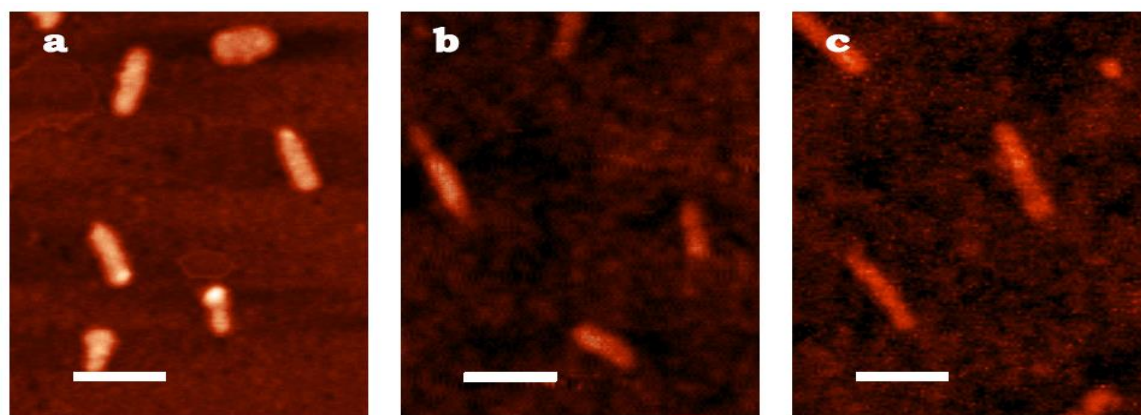


Рис. 1. АСМ-изображения фрагментов ДНК, полученные в полуконтактном режиме: а – фрагмент *H* (214 п.н.); б – фрагмент *S* (259 п.н.); в – фрагмент *L* (420 п.н.); белая черта на рисунках соответствует 100 нм

Фрагменты ДНК были получены в ПЦР, экстрагированы из ПААГ и очищены. Расчётные параметры фрагментов ДНК составляют: для фрагмента *H* – 75,3 нм, фрагмента *S* – 91,16 нм, фрагмента *L* – 147,84 нм. Анализ изображений свидетельствует, что значения высоты и длины фрагментов соответствуют расчётным величинам. Однако значение ширины ДНК несколько выше ожидаемой, что обусловлено особенностями метода АСМ.

Исследование физико-химических свойств белка Dps. На Рис. 2 приведена кривая распределения олигомерных форм Dps при 25°C, полученная методом динамического светорассеяния. Выявлено присутствие основного максимума, размер частиц которого составляет 9,7 нм. Было выявлено также незначительное количество слабо выраженных (~7,1%) пиков в области 344 нм (Рис. 2).

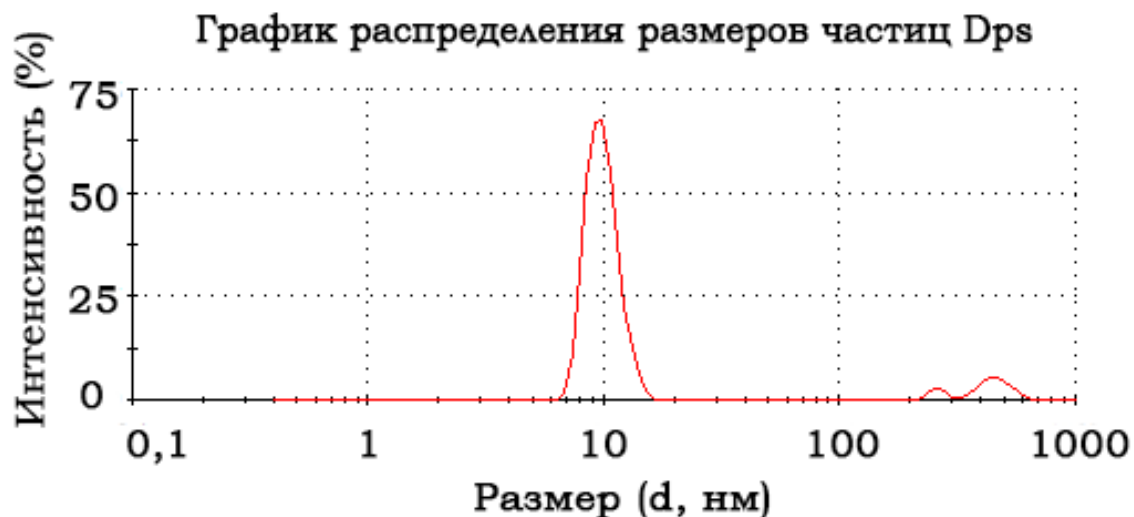


Рис. 2. Распределение размеров частиц, присутствующих в растворе нативного белка Dps при 25°C

Результаты исследования морфологии белка Dps на поверхности слюды методом АСМ приведены на Рис. 3. Выявлено, что высота наблюдаемых на поле частиц преимущественно соответствует 7 нм. При этом, как и в случае с ДНК, линейные размеры частицы в планарной проекции несколько завышены. Однако встречаются и более мелкие объекты, наличие которых может быть связано с частичной деградацией белка в процессе его высуш

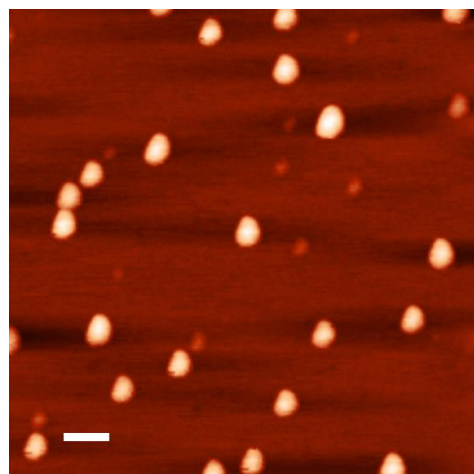


Рис. 3. Слева - пример АСМ-изображения нативного Dps (белая черта соответствует 100 нм); Справа - гистограмма распределения высот измеренных частиц белка

Установлено, что при относительно небольшом содержании ароматических аминокислот в составе мономера Dps (2 триптофана, 3 тирозина, 5 фенилаланина) он имеет характерный спектр флуоресценции с максимумом в области 332 нм (Рис. 4). Выявлено, что основной вклад в формирование спектра испускания Dps, согласно принятой классификации [Веденкина Н.С., 1970], вносит триптофан, который предположительно локализован в поверхностных слоях белковой глобулы и неполярной (внутренней) форме.

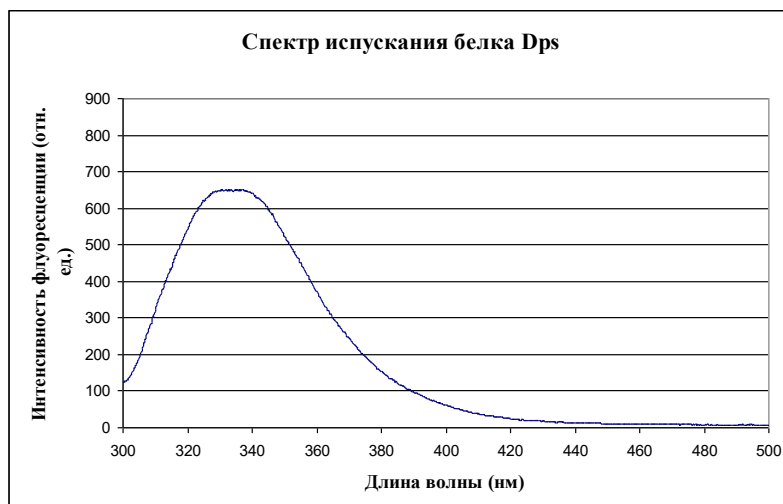


Рис. 4. Спектр флуоресценции белка Dps при 20°C

На Рис. 5 показана одна и та же область в режимах отображения рельефа (Рис. 5а) и магнитных свойств (Рис. 5b). Концентрация нанесённого на подложку белка составляет ~ 100 нг/мкл. Для наблюдения отдельных молекул Dps или их агрегатов такая концентрация избыточна, однако она позволяет сделать вывод о наличии сил магнитной природы, что может быть обусловлено содержанием ионов железа в белковой полости Dps.

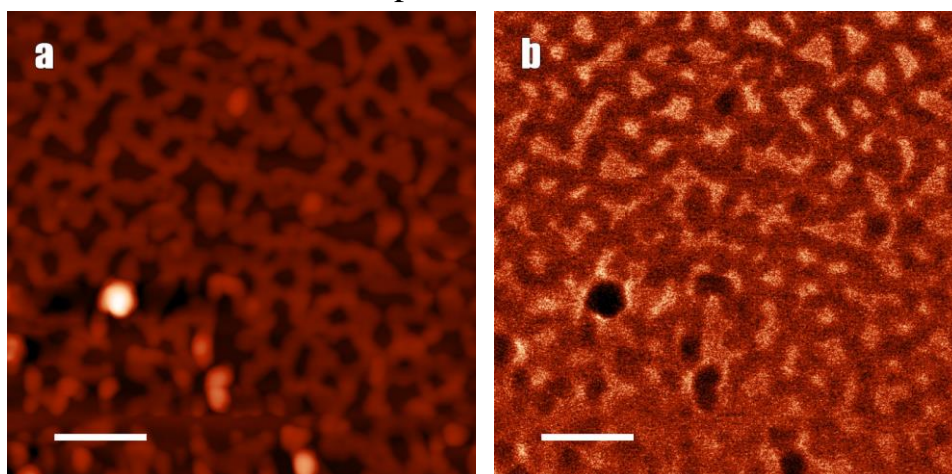


Рис. 5. а – рельеф поверхности подложки с нанесённым белком Dps; б – магнитные свойства поверхности этой подложки; белая черта на рисунках соответствует 100 нм

Изучение особенностей неорганического ядра белка Dps *E.coli*. Были зарегистрированы XANES $L_{2,3}$ -спектры эталонов Fe_2O_3 и Fe_3O_4 с использованием литературных данных о спектре FeO [Regan et al., 2001]. Результаты отражают особенности распределения тонкой структуры в зависимости от зарядового состояния ионов железа в составе FeO, Fe_2O_3 и Fe_3O_4 (Рис. 6А). Основной пик L_3 -края поглощения двухзарядного иона Fe^{2+} в FeO имеет энергию ~ 708,7 эВ. Оксиды Fe_2O_3 и Fe_3O_4 (Рис. 6А) имеют более сложную тонкую структуру краёв поглощения, обусловленную p-d- и d-d-кулоновским обменным взаимодействием электронов. Наличие двух максимумов (t_{2g} и e_g) тонкой структуры краёв L_3 и L_2 с энергией расщепления ~ 1,5 эВ обусловлено действием кристаллического поля.

Использованный способ пробоподготовки позволил зарегистрировать XANES $L_{2,3}$ -спектр железа белка Dps (Рис. 6В), содержащий $2t_{2g}$ - и $3e_g$ -края поглощения.

Тонкая структура L_3 -края железа Dps отличается от тонкой структуры всех эталонных спектров (Рис. 6А). Интенсивность $2t_{2g}$ -пика спектра Dps выше, чем у всех эталонных образцов, что свидетельствует о более сложном соотношении разнозарядных ионов в ядре Dps. Сопоставление данных выявило, что наиболее близким совпадением с XANES $L_{2,3}$ -спектром Dps обладает набор эталонов FeO и Fe₃O₄ (36 и 64%, соответственно). Это свидетельствует не только об ионах Fe³⁺, но и Fe²⁺ в октаэдрическом и тетраэдрическом окружении атомами кислорода.

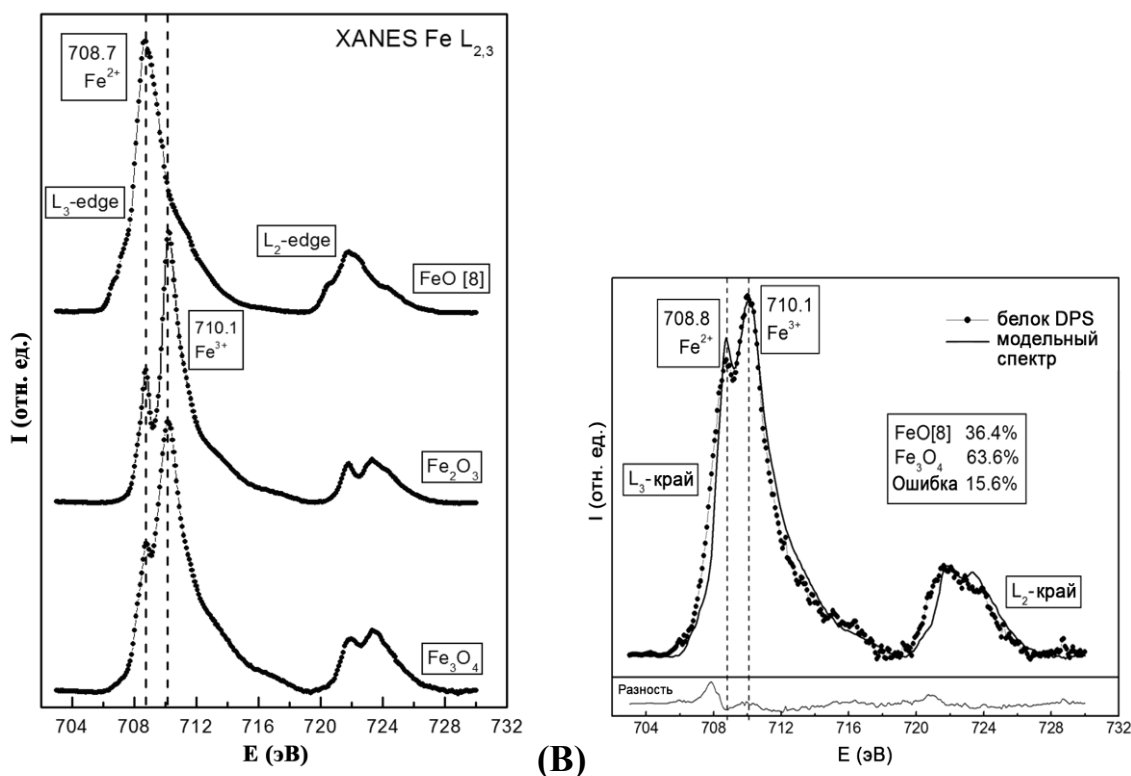


Рис. 6. (А) XANES Fe $L_{2,3}$ спектры эталонных образцов оксидов железа FeO, Fe₂O₃ и Fe₃O₄. E – энергия рентгеновского излучения (эВ), I – интенсивность рентгеновского излучения (отн.ед.). (В) XANES Fe $L_{2,3}$ -спектр белка Dps (точки) и модельный спектр (сплошная линия) совместно с результирующим вкладом выбранных спектров эталонов и разностным спектром (внизу)

Оценка сродства Dps к различным областям регуляторной области собственного гена. Для сравнительного анализа было выбрано 4 фрагмента ДНК: *L* (промоторная область *dps*), *hns-1* (промоторная область *hns*), *hns-2* (промоторная и кодирующая части *hns*) и *yeaI* («промоторного островка» *yeaI*) (Рис. 7А). Оценка способности Dps формировать нуклеопротеидные комплексы с выбранными фрагментами ДНК была проведена методом задержки ДНК-белковых комплексов в геле. Об эффективности взаимодействия Dps с ДНК судили по убыли фракции свободных фрагментов ДНК. Установлено, что все используемые фрагменты способны взаимодействовать с Dps. Однако эффективность этого взаимодействия была неравнозначна. Два А/Т-богатых

фрагмента ДНК, содержащих «промоторный островок» *yea1* и регуляторную область *dps*, имеют большее сродство к Dps, чем линейные фрагменты ДНК, содержащие кодирующие последовательности ДНК или пространство между конвергентными генами.

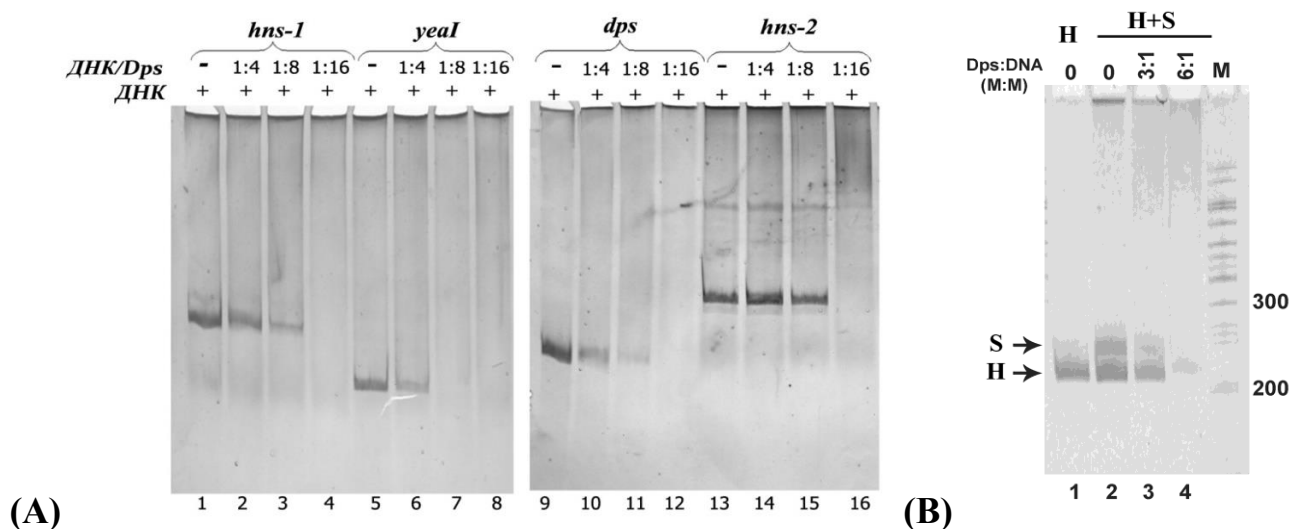


Рис. 7. (А) Дорожки 1, 5, 9 и 13 - модельные фрагменты ДНК (0,14, 0,29, 0,28 и 0,19 мкг, соответственно). Дорожки 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 14, 15 и 16 – их комплексы с белком Dps. Окраска бромистым этидием и нитратом серебра. (В) Оценка эффективности взаимодействия Dps с различными участками регуляторной области *dps* индивидуально и в условиях конкуренции за белок. Количество ДНК 1 пмоль. Перечень образцов, их молярные соотношения указаны сверху рисунка. М – маркеры длины ДНК

Для дальнейших исследований фрагмент *L* разделили на два участка (*S* – 259 п.н., *H* – 214 п.н.). Их смешивали в эквимольных концентрациях (1 пмоль/мкл), после чего с этой смесью были приготовлены комплексы. Выявлено, что в условиях конкуренции фрагмент *S*, содержащий функциональный промотор, имеет большее сродство к Dps, чем дистальная часть регуляторной области (Рис. 7В). Таким образом, структурно-функциональные особенности именно этой области являются наиболее предпочтительными мишенями для взаимодействия с Dps.

С использованием футпринтинга ДНКазой I комплексов Dps-ДНК (*L*, *S*, *H*) было обнаружено несколько гиперактивных сайтов, содержащих защищённые *dps_1* и *dps_4* -концы у обоих коротких фрагментов при использовании 10- и 5-кратного молярного избытка Dps (Рис. 8). Было выявлено лишь несколько защищённых участков в области 175-й и 113-й п.н. праймера *dps_2* и в области 120-151 праймера *dps_3*. Последнее воспроизводилось в экспериментах при формировании комплексов как с короткими фрагментами (*dps_4* – P^{32} - *dps_3*), так и с длинными (*dps_2*– P^{32} - *dps_3*), что предполагает некоторую специфичность Dps в этих областях связывания.

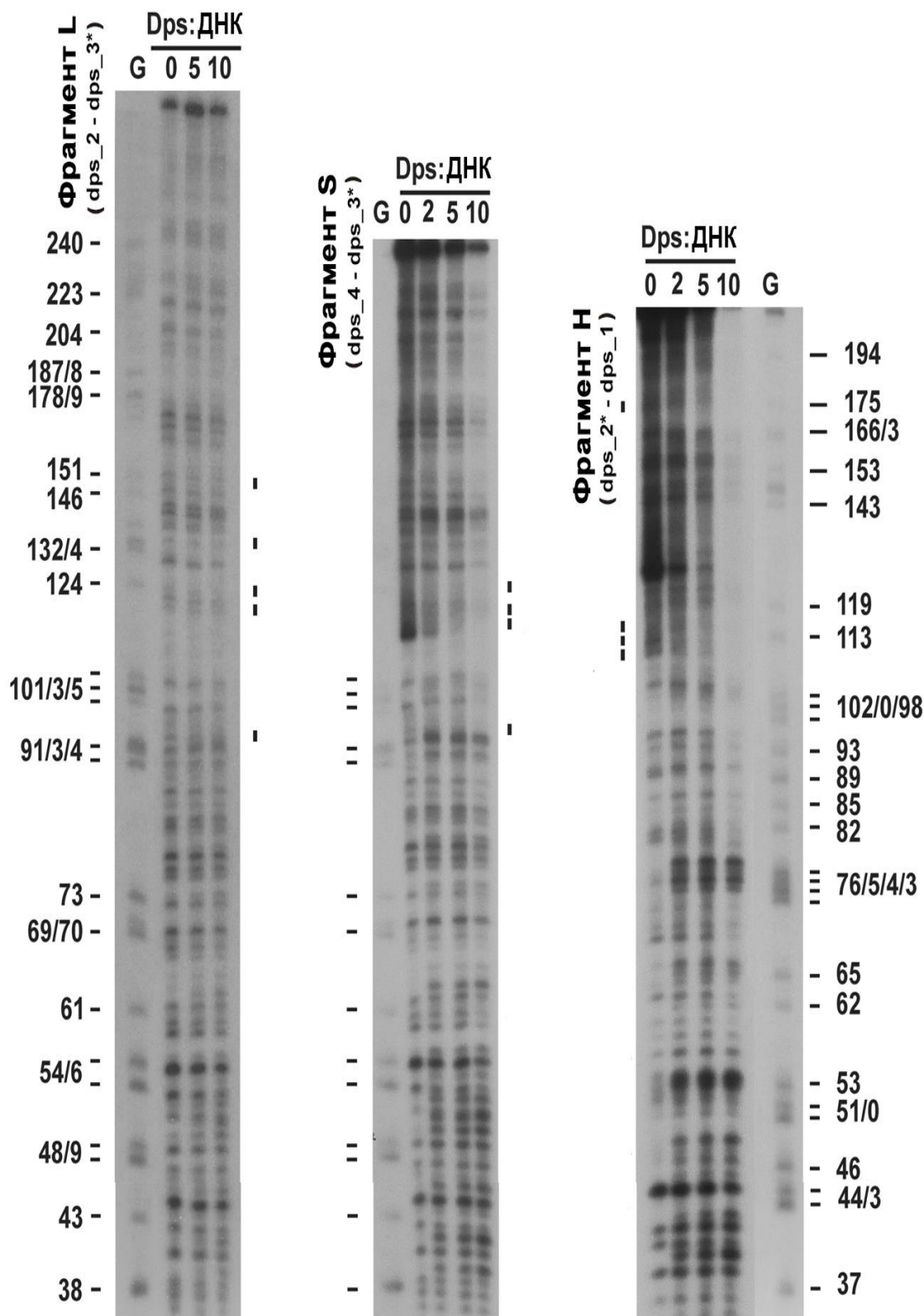


Рис. 8. Футпринт ДНКазы I, выполненный для нуклеопротеидных комплексов Dps с фрагментами ДНК L, S и H. Праймеры, меченые ^{32}P , отмечены звёздочкой

Особенности морфологии комплексов Dps с линейными фрагментами ДНК. Выявлено взаимодействие частиц Dps с концевыми участками ДНК (Рис. 9). Не было зарегистрировано формирования упорядоченных двумерных структур, гексамерных колец вокруг ДНК, нуклеосом-подобного оборачивания ДНК вокруг частиц Dps [Zeth K., 2012] и большого количества молекул Dps, взаимодействующих с одним и тем же участком линейной ДНК. Однако частицы,

по размерам соответствующие додекамерам Dps, располагались в области концевых участков фрагментов ДНК.

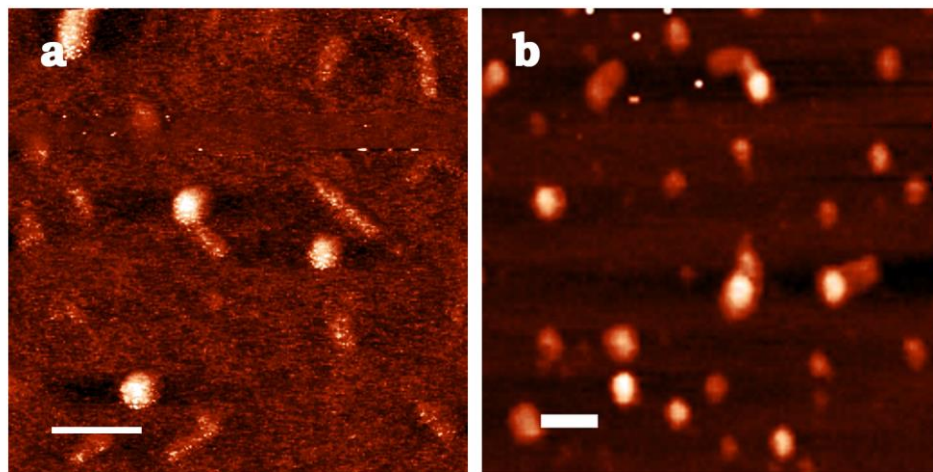


Рис. 9. АСМ-изображения комплексов Dps с ДНК: а – нуклеопротеидные комплексы, сформированные Dps с фрагментами *S* (259 п.н.); б – нуклеопротеидные комплексы, сформированные Dps с фрагментами *H* (214 п.н.); белая черта - 100 нм

Искусственные разветвлённые структуры ДНК как мишень для Dps.

Были собраны две разветвлённые структуры для изучения сродства Dps к А/Т-богатым участкам ДНК. Одна из них собрана из 2 синтетических олигонуклеотидов Y1 (57 п.н.) и Y3 (64 п.н.). Она имеет участок длиной 32 п.н. со стабильным G/C-остовом и две гибкие одноцепочечные ветви, одна из которых состоит из 25 остатков аденинов, а вторая – из 32 остатков цитозинон (Рис. 10А). Вторая структура была собрана из олигонуклеотидов Y1, Y2 и Y3 и состояла из трёх комплементарных ветвей: двух ветвей длиной 32 п.н. и одной - 25 п.н. в длину. Две длинные ветви этой молекулы состояли только из остатков гуанина и цитозина, тогда как укороченная ветвь состояла только из А/Т пар и могла быть идеальной мишенью для специфического взаимодействия (Рис. 10В).

Видимый продольный размер этих частиц составляет около 25 нм, что меньше ожидаемого для полностью развёрнутого дуплекса. Это может быть обусловлено взаимодействием 3'-концевых цитозинон олигонуклеотида Y1 не только с 5'-концевыми гуанинами из Y3, но и с другими гуанинами данной поли-G цепи, образуя смесь дуплексов различной структуры. Помимо продолговатых зёрен длиной около 25 нм были зарегистрированы более мелкие частицы длиной 13–20 нм, что соответствует размерам одиночных олигонуклеотидов. Добавление Dps меняет структуру этих зерновидных частиц так, что вместо ожидаемой конструкции наблюдали 2-4 неупорядоченных одноцепочечных участка ДНК (Рис. 10А) длиной 14–60 нм. 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.

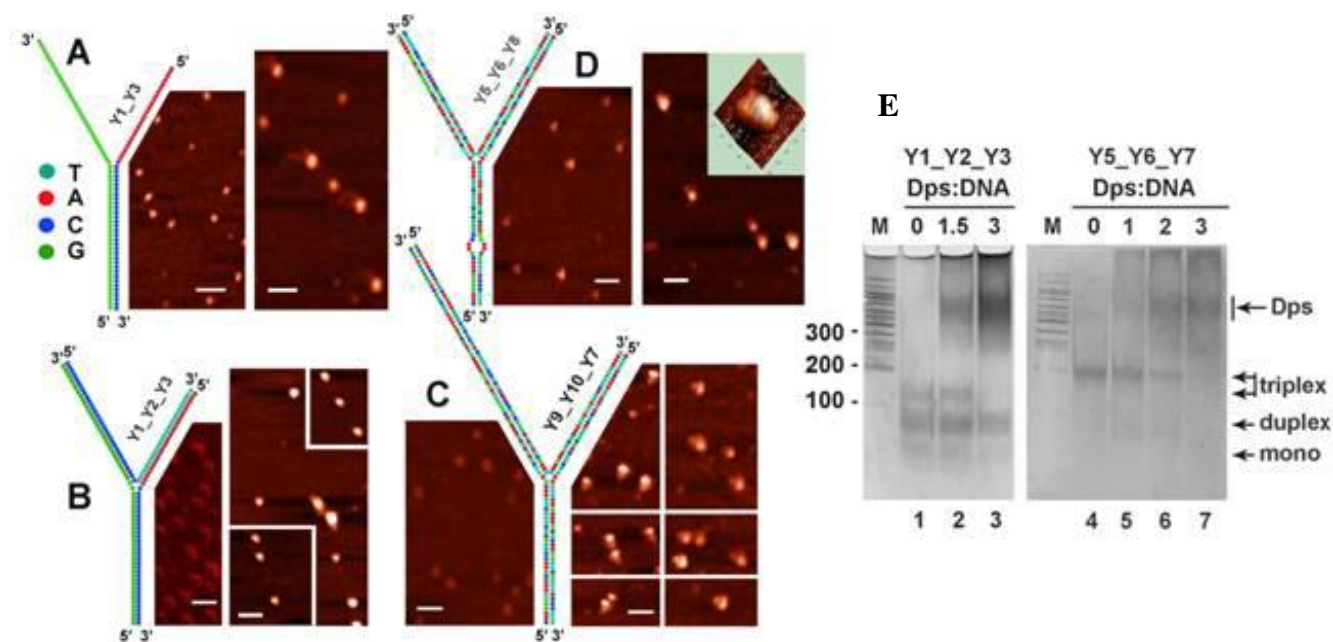


Рис. 10. (A-D) Комплексы, образованные Dps с четырьмя искусственными разветвлёнными ДНК-структурами. Конструкция приведена слева от каждого из АСМ-изображений. В центре каждой панели – АСМ изображения свободных молекул ДНК. С правой стороны – АСМ изображения нуклеопротеидных комплексов с Dps каждой из таких структур. Белая черта на рисунках соответствует 100 нм. (E) Оценка электрофоретической подвижности комплексов Dps со структурами Y1-Y2-Y3 и Y5-Y6-Y7. Комплексы формировали без предварительного фракционирования Y-структур после самосборки. М – маркеры ДНК. Окраска с помощью AgNO_3 . Состав и молярное соотношение смесей Dps-ДНК указаны над рисунком

Во всех случаях максимальная длина наблюдаемых одноцепочечных участков была больше длины одноцепочечных ветвей правильно собранного дуплекса, которая составляет 15–20 нм. Это свидетельствует о том, что первичное связывание Dps происходило с зерновидными частицами и было достаточно сильным для изменения их структуры и удерживания неупорядоченных молекул. Разветвлённые молекулы ДНК на Рис. 10В были собраны из олигонуклеотидов Y1, Y2 и Y3. При этом сама структура состояла из асимметричной V-образной области и соединённого с ней домена. Размеры этого домена достаточно близко совпадали с размерами зерновидных частиц, наблюдаемых на Рис. 10А, в то время как длина V-образной области варьировалась от 24 до 30 нм, что больше ожидаемого размера (21,8 нм). Соотношение между двумя его сторонами составляло 0,88. Короткая сторона V-образного модуля на Рис. 10В может соответствовать А/Т-ветви, тогда как G/С-ветвь конформационно скрыта. На Рис. 10В присутствует 10–20% более крупных Y-подобных объектов длиной 53–62 нм, высотой 2,6 нм.

Исследование с помощью АСМ выявило, что белок располагается только в центральной части Y-структур. Для сравнения сродства Dps к бинарным структурам и триплексам приготовили смесь из самособирающихся молекул и без дополнительного фракционирования добавили к этой смеси Dps (Рис. 10Е, дорожки 1–3). Трёхкратный избыток белка был достаточен для связывания всех триплексов, тогда как большинство дуплексов остались свободными. Было установлено, что способ взаимодействия для структуры Y1-Y2-Y3 (Рис. 10Е) не является следствием её специфической первичной структуры и/или нуклеотидной последовательности, поскольку Y-образные молекулы, собранные из олигонуклеотидов Y5, Y6 и Y7 или Y8, формировали комплексы с аналогичным расположением Dps. Эффективность самосборки этих конструкций была более высокой (Рис. 10Е, дорожка 4). Добавление двукратного молярного избытка белка приводило к увеличению количества дуплексов в смеси (Рис. 10Е, дорожка 6). Таким образом, можно сделать заключение о высоком сродстве Dps к ДНК с двуцепочечными участками. Для проверки этого заключения были использованы 2 модификации Y-подобных ДНК. В первой было добавлено 26 нуклеотидов, которые содержали сайт, защищённый Dps от воздействия ДНКазы I, на 5'-конец Y5 и 3'-конец Y6. Полученные при помощи АСМ результаты свидетельствуют, что в таком случае формируются комплексы, в которых можно отчётливо наблюдать 1 или 2 ветви ДНК, не закрытые додекамером Dps, расположенным в центральной части (Рис. 10С, правая часть). Во второй модификации Y-ДНК произвели замену двух нуклеотидов АА на ТТ в центре олигонуклеотида Y7, что привело к формированию петли в одной из ветвей (Рис. 10D). Это вызвало некоторое смещение белковой глобулы от точки ветвления молекулы ДНК (Рис. 10D). Таким образом, Dps предпочтительно взаимодействует с точками ветвления Y-ДНК.

Исследование комплексов Dps с плазмидной ДНК. Плотность связывания Dps при его 10-кратном избытке была больше на обработанной никазой плазмиде: 1 молекула на 117 ± 12 нм (длина плазмиды ~ 1917 нм). Полученные различия не являются статистически значимыми, но для плазмиды, модифицированной никазой Nt.BspD6I, они были постоянны. Тем не менее, бинарные комплексы с додекамерами Dps в обоих случаях имели схожую морфологию, но их анализ не выявил одноцепочечных участков в области взаимодействия с Dps (Рис. 11 С и D).

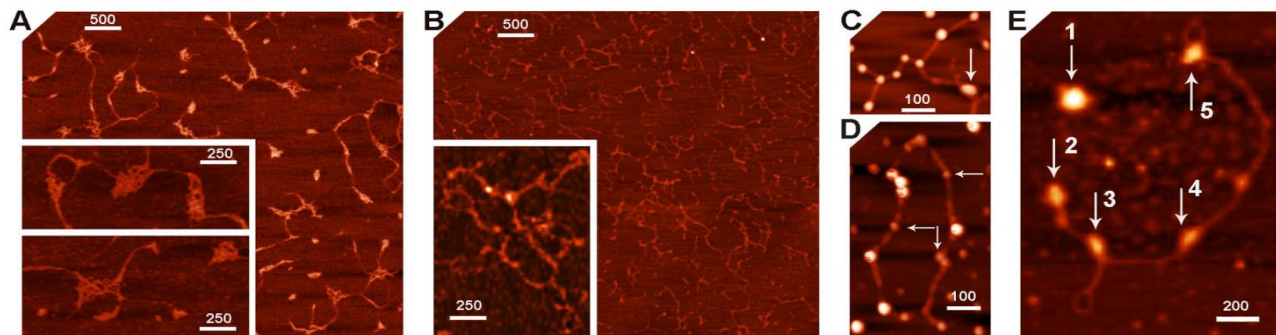


Рис. 11. АСМ-изображения нативной плазмиды (А, С) и плазмиды рЕТ28b, обработанной никазой Nt.BspD6I (В, D, E), в свободном состоянии (А, В) и в составе нуклеопротеидных комплексов с Dps (С–Е). Белая черта – шкала (нм). Горизонтальные и вертикальные стрелки указывают области формирования нуклеопротеидных комплексов с Dps и его олигомерами более низкой степени, соответственно

Для нативных и никированных образцов плазмиды примерно 15% комплексов были сформированы с частицами Dps, олигомеризация которых была меньше, чем додекамер (Рис. 11D, горизонтальные стрелки). Поэтому можно предположить, что додекамерная форма является не единственно возможной для формирования нуклеопротеидных комплексов с ДНК. Помимо этого, при взаимодействии с плазмидой, фрагментированной никазой, в большинстве случаев Dps располагался на концах двойной спирали. Таким образом, способность взаимодействовать с концами двойной спирали ДНК свойственна не только в случае их коротких линейных фрагментов. Образцы плазмиды, обработанные никазой, при этом содержали в два раза больше комплексов, образованных агрегированными или модифицированными частицами Dps, которые, как правило, были встроены в матрицу ДНК

Оценка физико-химических характеристик нуклеопротеидных комплексов белка Dps с различными фрагментами ДНК. Гидродинамический радиус Dps в растворе составляет 9–10 нм при 25°C. Повышение температуры до 55°C с шагом в 10°C практически не оказывало влияния на гидродинамический радиус белка (Рис. 12-I А). Повышение температуры до 60°C приводило к формированию одного максимума диаметром 9,6 нм (Рис. 12-I В). Дальнейшее увеличение температуры до 65°C вызывало формирование второго максимума, соответствующего размеру частицы 115,7 нм. Повышение температуры до 70°C приводило к формированию крупного агрегата диаметром 964,7 нм, что, вероятно, связано с полной денатурацией белка в результате воздействия температуры. Таким образом, выявлено, что Dps достаточно стабилен в широком диапазоне температур.

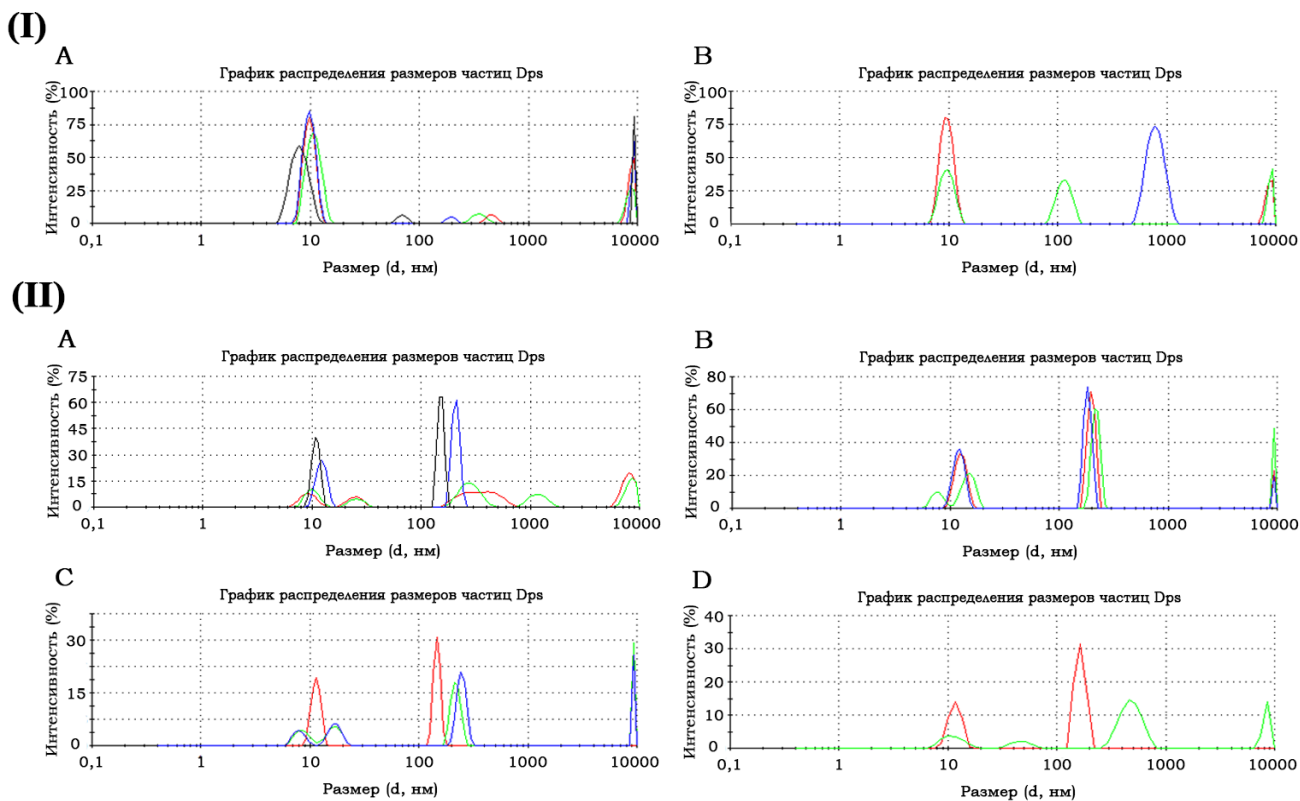


Рис. 12. (I) Распределение размеров частиц в растворе белка Dps при действии различных температур. (A): красная линия – 25°C; зелёная линия – 35°C; синяя линия – 45°C; чёрная линия – 55°C; (B): красная линия – 60°C; зелёная линия – 65°C; синяя линия – 70°C. (II) Распределение размеров частиц в растворе комплексов Dps-ДНК(H) при действии различных температур. (A): красная линия – 20°C; зелёная линия – 25°C; синяя линия – 35°C; чёрная линия – 45°C; (B): красная линия – 55°C; синяя линия – 60°C; зелёная линия – 65°C; (C): красная линия – 70°C; синяя линия – 75°C; зелёная линия – 80°C; (D): красная линия – 85°C; зелёная линия – 90°C

Для исследования размеров комплексов их готовили согласно стандартной методике с четырёхкратным избытком белка. При 20°C были зарегистрированы четыре группы частиц (6,3 – 14,2 нм; 17,6 – 34 нм; 146,2 – 780,9 нм; свыше 5190 нм). При 25°C выявлено присутствие частиц диаметром 9 нм и диаметром от 726 – 1872 нм (Рис. 12-II A), что свидетельствует о присутствии в растворе значительного количества достаточно крупных полидисперсных частиц, которые вполне могут являться нуклеопротеидными комплексами или их агрегатами.

Увеличение температуры ещё на 10°C приводит к изменению размеров частиц (Рис. 12-II B). Из четырёх групп остаются только две. Первая 9,1 – 16,4 нм с долей 37,6% от общего количества частиц в растворе. Вторая группа частиц имеет размерный диапазон 169,1 – 261 нм, что достаточно близко к размеру отдельного нуклеопротеидного комплекса, выявленного с помощью АСМ (Рис. 9). При 45°C происходит ещё большая дифференциация частиц: 8,5–13,2 нм (58,1%), 126,4–181,9 нм (42%). Нагревание раствора до 55–75°C не приводит к значительному перераспределению размеров частиц (Рис. 12-II C). Повышение

температуры до 80°C (Рис. 12-II D) привело к формированию частиц размером около 10,99 нм (43,3%), а также к уменьшению размера более крупных частиц до 135,7 нм.

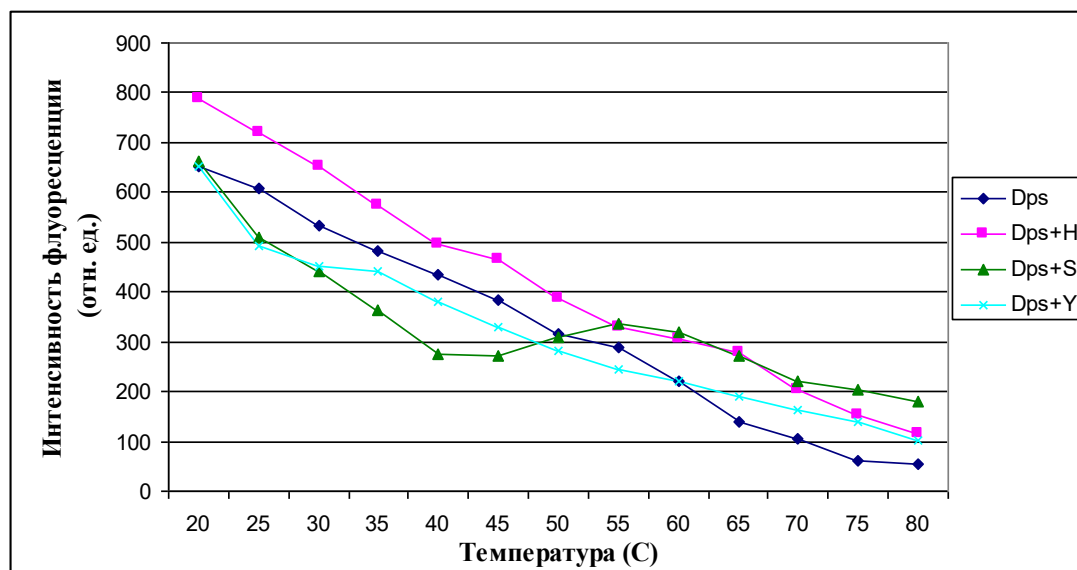


Рис. 13. Спектры флуоресценции белка Dps и его нуклеопроteidных комплексов при действии различных температур

Интенсивность флуоресценции нуклеопротеида из Dps и линейного фрагмента ДНК *H* была больше по сравнению с прочими комплексами. Максимум был сдвинут в сторону коротковолновой области. Повышение температуры приводило к снижению интенсивности флуоресценции. Спектр, зарегистрированный для комплекса, состоящего из Dps и линейного фрагмента *S*, при комнатной температуре имел интенсивность и форму, идентичную спектру, зарегистрированному для нативного белка, но при повышении температуры до 45°C его интенсивность резко снижалась, а при достижении 50°C снова наблюдалось увеличение интенсивности спектра. Это может быть обусловлено высвобождением части олигомеров из нуклеопроteidного комплекса или за счёт разрыва связей, стабилизирующих нуклеопроteid. Однако интенсивность флуоресценции этого комплекса при 80 градусах выше, чем у прочих образцов и может говорить о большем сродстве данного фрагмента к белку Dps.

Спектр, зарегистрированный для комплекса Dps и Y5-Y6-Y7, при 20°C имел максимум, близкий к таковому у нативного белка, однако не имел чётко выраженного плато и был смещён в сторону коротковолновой области. Дальнейшее повышение температуры не приводило к резкому снижению интенсивности, но пропорциональность тушения флуоресценции в зависимости от температуры была выше. Таким образом, можно сделать вывод о том, что при формировании нуклеопроteidных комплексов Dps с различными по структуре и организации молекулами ДНК происходят неравнозначные конформационные изменения белковой глобулы.

Результаты, полученные при помощи поверхностного плазмонного резонанса, свидетельствуют о том, что итоговые значения констант диссоциации отличаются на порядок и составляют: $1,48 \cdot 10^{-10}$ для разветвлённого фрагмента ДНК и $9,70 \cdot 10^{-9}$ для линейного фрагмента ДНК (Табл. 1). При этом значение критерия согласия Пирсона χ^2 для этих экспериментов составляло 4,98 и 4,77 для разветвлённых и линейных фрагментов ДНК, соответственно. Было высказано предположение, что случайное взаимодействие молекул Dps с ДНК ограничивает его подвижность в клетке, что способствует увеличению его количества в области бактериальной ДНК и стимулирует формирование белок-белковых контактов. Это хорошо объясняет образование крупных агрегатов, зарегистрированных с помощью АСМ, но не может объяснить образование высокоупорядоченных двумерных структур.

Табл. 1. Результаты исследования кинетики формирования нуклеопротеидных комплексов

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

При этом одним из необходимых условий является нахождение таких молекул на доступном расстоянии. Схематичное изображение таких способов взаимодействия приведено на Рис. 14D. Следовательно, можно сделать вывод о том, что присутствие ДНК стимулирует формирование белок-белковых взаимодействий за счёт перераспределения электростатического потенциала на поверхности глобулы Dps, что приводит к освобождению не связанных с ДНК N-концевых участков, богатых лизином.

В отсутствие ДНК N-концевые участки Dps, скорее всего, не полностью свободны и случайным образом закреплены на отрицательно заряженной поверхности Dps. В присутствии ДНК они вовлекаются в формирование электростатических контактов. Для проверки такой возможности было проведено моделирование распределения электростатического потенциала с использованием программы Swiss-PdbViewer [Gueh et al., 1997] (Рис. 14C). При пороговых значениях -12 , $-1,5$ и 0 эВ поверхность молекулы была практически полностью отрицательно заряжена. Однако использование пороговых значений -12 , $-4,8$ и 0 эВ выявило три положительно заряженных области на поверхности Dps (Рис. 14C). При этом они были расположены на расстоянии, достаточном для снижения

вероятности формирования случайных электростатических контактов между N-концевыми участками одной белковой глобулы. В присутствии ДНК одна, две или три вершины, в которых локализованы триплеты мономеров, могут высвобождать неструктурированные аминокислотные последовательности, содержащие аминокислотные остатки лизина, и, соответственно, несущие положительный заряд для формирования контакта с поверхностью соседних молекул Dps.

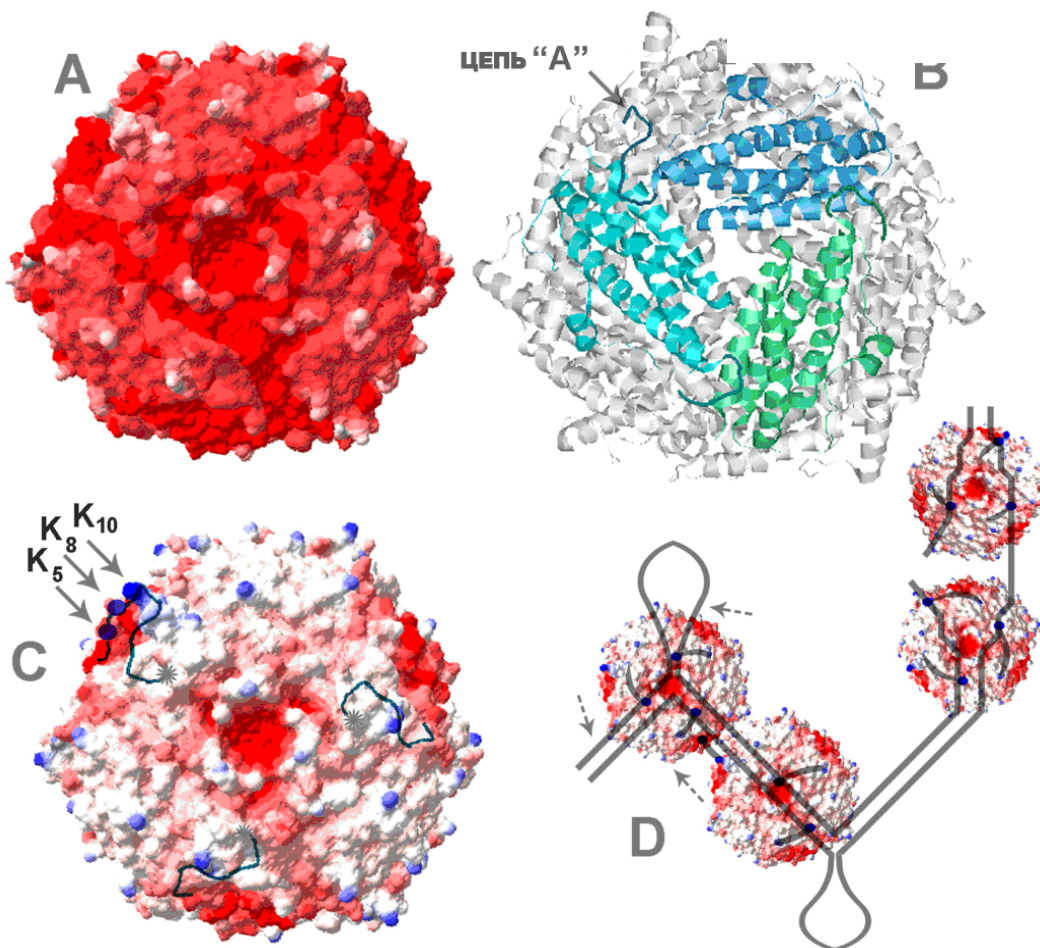


Рис. 14. Распределение электростатического потенциала (А и С) на поверхности додекамера Dps (В) и возможные способы формирования внутри и межмолекулярных контактов (Dps).

Основные выводы работы

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

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

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

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

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

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

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

Публикации по теме диссертации

1. Антипов С.С., Покусаева В.О., Мелехов В.В., Озолин О.Н. Зависимость эффективности образования нуклеопротеидных комплексов с белком Dps от физико-химических свойств ДНК // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2013 – Т.7 – с. 24–28.

2. Melekhov V.V., Shvyreva U.S., Timchenko A.A., Tutukina M.N., Preobrazhenskaya E.V., Burkova D.V., Artiukhov V.G., Ozoline O.N., Antipov S.S. Modes of *Escherichia coli* Dps Interaction with DNA as Revealed by Atomic Force Microscopy // Plos One. – 2015. – Vol. 10(5). – p.e0126504.

3. Турищев С.Ю., Антипов С.С., Новолокина Н.В., Чувенкова О.А., Мелехов В.В., Овсянников Р., Сеньковский Б.В., Тимченко А.А., Озолин О.Н., Домашевская Э.П. Синхротронные исследования в мягком рентгеновском диапазоне зарядового состояния ионов железа в ферригидритном ядре ферритина Dps *Escherichia coli* // Биофизика. – 2016. – Т.61(5). – с. 837–843.

4. Антипов С.С., Покусаева В.О., Мелехов В.В., Тимченко А.А., Артюхов В.Г., Озолин О.Н. Структурно-функциональная организация бактериоферритина Dps *E. coli* в условиях различного микроокружения // Сборник статей международной научно-методической конференции "Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы". – Воронеж. – 2013. – с.24–26.

5. Антипов С.С., Мелехов В.В., Покусаева В.О., Сергеев А.В., Тимченко А.А., Енин Г.А., Артюхов В.Г., Озолин О.Н. Изучение морфологических характеристик белка dps, фрагментов днк и их комплексов методом атомно-силовой микроскопии // Сборник тезисов 17-ой Международной Пущинской

школы-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века». – Пущино. – 2013. – с. 90–91.

6. **Melekhov V.V.**, Pokusaeva V.O., Sergeev A.V., Timchenko A.A., Enin G.A., Artyukhov V.G., Ozoline O.N., Antipov S.S. Characterization of the Dps protein, DNA fragments and nucleoprotein complexes by the atomic-force microscopy // Proceedings of the International Summer School on Application of Scanning Probe Microscopy in Life Sciences, Soft Matter and Nanofabrication", River Publishers. – Aalborg. – 2013. – ISBN (Electronic) 9788793102330.

7. **Melekhov V.V.**, Timchenko A.A., Ozoline O.N., Antipov S.S. Designing and assembling of the elementary branched structures based on Dps protein and synthetic oligonucleotids // Abstracts for the 4th International Scientific Conference State-Of-The-Art Trends Of Scientific Research Of Artificial And Natural Nanoobjects (STRANN '14), SPbSU. – Saint-Petersburg. – 2014. – p. 92–93.

8. **Мелехов В.В.**, Швырёва У.С., Тимченко А.А., Озолинъ. О.Н., Антипов С.С. Конформационные особенности нативного белка Dps, его апо-формы и насыщенного железом // Сборник тезисов 18-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века». – Пущино. – 2014. – с. 103–104.

9. Преображенская Е.В., **Мелехов В.В.**, Озолинъ О.Н., Антипов С.С. Проектирование комплекса, формирующего Y-образную структуру из трёх частично комплементарных олигонуклеотидов // Сборник тезисов 18-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века». – Пущино. – 2014. – с. 113–114.

Работы № 1, 2, 3 опубликованы в изданиях, рекомендованных перечнем ВАК.