

На правах рукописи



Антипов Сергей Сергеевич

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БЕЛКА DPS В
УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ И КОМПЛЕКСИРОВАНИЯ
С ДНК

03.01.02 – Биофизика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Воронеж – 2018

Работа выполнена на кафедре биофизики и биотехнологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет».

Научные консультанты: доктор биологических наук, профессор
Артюхов Валерий Григорьевич

доктор биологических наук, профессор
Озолин Ольга Николаевна

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

Крупянский Юрий Федорович
доктор физико-математических наук, ФГБУН «Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН», отдел строения вещества, руководитель отдела

Каменский Петр Андреевич
доктор биологических наук, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», профессор

Ведущая организация: ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН» (г. Москва)

Защита диссертации состоится «01» июня 2018 г. в «14.00» часов на заседании Диссертационного совета Д 212.038.03 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.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук



Грабович Маргарита Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В бактериальной клетке архитектура генетического материала стабилизирована двенадцатью белками нуклеоида: Dps, IHF, Fis, HU, StpA, H-Ns, CbpB, CbpA, DnaA, Lrp, IciA и Hfq. Они обеспечивают поддержание функционально-активного состояния генома и его защиту на протяжении всего жизненного цикла. Взаимодействие с ДНК может осуществляться ими за счет узнавания конкретных нуклеотидных последовательностей, особенности укладки двойной спирали ДНК или за счет формирования электростатических контактов между белком и ДНК. Их количество и пропорциональное соотношение меняется в зависимости от фазы роста. Во время экспоненциальной фазы роста клеток *E.coli* преобладает белок Fis, но при переходе в условия стационарного роста наибольшее количество молекул зарегистрировано для белка Dps. Основной олигомерной формой Dps является додекамер, который не содержит в своей структуре классических модулей для распознавания нуклеотидных последовательностей ДНК. Считается, что взаимодействие с отрицательно заряженной ДНК осуществляется за счет формирования электростатических связей с положительно заряженными остатками аминокислот, локализованных в области N-концевого участка мономеров Dps. Тем не менее, остается не ясным, каким образом осуществляется контроль упорядоченной компактизации бактериальной хромосомы с его участием.

Еще одной важной функцией Dps является способность окислять ионы Fe^{2+} с использованием H_2O_2 . В клетках эукариот эту функцию выполняют ферритины. Они состоят из 24 идентичных субъединиц формирующих белковую глобулу диаметром 12-13 нм полую внутри. В их полости может храниться до 4500 ионов железа. Для *E.coli* известно три белка, способных выполнять такую функцию: FtnA, Vfr и Dps. FtnA и Vfr - структурно гомологичны ферритинам высших организмов, в то время как Dps имеет ряд значимых отличий. Он состоит из 12 идентичных субъединиц, формирующих внутреннюю полость диаметром ~ 5 нм. Его каталитические центры окисляют два иона железа с использованием одной молекулы H_2O_2 , снижая, тем самым, эффективность реакции Фентона. Окисленное железо проникает во внутреннюю полость белка, где формируется неорганическое ядро, в состав которого может входить до 450 атомов железа. Таким образом, Dps *E.coli* имеет меньший размер по сравнению с ферритинами, а, помимо способности накапливать железо и утилизировать H_2O_2 , может еще формировать устойчивые комплексы с ДНК. Это предполагает возможность его участия в ряде клеточных процессов, в том числе в регуляции экспрессии генов.

На основании этих фактов можно сделать заключение о том, что Dps должен обладать неодинаковым сродством к различным геномным областям, но данные, подтверждающие такое предположение, отсутствуют.

Участие Dps в окислении и депонировании ионов железа позволяет рассматривать его как чрезвычайно перспективный объект для создания гибридных наночастиц с заданными характеристиками. Более того, высокое сродство Dps к ДНК в перспективе может позволить иммобилизовать его на формообразующих ДНК-матрицах, то есть в режиме самосборки создавать в пространстве любое, заранее заданное, распределение молекул. Однако вопрос о том, на какие физико-химические свойства и параметры такого процесса могут повлиять компоненты микро- и макроокружения остается открытым.

Таким образом, исследование физико-химических свойств Dps, особенностей формирования нуклеопротеидных комплексов с его участием, расширение понимания фундаментальных основ реализации его главных и вспомогательных функций, в частности участия Dps в регуляции экспрессии генов, является актуальной фундаментальной задачей. Помимо этого, данные о структурно-функциональных особенностях Dps как гибридной биоорганической наночастицы позволяют рассматривать его применение для решения прикладных задач.

Цель и задачи исследования. Целью работы явилось изучить закономерности, лежащие в основе конденсации бактериальной ДНК с участием белка Dps *E.coli* в зависимости от природы компонентов микроокружения, выявить факторы, влияющие на них, и охарактеризовать механизм распределения этого белка по бактериальной хромосоме.

В соответствии с выбранной целью, были поставлены следующие задачи:

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. Предложена и апробирована методика подготовки образцов Dps для регистрации XANES-спектров в сверхвысоковакуумных условиях, неразрушающих его олигомер. С использованием XANES - и Мёссбауэровской спектроскопии показано содержание железа в неорганическом ядре Dps как в трехвалентном, так и в двухвалентном состоянии. Доказано, что присутствие ионов Fe^{2+} вызывает формирование додекамера Dps, причем наблюдаемый эффект не опосредован изменением ионной силы раствора. Установлено влияние D-галактуроната, D-глюкуроната на олигомерную форму Dps и особенности формирования комплексов с его участием. Сопоставление результатов оценки эффективности взаимодействия Dps с ДНК выявило его неодинаковое сродство к фрагментам различного нуклеотидного состава. Установлены два новых способа взаимодействия Dps с линейными и разветвленными участками ДНК. Спроектированы элементарные, самособирающиеся Y-подобные конструкции наноразмерного диапазона, обеспечивающие управляемую иммобилизацию молекул Dps в структуре нуклеопротеидного комплекса, для решения прикладных задач. Результаты оценки термодинамических параметров нуклеопротеидных комплексов, сформированных Dps с линейными и разветвленными фрагментами ДНК, доказывают его большее сродство к Y-подобным ДНК. Полногеномный поиск сайтов связывания Dps выявил их неслучайное распределение в бактериальной хромосоме на экспоненциальной фазе роста *E.coli*. Установлено, что сайты связывания Dps перекрываются с сайтами связывания других белков нуклеоида, при этом максимальное превышение размера общих нуклеотидных последовательностей обнаружено для белка Fis. Установлено высокое сродство белка Dps к областям бактериальной хромосомы, содержащим REP-элементы, «промоторные островки» и участки ДНК, обогащенные инвертированными повторами. Показано, что делеция гена *dps* влияет на уровень экспрессии ряда генов, что указывает на его участие в регуляции экспрессии за счет конкуренции с другими белками, участвующими в этом процессе.

Практическая значимость. Проектирование и создание объектов наноразмерного диапазона на основе гибридных биоорганических материалов

представляет большой практический интерес в различных областях (нанoeлектроника, спинтроника, биотехнология, энергетика, медицины и др.). Наиболее перспективными для таких целей являются биомакромолекулы, позволяющие создавать молекулярные конструкции с заданными свойствами. На их базе вполне реалистично создание биореакторов для получения молекулярных сплавов, квантовых электроприборов, полупроводников, компактных аккумуляторов, логических элементов и молекулярных моторов.

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 также индексируемые базами данных Scopus и Web of Science, 4 статьи в сборниках международных конференций, 2 монографии. Оформлены две патентные 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.

Работа подготовлена в рамках проектов: РФФИ № 16-02-01167, РНФ 14-14-00985, «Программы повышения конкурентоспособности Балтийского федерального университета им. И. Канта».

Объём и структура диссертации. 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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе, на основании литературных данных, дана общая характеристика структурно-функциональных свойств белка Dps и выполняемых им функций, обсуждается механизм его взаимодействия с ДНК и возможности практического применения.

Глава 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объект исследования и использованные бактериальные штаммы.

В качестве объекта исследования был использован рекомбинантный белок Dps, биосинтез которого осуществляли в клетках *E.coli* BL21*(DE3), трансформированные плазмидой pGEM-*dps*. Все остальные эксперименты были проведены с использованием штамма *E.coli* K-12 MG1655. Мутант, с делетированным геном *dps*, был получен с использованием штамма *E.coli* BW25113.

2.2 Методы исследования

Выделение и очистку белка Dps осуществляли с использованием ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-Сефадекс-A25 (medium), гель-фильтрации на Сефадексе-G200, высаливания белка и его диализ. Очищенный белок концентрировали на колонках Vivaspin 20. Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии SDS проводили по модифицированному методу Дэвиса, а фракционирование в нативных условиях проводили в 5% ПААГ в присутствии 50% глицерина и красителя при напряжении 60 В до достижения фронтом нижнего края геля. Гель окрашивали бромистым этидием и нитратом серебра.

Аmplификацию фрагментов проводили в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием соответствующих праймеров. Фрагменты экстрагировали из геля путем вырезания соответствующего участка геля, его измельчения, гомогенизацию, элюцию и осаждение. Оценку эффективности взаимодействия Dps с ДНК производили методом задержки в геле (EMSA). Окрашивание гелей нитратом серебра проводили методом, предложенным в работе (Шевченко и др., 1996). Олигомерный состав раствора белка оценивали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием установки Marksk (Hitachi, Германия), оборудованной УФ-детектором, колонкой длиной (300 мм × 15 мм), заполненной Сефакрил-200 (Amersham Biosciences, Великобритания). В качестве маркеров использовали α -субъединицу РНК-полимеразы, кор-фермент РНК-полимеразы и лизоцим. Эксперименты по скоростной седиментации проводили с использованием

центрифуги Optima XL-I. Седиментацию осуществляли в би-секторных ячейках с использованием ротора An60. Полученные данные обрабатывали с использованием программы SEDFIT.

Для определения нуклеотидной последовательности фрагмент ДНК, экстрагированный из геля и модифицированный [γ - ^{32}P], обрабатывали по стандартному протоколу и фракционировали с использованием 8% ПААГ. Гель экспонировали на экран Imaging Screen K и визуализировали с помощью сканера Bio-Rad Personal Molecular Imager FX. Праймеры были помечены изотопом фосфора ^{32}P с 5'-конца при помощи полинуклеотидкиназы T4, согласно стандартному протоколу для проведения футпринтинга. Продукты реакции осаждали этанолом и наносили на 6% ПААГ, гель визуализировали радиоавтографически. Проектирование комплекса, формирующего Y-образную структуру, осуществляли по следующей схеме: плавление одноцепочечных фрагментов ДНК - 98°C (5 мин.), их смешивание при 98°C, инкубацию при 70°C (10 мин.), плавное охлаждение до комнатной температуры. Для получения одноцепочечных разрывов двойной спирали плазмиду pET28b обрабатывали нуклеазой Nt.BspD6I согласно стандартному протоколу, затем выделяли с использованием смеси фенол-хлороформ и осаждали этанолом. Наличие одноцепочечных участков оценивали по кривым плавления. Морфологию образцов исследовали на АСМ в полуконтактном режиме. Полученные изображения обрабатывались с использованием программного обеспечения Nova (NT-MDT, Россия).

Регистрацию спектров флуоресценции раствора Dps и его комплексов осуществляли на спектрофотометре Perkin Elmer 44В при длине волны возбуждения 280 нм. Определение радиуса частиц осуществлялось с помощью прибора Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Великобритания), оснащенного гелий-неоновым лазером ($\lambda=633$ нм) мощностью 4 мВт. Полученные данные обрабатывали при помощи программного обеспечения Malvern Instruments. Исследование кинетики формирования нуклеопротеидных комплексов Dps с фрагментами проводилось с использованием прибора ProteOn XPR (BioRad, США) согласно протоколу производителя.

Для получения первичных анти-Dps антител кровь кроликов через 14 дней после последней иммунизации использовали для приготовления антисыворотки. Антитела выделяли из антисыворотки с использованием ионообменной хроматографии на DEAE-Toyopearl.

Клетки *E.coli* выращивали аэробно при 37°C в жидкой питательной среде M9 до оптической плотности ~ 0.6 оптических единиц для получения и преципитации хроматина. Затем проводили сшивку белков с ДНК, разрушение клеток и выделение

участков хроматина. Библиотеки ДНК хроматина секвенировали с использованием набора NebNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit в соответствии с протоколом производителя. Распределение размера и концентрацию полученных библиотек анализировали с помощью Bioanalyzer 2100. Обработку данных осуществляли с применением программ FastQC, CLC Genomics Workbench (7.5.1), Matcher, UGENE UniPro. Выравнивание полученных прочтений проводили на актуальную версию генома *E.coli* K-12 MG1655 (U00096.3). Поиск нуклеотидной последовательности, наиболее часто встречающейся в составе сайтов связывания Dps, проводили с помощью программы MEME (4.11.2) и DMINDA по стандартному протоколу. Обогащение участков ДНК сайтами связывания различных регуляторных белков оценивали с использованием программы Virtual Footprint. Оценку уровня экспрессии генов проводили путем получения кДНК согласно стандартной методике с использованием амплификатора DTlite (ДНК-Технологии, Россия). Обработку полученных данных и статистический анализ осуществляли с использованием программы qPCR DTlite. Оценку достоверности полученных результатов проводили с использованием t-теста Стьюдента. Интенсивность флуоресценции колоний клеток, содержащих ген *gfp* регистрировали с использованием микроскопа Leica (объектив 2.5x). В качестве контроля использовали клетки, содержащие плазмиду без вставки регуляторной области гена *dps*. Обработку изображений проводили с использованием программы ImageJ.

Для регистрации XANES-спектров раствор белка 3-5 раз наслаивали на кремневую подложку и высушивали. Экспериментальные XANES-спектры были получены на российско-германском канале (RGBL) синхротрона BESSY II Гельмгольц-центра (Берлин, Германия). Для регистрации Мёсбауэровских спектров раствора Dps при температуре 77°K использовали спектрометр MS1104Em, с геометрией поглощения в режиме постоянных ускорений (- 8 мм/с). Полученные результаты обрабатывались с использованием программного обеспечения UNIVEW и стандартного теста χ^2 .

Оценку размера неорганического ядра Dps проводили с использованием микроскопа Carl Zeiss Libra 120 (Carl Zeiss AG, Германия). Для анализа полученных изображений использовали программу Altami studio 3.4. В качестве мишени для последовательного молекулярного докинга была использована модель додекамера Dps (код в Protein Data Bank: 1dps). Моделирование осуществляли с использованием программ Autodock VINA, Python Molecular Viewer (v. 1.5.6), Avogadro (1.2.0n-win32).

Глава 3. ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Dps как биосенсор и наноструктура. Динамика изменения сигнала флуоресценции свидетельствует о позитивном влиянии ЭМИ СВЧ на внутриклеточное содержание мРНК *dps* (Рис. 1), что соответствует ранее полученным данным (Antipov et al., 2005). Следовательно, регуляторные системы бактериальных клеток могут реагировать на ЭМИ, а в формировании адаптивного ответа принимает участие ферритин-подобный белок Dps, способный взаимодействовать с ДНК. Таким образом, в качестве первичного рецептора ЭМИ СВЧ может выступать додекамер Dps, содержащий неорганическое ядро и способный трансформировать полученный сигнал в изменение профиля генной экспрессии.



Рис. 1. Влияние ЭМИ СВЧ на внутриклеточное содержание мРНК гена *dps*. А) Результат статистического анализа данных с использованием программы q_PCR. В) Электрофоретический контроль полученных ампликонов. М – маркер длины ДНК (п.о.)

3.2 Исследование физико-химических характеристик белка Dps.

Несмотря на относительно небольшое число ароматических аминокислот, входящих в состав мономера, Dps имеет выраженный спектр испускания флуоресценции с максимумом в области плато 335 нм (Рис. 2А), что соответствует положению остатков триптофана в белковой глобуле в неполярной (внутренней) форме (Веденкин Н.С., 1970.). Следовательно, изменения параметров спектра будут преимущественно связаны со сменой положения именно этих остатков аминокислот в структуре олигомера.

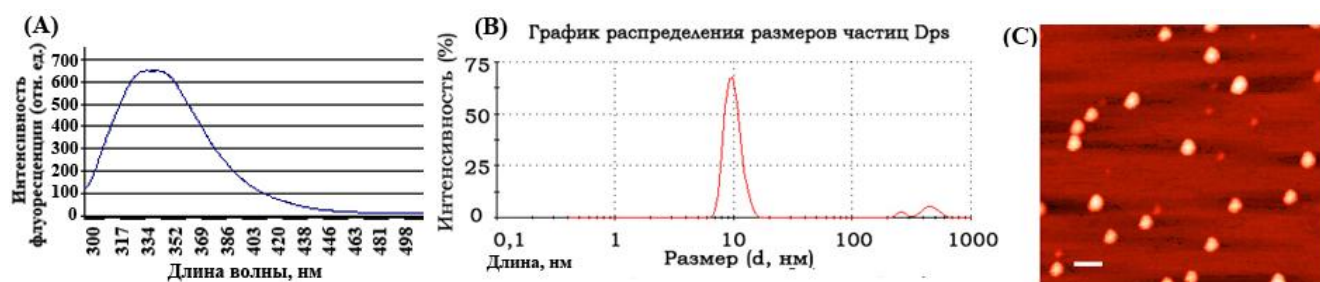


Рис. 2. Оценка характеристик белка Dps. (А) - спектр флуоресценции белка Dps при 20°C; (В) – оценка распределения размеров частиц в растворе Dps; (С) – оценка формы отдельных молекул Dps с использованием АСМ (белая черта соответствует 100 нм)

Данные, полученные методом динамического светорассеяния, свидетельствуют о наличии основного максимума, размер частиц которого составляет 9.7 нм (Рис. 2В). Кроме этого, были зарегистрированы максимумы, соответствующие размеру частиц около 300-400 нм, но их доля не превышала 7,1%. Следовательно, произведенные манипуляции в процессе выделения и очистки Dps не привели к значительным изменениям его олигомерной формы. Оценка морфологических характеристик отдельных молекул Dps (~1 нг/мкл) свидетельствуют о том, что при удалении влаги частицы преимущественно обладают размером ~ 7 нм (Рис. 2С). Также выявлены частицы, обладающие меньшими размерами, но их присутствие может быть обусловлено частичной деградацией белка в процессе высыхания. Таким образом, размер основной группы частиц белка соответствует литературным данным (Almiron et al., 1998), а различие их размеров может свидетельствовать о влиянии условий подготовки проб к АСМ. Согласно полученным седиментационным данным, основной максимум кривой распределения масс апо-формы Dps располагается в области значения ~ 220 кДа и соответствует теоретически рассчитанной величине (Рис. 3А). Для нативного белка этот же пик имеет плечо, соответствующее молекулярной массе 230 кДа (Рис. 3В).

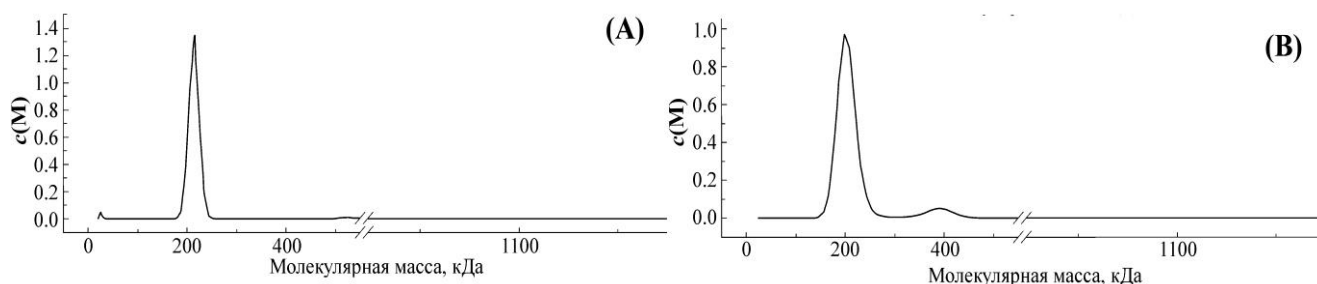


Рис. 3. Седиментационные данные апо-формы белка Dps (А) и нативного белка Dps (В) в координатах $c(M)$

Кроме этого, в эксперименте был зарегистрирован второй пик (Рис. 3В), соответствующий молекулярной массе димера додекамеров (~400 кДа). Изменение массы Dps при получении его апо-формы отражает удаление ионов железа из его внутренней полости и позволяет предполагать наличие зависимости олигомерной формы белка от присутствия ионов железа, содержание которых в олигомерах Dps может быть не одинаково и требует дополнительного анализа.

3.3 Исследования в мягком рентгеновском диапазоне зарядового состояния ионов железа в составе неорганического ядра белка Dps. Способ пробоподготовки, предложенный для регистрации спектральной кривой образца, содержащего молекулы Dps на поверхности кремния ориентации (100), позволил зарегистрировать XANES $L_{2,3}$ -спектр железа, ассоциированного с белком (Рис.

4B). В его тонкой структуре наблюдается два пика поглощения. Однако в целом тонкая структура $L_{2,3}$ -края железа, ассоциированного с Dps, отличается от тонкой структуры всех эталонных спектров (Рис. 4A).

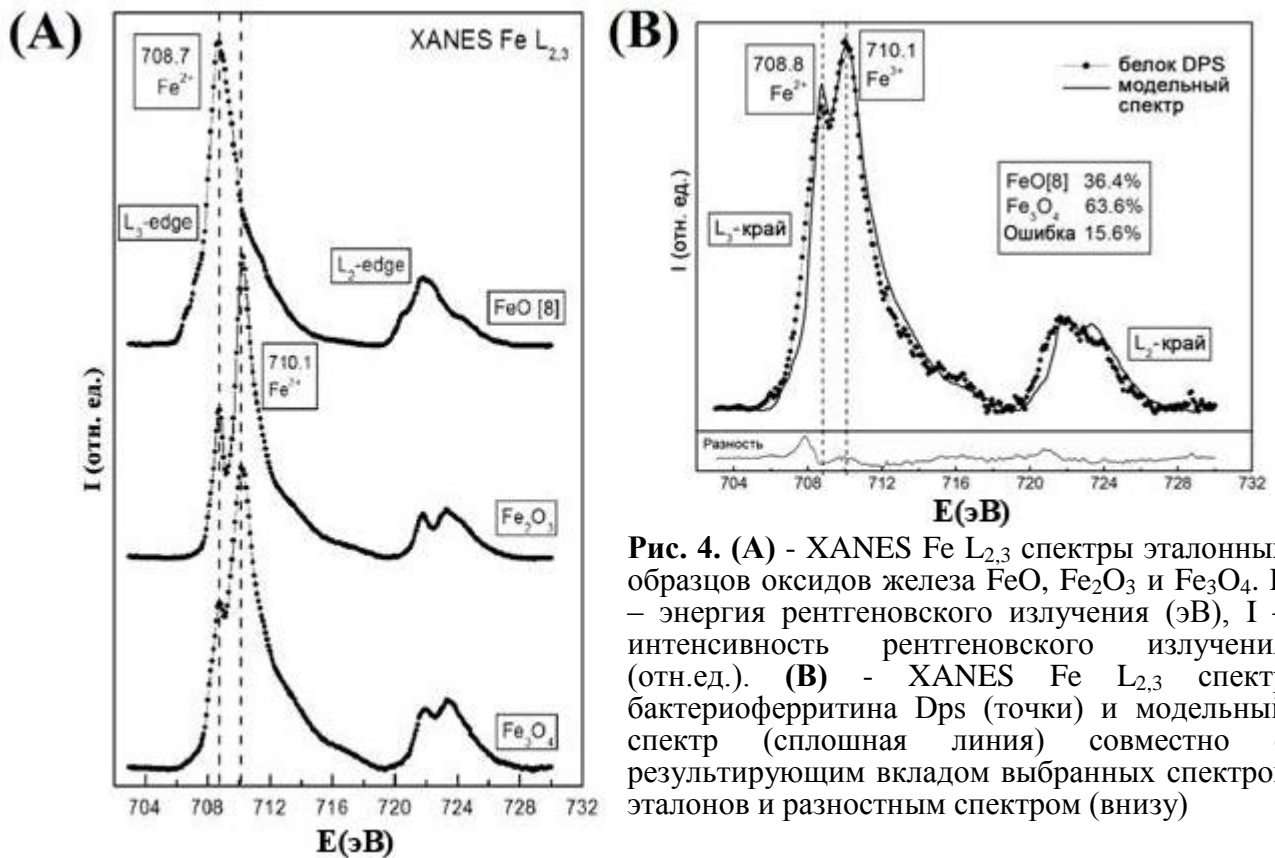


Рис. 4. (A) - XANES Fe $L_{2,3}$ спектры эталонных образцов оксидов железа FeO, Fe_2O_3 и Fe_3O_4 . E – энергия рентгеновского излучения (эВ), I – интенсивность рентгеновского излучения (отн.ед.). (B) - XANES Fe $L_{2,3}$ спектр бактериоферритина Dps (точки) и модельный спектр (сплошная линия) совместно с результирующим вкладом выбранных спектров эталонов и разностным спектром (внизу)

Стоит отметить, что интенсивность $2t_{2g}$ -пика спектра Dps выше, чем у всех использованных эталонных образцов. Это может свидетельствовать в пользу того, что соотношение разнозарядных ионов железа в неорганическом ядре Dps является более сложным. Поэтому было применено математическое моделирование спектров с использованием методики, предложенной в работах (Domashevskaya et al., 1999, Terekhov et al., 2001, Turishchev et al., 2007, 2015). В результате сопоставления экспериментальных и модельных спектров было выявлено, что наиболее близким совпадением с XANES-спектром Dps обладал набор эталонов FeO и Fe_3O_4 , вклад которых составлял 36 и 64% соответственно. Это свидетельствует о наличии в составе Dps не только Fe^{3+} , но и Fe^{2+} . 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.

3.4 Увеличение концентрации ионов железа стабилизирует додекамерную форму Dps. В результате фракционирования в нативных условиях (Рис. 5A) было выявлено несколько олигомерных форм Dps, обладающих различной электрофоретической подвижностью.

Две фракции мигрировали к аноду, одна фракция оставалась в верхней части геля, а другая мигрировала в противоположном направлении. Количество такой фракции явно увеличивалось с возрастанием концентрации $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$, и в присутствии 1 мМ соли Мора она становилась доминирующей. Однако в присутствии MgCl_2 и MnCl_2 аналогичного эффекта не было зарегистрировано (Рис. 5В). Следовательно, ионная сила не может рассматриваться как основной фактор, стимулирующий наблюдаемую олигомеризацию белка. Данные, полученные с использованием ВЭЖХ (Рис. 5С), также свидетельствуют о присутствии нескольких олигомерных форм в нативном препарате Dps.

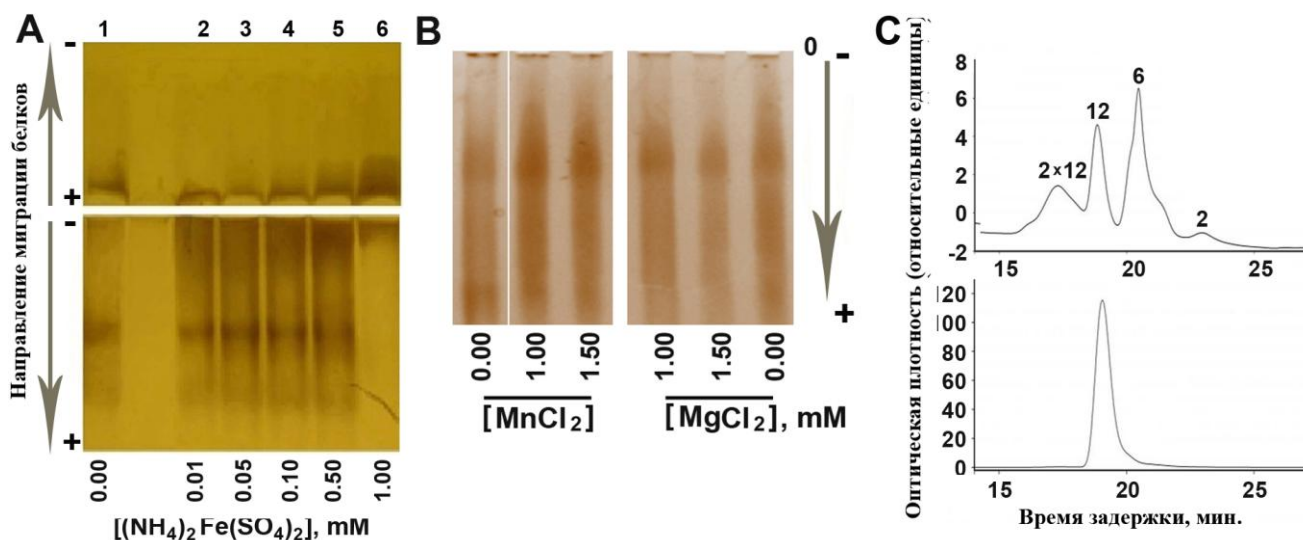


Рис. 5. А: Титрование очищенного Dps солью Мора. Дорожка 1 – нативный Dps; дорожки 2-6 – нативный Dps в присутствии 0.01-1 мМ соли Мора. Вертикальные стрелки - направление фракционирования. В: то же самое для Dps, в присутствии MnCl_2 и MgCl_2 . С: профили элюции Dps в системе ВЭЖХ для нативного Dps (верхняя панель) и насыщенного 1 мМ солью Мора (нижняя панель). Олигомерные формы указаны над соответствующими максимумами

Результаты фракционирования раствора Dps, полученные с использованием ВЭЖХ в присутствии 1мМ $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ выявили увеличение фракции, соответствующей додекамеру Dps (Рис. 5С). Это может указывать на то, что $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ воздействует на поверхность белка и ионы железа стабилизируют основную функциональную олигомерную форму. Сравнительный анализ неорганических ядер, сформированных во внутренней полости нативного Dps и белка, насыщенного ионами железа (Рис. 6) с использованием ПЭМ, выявил присутствие частиц, имеющих форму близкую к сферической. Диаметр окружностей этих частиц был не одинаковым как для раствора нативного белка, так и для раствора, содержащего Dps, насыщенный ионами железа. Частицы, обнаруженные в образцах, насыщенных железом, были в среднем больше, чем в препаратах без насыщения, но оставались гетерогенными по размерам (Рис. 6Е).

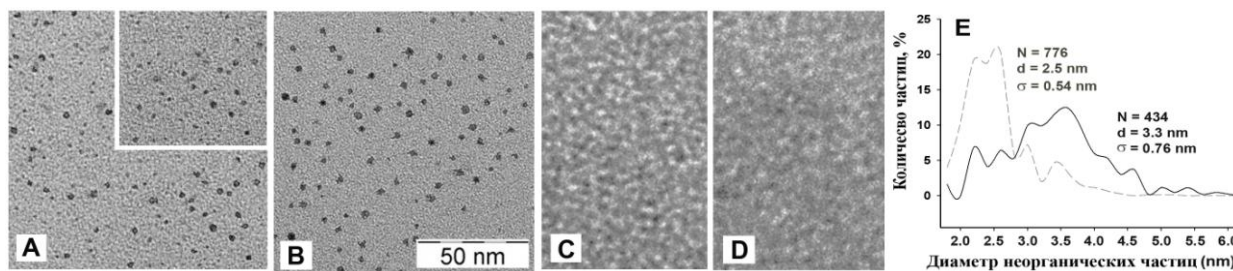


Рис. 6. ПЭМ-изображения, полученные для нативного белка Dps (A), насыщенного 1мМ соли Мора (B), его апо-формы (C), раствора, содержащего 1мМ соли Мора (D); (E) – оценка распределения частиц по размерам (пунктир – нативный Dps, сплошная – Dps, насыщенный железом. N - количество частиц, d-средний диаметр, σ – стандартное отклонение)

3.5 Мёссбауэровская спектроскопия подтвердила присутствие Fe_3O_4 в неорганическом ядре Dps. Метод Мёссбауэровской спектроскопии был использован для независимой характеристики зарядового состояния ионов железа в составе Dps. Для регистрации спектров был использован раствор белка (2.0-2.5 мг/мл). Полученные значения изомерного сдвига (δ) и квадрупольного расщепления (ΔE_Q) характерны для сферических наночастиц магнетита (Fe_3O_4) диаметром 10 нм в парамагнитном состоянии (Goza et al., 2003). Наилучшая аппроксимация Мёссбауэровских спектров для Dps была достигнута путем распределения квадрупольного расщепления с использованием линий нелоренцевой формы для пары дублетов (Табл. 1).

Таблица 1. 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
	Дуплет_2	0.27 \pm 0,02	0.62	0.22

Значение полученного изомерного сдвига относительно заселенности $3d$ $4s$ орбиталей атомов железа, связанных с внутренней полостью Dps, может быть определено как $3d^5$. Зарегистрированные спектральные параметры свидетельствуют о содержании 50-60% Fe_2O_3 от общего количества железа в исследуемых образцах. Таким образом, полученные результаты подтвердили присутствие двухвалентного железа в структуре Dps. На основании полученных данных стало ясно, что состав неорганических ядер Dps имеет более сложную, неоднородную физическую и химическую природу, чем предполагалось ранее.

3.6 Молекулярное моделирование структуры Dps в присутствии FeO и Fe_2O_3 выявило потенциальные области связывания только для Fe_2O_3 . 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. Выявленное в результате моделирования распределение 50 последовательно закрепленных молекул FeO в трехмерной структуре Dps носило случайный характер (Рис. 7В, синие линии), за исключением 12 молекул этих оксидов, обнаруженных в области локализации ферроксидазных центров. Участки связывания Fe₂O₃ (Рис. 7В, красные линии) были распределены более упорядоченно и предполагают возможность его закрепления преимущественно между двумя каталитическими центрами (Рис. 7В, желтые сферы). Эти области связывания окружены аминокислотными остатками серина и лейцина одного мономера и остатками аргинина и изолейцина другого мономера, расположенных в области центра нуклеации, но не перекрываются с ними.

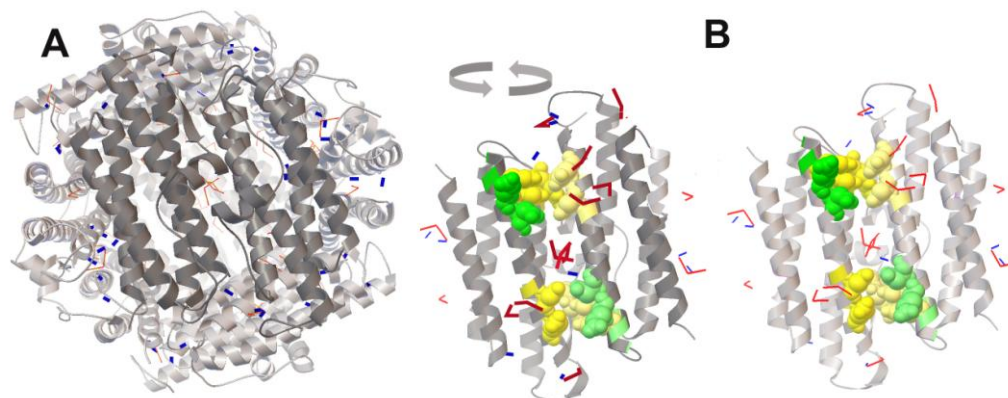


Рис. 7. Результат последовательного молекулярного докинга. Модель додекамера (А) и проекции димера Dps (В); FeO - синие линии, Fe₂O₃ - красные линии. Желтым и зеленым цветом отмечены аминокислоты ферроксидазных центров и центров нуклеации

3.7 Изучение эффективности образования нуклеопротеидных комплексов с участием белка Dps в зависимости от физико-химических свойств ДНК. Для анализа физико-химических свойств ДНК была использована полноценная регуляторная область гена *dps* (фрагмент *L*) и две ее составные части, одна из которых содержала основной промотор *dps* (фрагмент *S*), а вторая только вспомогательные (фрагмент *H*). При этом все они обладают высоким содержанием А/Т-пар. В результате моделирования их пространственной структуры с использованием программы DNA Tool установлено, что только фрагмент *L* способен формировать выраженные анизотропные изгибы. Фрагменты *S* и *H*, наоборот, можно использовать в качестве моделей относительно прямолинейных молекул. Расчетные параметры этих фрагментов ДНК составляют: высота и ширина ДНК – 2 нм, длина фрагментов: *H* – 75.3 нм, *S* – 91.16; *L* – 147.84 нм. На Рис. 8 приведены полученные АСМ-изображения этих фрагментов ДНК.

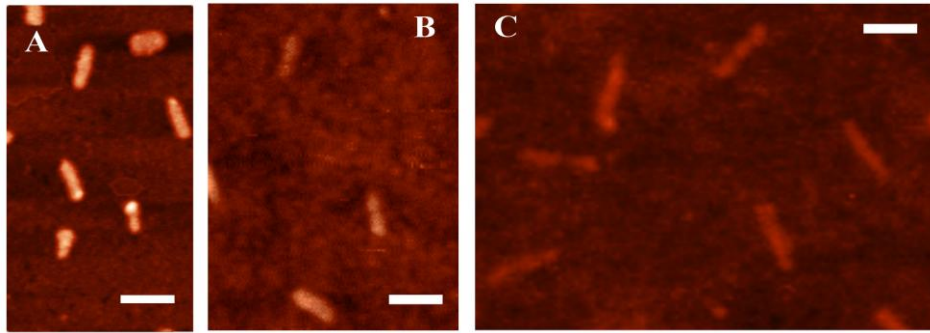


Рис. 8. АСМ-изображения фрагментов ДНК: (А) – фрагмент *H* (214 п.н.); (В) – фрагмент *S* (256 п.н.); (С) – фрагмент *L* (420 п.н.). Белая черта на рисунках соответствует 100 нм

Для оценки сродства Dps к фрагментам ДНК, обладающим различным соотношением нуклеотидов (Рис. 9А), было проведено тестирование эффективности его взаимодействия с несколькими фрагментами ДНК (ранее использованный фрагмент *L*, *yeaI* – фрагмент «*промоторного островка*», *hns-1* – промоторная область *hns*, *hns-2* – частично промоторная и частично кодирующая частью *hns*). Об эффективности взаимодействия Dps с ДНК судили по убыли фракции свободных фрагментов ДНК. Два А/Т-богатых фрагмента ДНК *yeaI* и *L*, имели более высокое сродство к Dps, чем 2 других фрагмента ДНК.

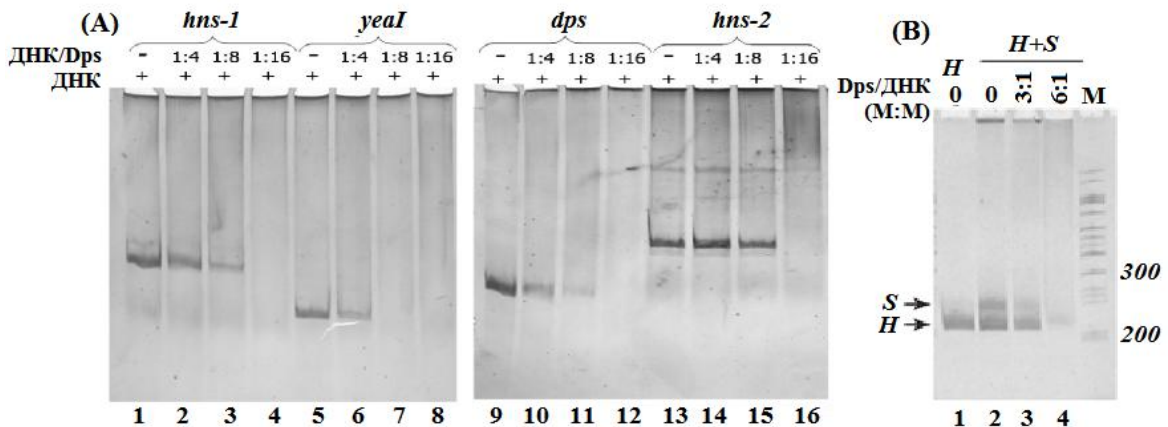


Рис. 9. (А) Оценка эффективности взаимодействия Dps с различными фрагментами ДНК. Дорожки 1, 5, 9 и 13 – фрагменты ДНК (0.14, 0.29, 0.28 и 0.19 мкг). Дорожки 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 14, 15 и 16 – их комплексы с белком Dps. Окраска гелем – бромистый этидий и нитрат серебра. (В) Оценка эффективности взаимодействия Dps с участками регуляторной области *dps* в условиях конкуренции за белок. Перечень образцов, их молярные соотношения – сверху рисунка. М – маркеры длины ДНК

Оценку сродства Dps к фрагментам ДНК *S* и *H* исследовали аналогичным способом, но в условиях конкуренции фрагментов за белок. Было выявлено, что в этих условиях фрагмент, содержащий функциональный промотор, имеет большее сродство к Dps, чем дистальная часть регуляторной области (Рис. 9В). Таким образом, физико-химические особенности именно этой области являются наиболее важными для взаимодействия с Dps. На следующем этапе была

предпринята попытка локализовать сайты связывания Dps в регуляторной области собственного гена с использованием футпринтинга ДНКазой I (Рис. 10).

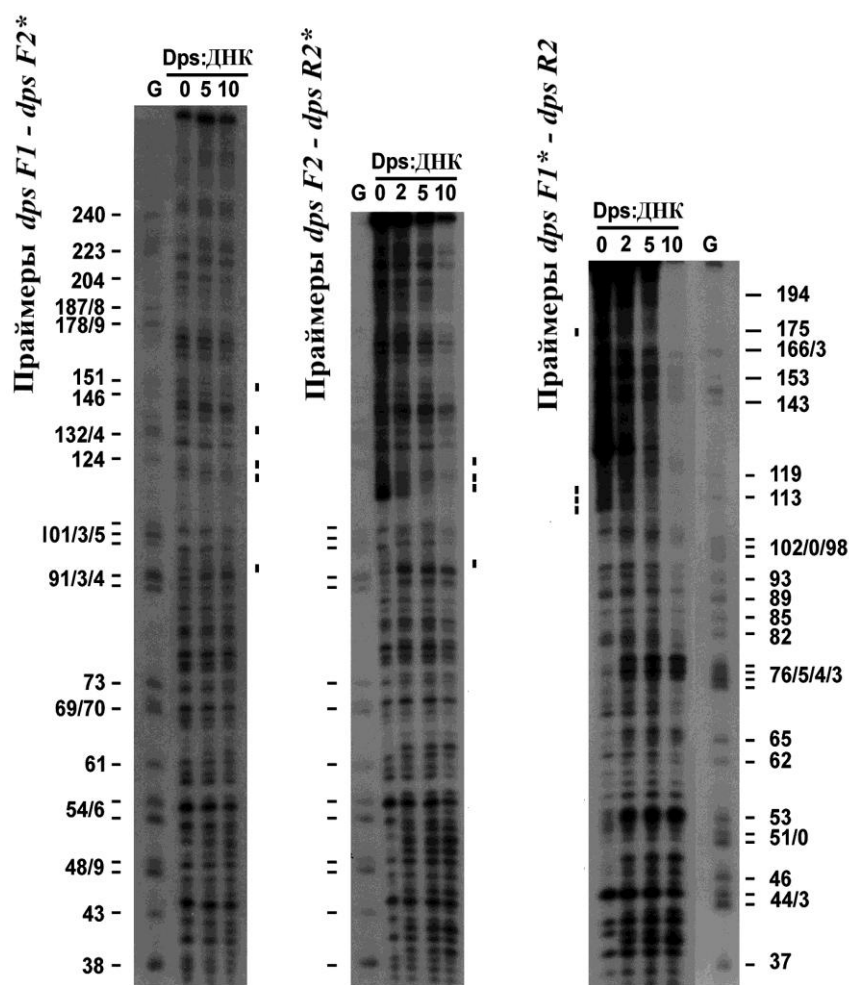


Рис. 10. Футпринтинг комплексов, формируемых Dps с фрагментами ДНК *L*, *S* и *H*. Защищённые Dps фосфодиэфирные связи отмечены вертикальными прямоугольниками. Дорожки G - секвенирование по Максаму-Гилберту. Гели прокалиброваны относительно радиоактивно меченных праймеров. Праймеры, меченные ^{32}P , отмечены звёздочкой

У фрагментов *S* и *H* при использовании 10-кратного и 5-кратного молярного избытка Dps было обнаружено несколько гиперактивных сайтов, наличие которых свидетельствует об опосредованных белком конформационных изменениях в ДНК. Кроме этого, было обнаружено несколько защищённых белком фосфодиэфирных связей (фрагмент *H* позиции 175 и 113-119, фрагменты *S* и *L* - позициях 95-124). Так как эти фрагменты были А/Т-богатыми, на следующем этапе была проведена оценка сродства Dps к «промоторным островкам», имеющим аномально высокую плотность промотор-подобных мест и А/Т-пар.

3.8 Исследование эффективности взаимодействия белка Dps с фрагментами ДНК «промоторных островков». Практически все исследуемые образцы продемонстрировали увеличение количества кДНК в клетках делеционного мутанта по *hns*. РНК, синтезируемые с «промоторного островка», ассоциированного с геном *yjgL*, были наиболее неустойчивыми. Несмотря на то, что ожидаемые транскрипты получены из конца этого гена, было

зарегистрировано увеличение их количества в 2-84 раза в мутантных клетках (Рис. 11). Аналогичная низкая стабильность продуктов транскрипции в антисмысловом направлении наблюдалась и для внутригенных антисмысловых транскриптов, тогда как для *yjgL*-мРНК в мутантных клетках было зарегистрировано их статистически значимое увеличение (Рис. 10В). В случае «*промоторного островка*», ассоциированного с геном *appY*, также было выявлено устойчивое увеличение продуктов в отсутствие *hns*, синтезированных в прямом направлении от внутреннего промотора, а также для антисмысловой РНК, транскрибируемой из кодирующей области этого гена. Для «*промоторных островков*», ассоциированных с генами *yhaC* и *yrhA*, было выявлено увеличение количества всех тестируемых продуктов в мутантных клетках.

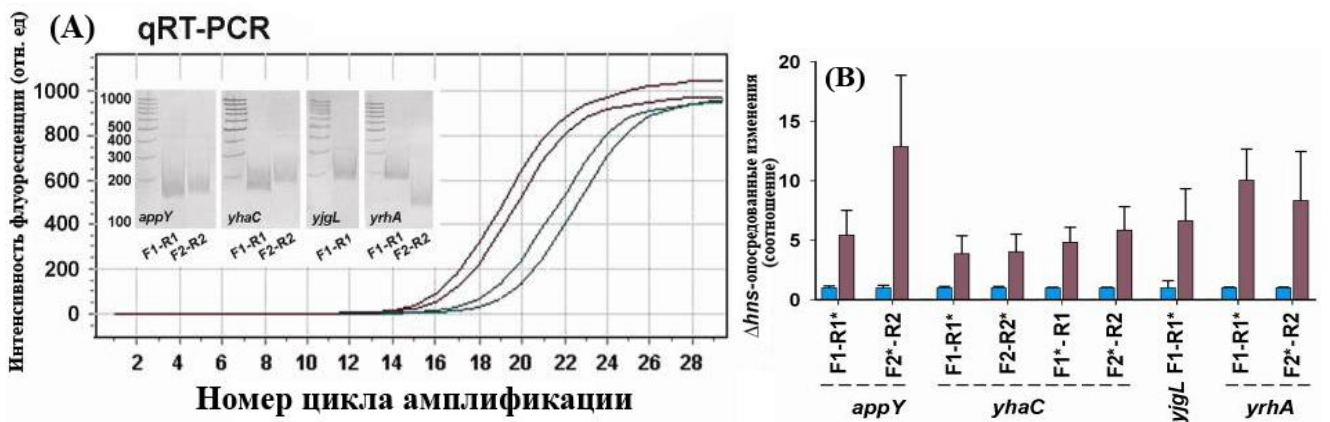


Рис. 11. Влияние H-NS на эффективность транскрипции «*промоторных островков*». (A) - результат qRT-PCR. Вставка - специфичность ПЦР. (B) - относительное количество обнаруженных РНК в образцах клеток дикого типа (голубые столбики) и мутантов (фиолетовые столбики) со статистически значимыми изменениями ($p < 0.05$). * - праймеры, использованные для обратной транскрипции

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, 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 в таких условиях. Было выявлено, что, кроме H-NS, оказывающего ингибиторное воздействие, такие области генома могут представлять собой платформу для взаимодействия с Dps. Ожидаемое увеличение продуктивности «*промоторных островков*» в делеционном мутанте было обнаружено только для РНК, транскрибируемых в прямом направлении гена *yrhA* и было статистически незначимым (рис. 12). 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* была статистически значима (Рис. 12В). Таким образом, Dps не может быть классифицирован как белок, целенаправленно ингибирующий активность «*промоторных островков*».

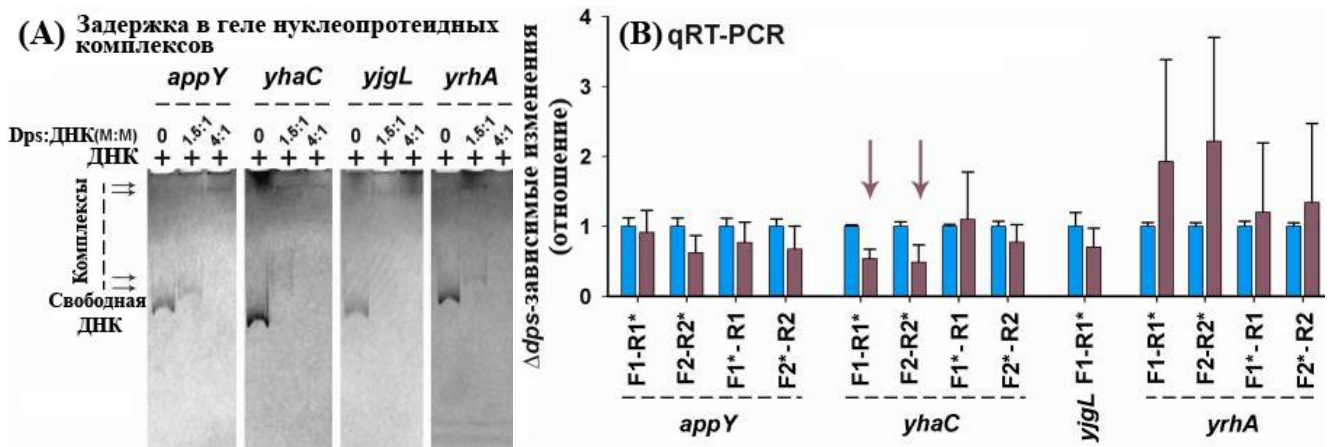


Рис. 12. (А) – фракционирование комплексов, сформированных Dps и «*промоторными островками*», ассоциированными с *appY*, *yhaC*, *yjgL* и *yrhA*; (В) - количество обнаруженных РНК в образцах, полученных из клеток дикого типа и Δdps . Стрелки - статистически значимыми изменениями транскрипции.

3.9 Особенности взаимодействия Dps с короткими линейными фрагментами ДНК. Во всех экспериментах наблюдалось взаимодействие белковых частиц с концевыми участками молекул ДНК (Рис. 13), и не было зарегистрировано формирования упорядоченных двумерных структур, выявленных ранее (Almiron et al., 1992; Frenkiel-Krispin, Minsky, 2006; Zeth 2012; Sinitsyn et al., 2017). Не наблюдалось также и формирования гексамерных колец вокруг ДНК (Almiron et al., 1992) или нуклеосом-подобного оборачивания ДНК вокруг сферических частиц Dps (Zeth 2012), что предполагается существующими моделями взаимодействия Dps с ДНК.

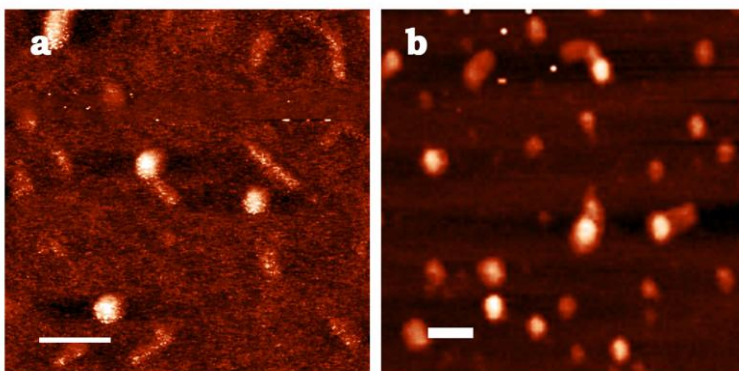


Рис. 13. АСМ-изображения комплексов Dps с ДНК: **a** – нуклеопротеидные комплексы, сформированные Dps с фрагментами *S* (259 п.о.); **b** – нуклеопротеидные комплексы, сформированные Dps с фрагментами *H* (214 п.о.); белая черта - 100нм

3.10 Влияние гексуронатов на олигомерную форму Dps и его способность взаимодействовать с линейными фрагментами ДНК. На Рис. 14 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. 14).

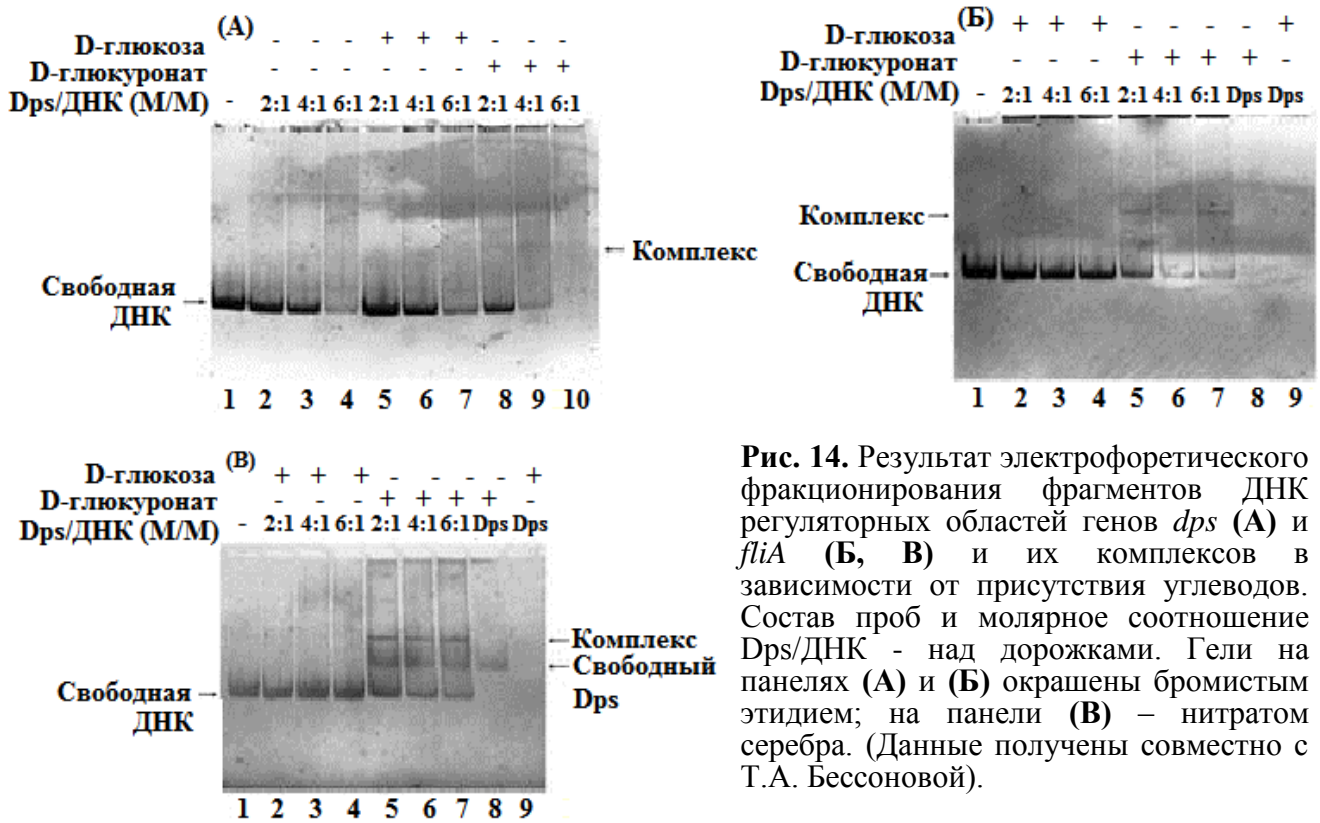


Рис. 14. Результат электрофоретического фракционирования фрагментов ДНК регуляторных областей генов *dps* (А) и *fliA* (Б, В) и их комплексов в зависимости от присутствия углеводов. Состав проб и молярное соотношение Dps/ДНК - над дорожками. Гели на панелях (А) и (Б) окрашены бромистым этидием; на панели (В) - нитратом серебра. (Данные получены совместно с Т.А. Бессоновой).

Добавление 5 мМ D-глюкозы никак не повлияло на комплексообразование. Однако введение аналогичного количества D-глюкуроната не только привело к снижению доли свободной ДНК, что свидетельствует об увеличении эффективности связывания, но и впервые для фрагмента *S* позволило зарегистрировать слабую полосу по подвижности, соответствующую 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.

Окраска геля нитратом серебра (Рис. 14В) 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. Для того чтобы убедиться в том, что дополнительная полоса, обнаруженная на дорожках 5–7 (Рис. 14Б), действительно соответствует ДНК-белковым комплексам, а не каким-то особым олигомерам Dps, способным прокрашиваться бромистым этидием, был поставлен аналогичный

эксперимент, но в качестве мишеней для конкурентного связывания Dps использовались оба фрагмента ДНК (Рис. 15А). Как и в предыдущем эксперименте, присутствие глюкозы не влияло на олигомерную форму белка и не приводило к появлению дополнительных полос на геле (Рис. 15А, дорожки 2 и 4). В присутствии глюкуроната, напротив, были зарегистрированы две полосы с подвижностью, соответствующей ожидаемым комплексам. Следовательно, можно обоснованно сделать вывод о том, что глюкуронат является функционально-активным лигандом для Dps, способным влиять на эффективность его взаимодействия с ДНК.

Также была проведена оценка влияния на структурное состояние Dps D-галактуроната, который является изомером глюкуроната. Его присутствие в растворе привело к аналогичным изменениям в белке (Рис. 15А, дорожка 5). Это означает, что гексуронаты могут изменять структурное состояние Dps и характер его взаимодействия с ДНК. Помимо этого, зависимость олигомерной формы Dps от концентрации D-глюкуроната в диапазоне от 1 до 40 мМ была исследована в специальной серии экспериментов. Было выявлено, что присутствие данного углевода в концентрации ≥ 10 мМ не приводит к дальнейшим изменениям олигомерной формы Dps (Рис. 15Б). Следовательно, концентрацию сахаров в диапазоне 5–10 мМ можно считать оптимальной для изучения закономерностей комплексообразования Dps с ДНК.

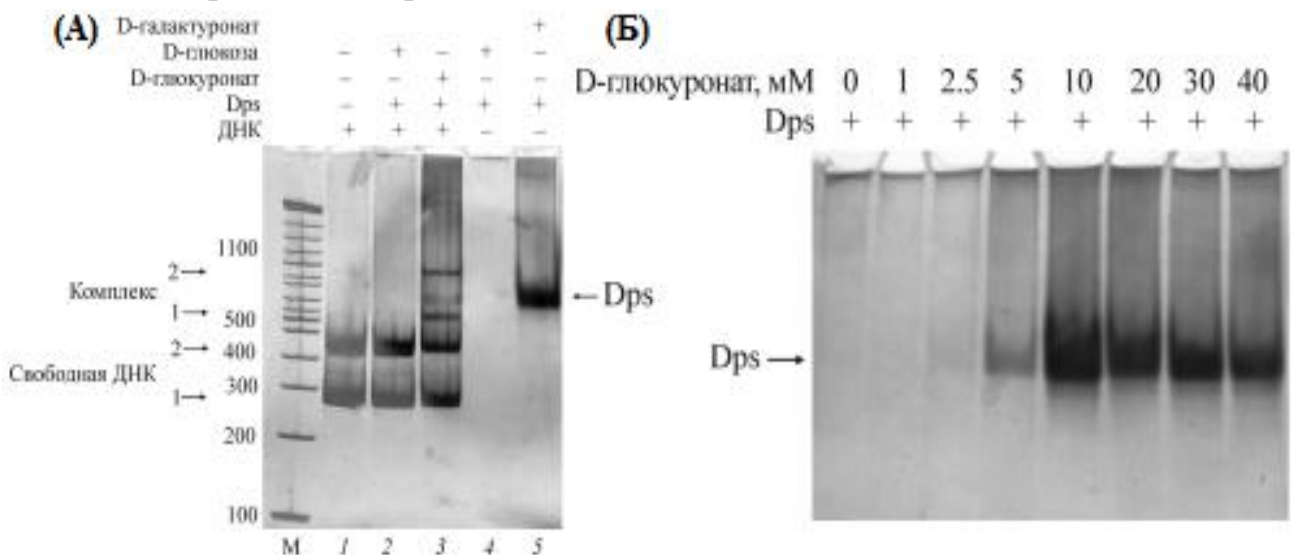


Рис. 15. (А) Зависимость олигомерной формы Dps и эффективности его взаимодействия с фрагментами ДНК от наличия углеводов. Состав проб - над дорожками. Фрагмент 1 - регуляторная область *dps*, фрагмент 2 - промоторная область *fliA*. (Б) Зависимость олигомерной формы белка Dps от концентрации D-глюкуроната. Молярная концентрация D-глюкуроната в пробах указана над дорожками. Гель окрашен нитратом серебра. (Данные получены совместно с Т.А. Бессоновой).

Чтобы понять, каким образом гексуронаты могут влиять на способность Dps к олигомеризации, был использован метод последовательного молекулярного докинга. Его результаты свидетельствуют о различиях как в расположении наиболее предпочтительных мест связывания гексуронатов по сравнению с глюкозой (Рис. 16), так и в динамике изменения свободной энергии в каждом последующем раунде докинга (Рис. 17). Для всех трёх углеводов наиболее предпочтительным местом связывания первых моделей оказалась поверхность одной из четырёх одинаковых пор, сформированных на месте стыка трёх субъединиц. 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. 17). Но на поздних раундах докинга предпочтительной областью связывания новых лигандов становилась поверхность, сформированная ранее присоединёнными моделями углеводов (Рис. 17). Подобный эффект в разной степени наблюдался для всех трёх лигандов. Показательно, что в случае D-галактуроната «затравкой» для формирования этого слоя становились молекулы лигандов, расположенные в области межсубъединичного контакта.

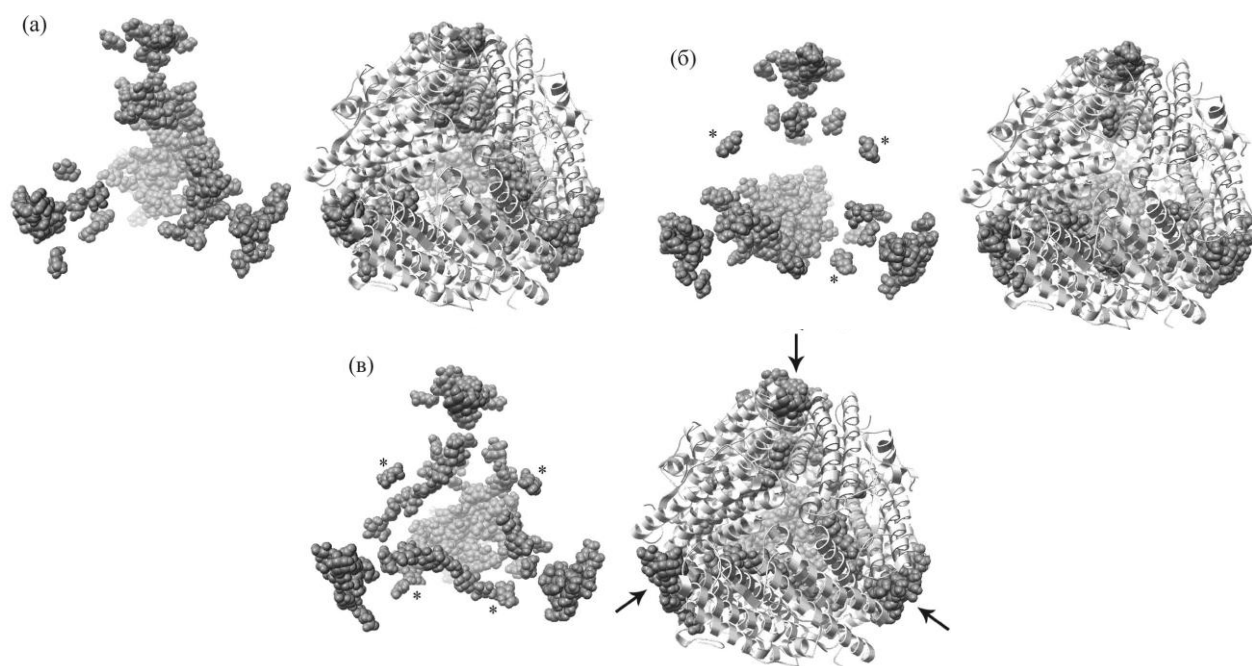


Рис. 16. Результаты молекулярного докинга α -D-глюкозы (а), D-галактуроната (б), D-глюкуроната (в) с додекамером Dps. Справа приведены белок-углеводные комплексы на последних стадиях докинга. Стрелками показаны порообразующие вершины. Слева - углеводная часть комплексов. Лиганды, попавшие на стык двух субъединиц, на переднем плане отмечены звездочками. (Результаты получены совместно с Ю.А. Пуртовым)

В случае α -D-глюкозы связывание происходило на большем пространстве полости белка и аффинность потенциального связывания изменялась при этом меньше. Таким образом, экспериментально обнаружено взаимодействие D-глюкуроната и D-галактуроната с Dps и доказано влияние именно этих углеводов на олигомерную форму белка. Данные молекулярного докинга свидетельствуют о встраивании D-глюкуроната и D-галактуроната в область межсубъединичных контактов Dps. Следовательно, углеводы могут играть роль кофакторов Dps, модулирующих его ДНК-связывающую активность, в том числе при конденсации и деконденсации генома.



Рис. 17. 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)

3.11 Самособирающиеся Y-подобные разветвлённые структуры ДНК как наиболее оптимальная мишень для взаимодействия с Dps. Было собрано две разветвлённые структуры с А/Т-богатыми участками ДНК. Первая состояла из двух синтетических олигонуклеотидов Y1 и Y3. Она имела комплементарный участок длиной 32 п.о. с однородным G/C-остовом и две гибкие одноцепочечные ветви (25 аденозинов, 32 цитидинов). 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. Две более длинные ветви этой молекулы состояли только из остатков гуанина и цитозина, а укороченная - состояла только из А/Т пар (10.88нм) и задумывалась как идеальная мишень для «концевого»

взаимодействия с Dps. Видимый продольный размер этих частиц составляет около 25 нм, что меньше ожидаемого для длинной грани полностью развёрнутого дуплекса (29.8 нм). Помимо частиц зерноподобной формы (~ 25 нм), были зарегистрированы более мелкие частицы (13–20 нм), что соответствует размерам одиночных олигонуклеотидов. Добавление Dps приводило к изменению структуры этих зерноподобных частиц так, что вместо ожидаемой конструкции, наблюдали 2–4 неупорядоченных одноцепочечных участка ДНК (Рис. 18А) длиной 14–60 нм.

Молекулы ДНК, собранные из олигонуклеотидов Y1, Y2 и Y3, состояли из асимметричного V-образного участка соединенного с маленьким доменом. Размеры V-образного модуля варьировали в пределах 24–30 нм, что несколько больше ожидаемого размера (21.8 нм), а соотношение его сторон составляло 0.88, что близко к расчётному значению. Фракционирование структур, полученных с использованием олигонуклеотидов Y1-Y2-Y3, выявило две полосы, которые могут соответствовать триплексам и дуплексам (Рис. 18А). При этом фракционирование олигомерных структур Y5-Y6-Y7 свидетельствовало об очень высокой эффективности самосборки триплекса (Рис. 18D). В присутствии Dps большинство крупных агрегатов, обнаруженных АСМ, разрушалось (Рис. 18В). Однозначный ответ на вопрос о сродстве Dps к триплексам или дуплексам был получен в эксперименте, показанном на Рис. 18Е: из их смеси, полученной в процессе малоэффективной сборки конструкции Y1-Y2-Y3, Dps с большим предпочтением выбирал триплексы. Основываясь на этих данных, была выдвинута гипотеза, что Dps может взаимодействовать с одноцепочечной ДНК и даже разрушать двойную спираль.

Собранные из олигонуклеотидов с природными нуклеотидными последовательностями Y5, Y6 и Y7 или Y8, формировали нуклеопротеидные комплексы с центральным расположением додекамера Dps (Рис. 18D). Для проверки предположения о сродстве Dps к участкам, содержащим одноцепочечные разрывы или сайт защиты от воздействия ДНКазы I, были дополнительно спроектированы две самособирающиеся Y-подобные конструкции. Первая содержала сайт защиты от ДНКазы I, а вторая петлю из двух не комплементарных нуклеотидов. Для первой структуры было зарегистрировано формирование комплексов, в которых можно отчётливо наблюдать одну или две ветви ДНК, не закрытые додекамером Dps (Рис. 18С). Во второй модификации было выявлено некоторое смещение белковой глобулы от точки ветвления молекулы ДНК (Рис. 18D). 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.

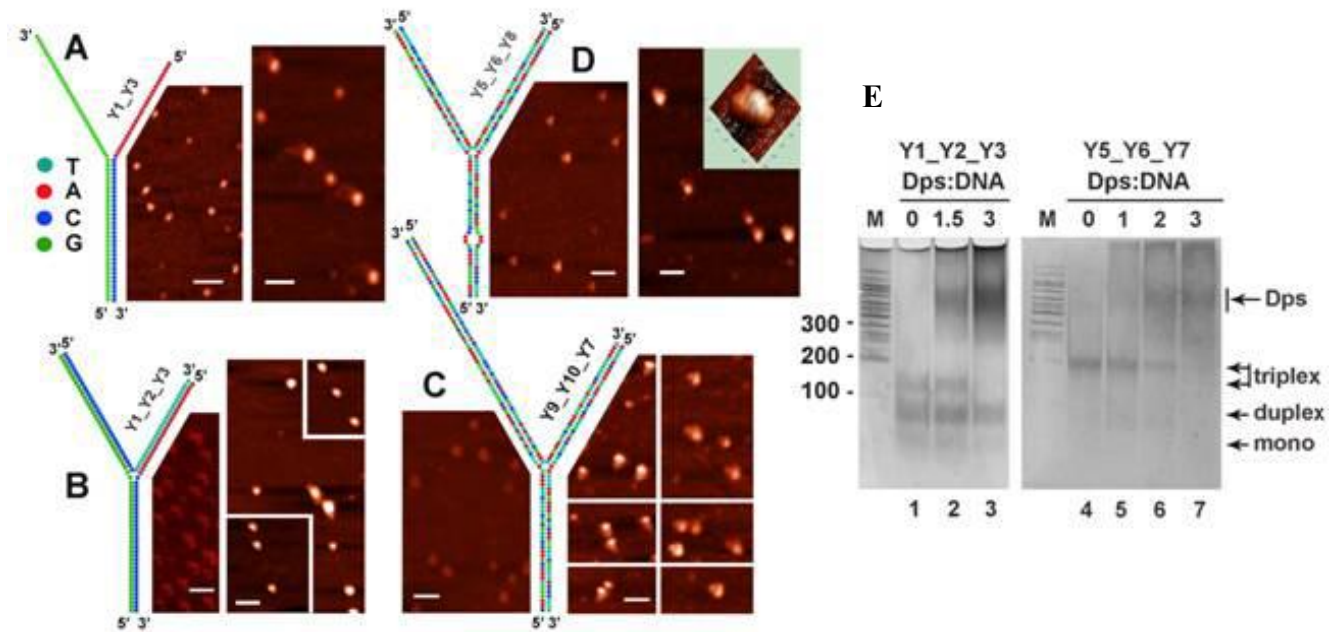


Рис. 18. (A-D) Комплексы, образованные Dps с искусственными разветвлёнными ДНК-структурами. Схема конструкции - слева от каждого АСМ-изображения. В центре каждой панели – АСМ-изображения свободных молекул ДНК. С правой стороны – АСМ-изображения нуклеопротеидных комплексов с Dps. Белая черта - 100 нм. Е Оценка электрофоретической подвижности комплексов Dps со структурами Y1-Y2-Y3 и Y5-Y6-Y7. М – маркеры ДНК. Окраска с помощью AgNO_3 . Состав и молярное соотношение смесей Dps-ДНК - над рисунком

3.12 Исследование возможности формирования одноцепочечных участков в нативной ДНК с участием Dps. Очищенная плаزمида pET28b была обработана сайт-специфичной нуклеазой 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 (Machulin et al., 2012), в результате чего плаزمиды релаксируют и даже могут фрагментироваться (Рис. 19В). После такой подготовки плазмиды к её раствору добавляли Dps в 5- и 10-кратном молярном избытке. Плотность расположения Dps при его 10-кратном избытке была больше на плазмиде, обработанной нуклеазой по сравнению с нативной (одна молекула на каждые 117 ± 12 нм). При этом бинарные комплексы, сформированные с додекамерами Dps, в обоих случаях имели схожую морфологию. Было выявлено наличие одноцепочечных участков в области взаимодействия (Рис. 19С и 19D). Для нативных и никированных образцов плазмиды примерно 15% комплексов были сформированы с частицами Dps, степень олигомеризации которых была меньше, чем додекамер (Рис. 19D). Поэтому можно предположить, что додекамер не является единственно возможной формой 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).

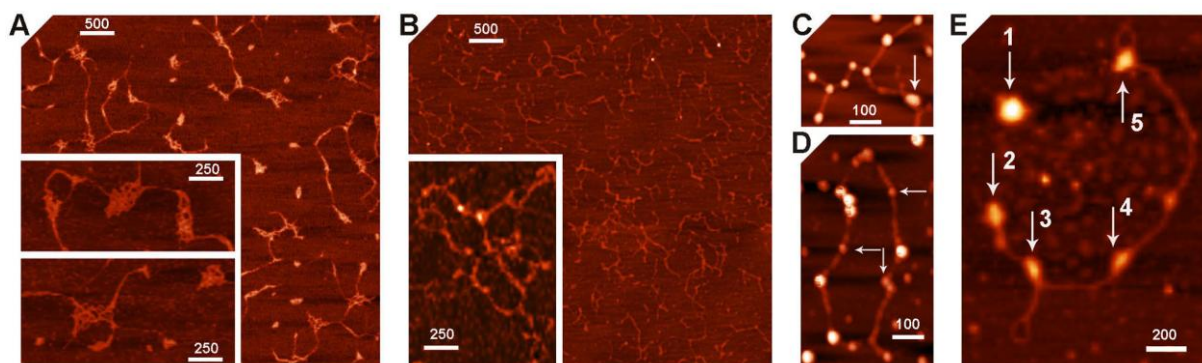


Рис. 19. Изображения, полученные с помощью АСМ для нативной плазмиды (А, С) и плазмиды рЕТ28b, обработанной сайт-специфичной никазой Nt.BspD6I (В, D, Е), в свободном состоянии (А, В) и в составе нуклеопротеидных комплексов с Dps (С–Е). Белая черта – шкала (нм). Горизонтальные и вертикальные стрелки (С–Е) - области формирования нуклеопротеидных комплексов с олигомерами Dps.

3.13 Оценка термодинамических и конформационных свойств Dps в составе нуклеопротеидного комплекса, включающего фрагменты ДНК с различной структурной организацией. Результаты экспериментальных исследований показали, что гидродинамический радиус молекул Dps составляет 9–10 нм (Рис. 2). Повышение температуры раствора до 55°C с шагом в 10°C практически не оказывало на него влияния (Рис. 20(I)A). Повышение температуры до 60°C привело к формированию единственного максимума, соответствующего величине 9.6 нм (Рис. 20(I)B), дальнейшее увеличение температуры до 65°C сопровождалось формированием второго выраженного максимума, соответствующего 115.7 нм, что свидетельствует о начале агрегации белка. При достижении 70°C наблюдалось формирование крупного агрегата диаметром ~ 964.7 нм, что, вероятнее всего, связано с полной денатурацией белка.

При 20°C было зарегистрировано четыре типа частиц в растворе после формирования комплексов Dps-ДНК. Первый тип имел средний диаметр ~ 9.1 нм, второй тип ~ 25.4 нм, третий тип ~ 405 нм, а четвёртый – свыше 1000 нм. Повышение температуры до 25°C (Рис. 20(II)A) не вызывало глобальных изменений в пропорции вышеперечисленных типов частиц, однако, приводило к разделению частиц третьего типа на две группы. Увеличение температуры ещё на 10°C приводило к значительному изменению размеров частиц (Рис. 20(II)A), а повышение температуры до 45°C приводило к ещё большей дифференциации частиц на группы. Размеры частиц первой группы составляют 8.5–13.2 нм (42%),

а второй 126.4–181.9 нм (58.1%). Учитывая средний размер частиц первой группы (10.8 нм), можно сделать предположение о том, что она преимущественно состоит из молекул белка, не связавшихся с ДНК. Наибольшее количество частиц второй группы имеет средний размер 151.8 нм, что достаточно близко к размеру использованных фрагментов ДНК.

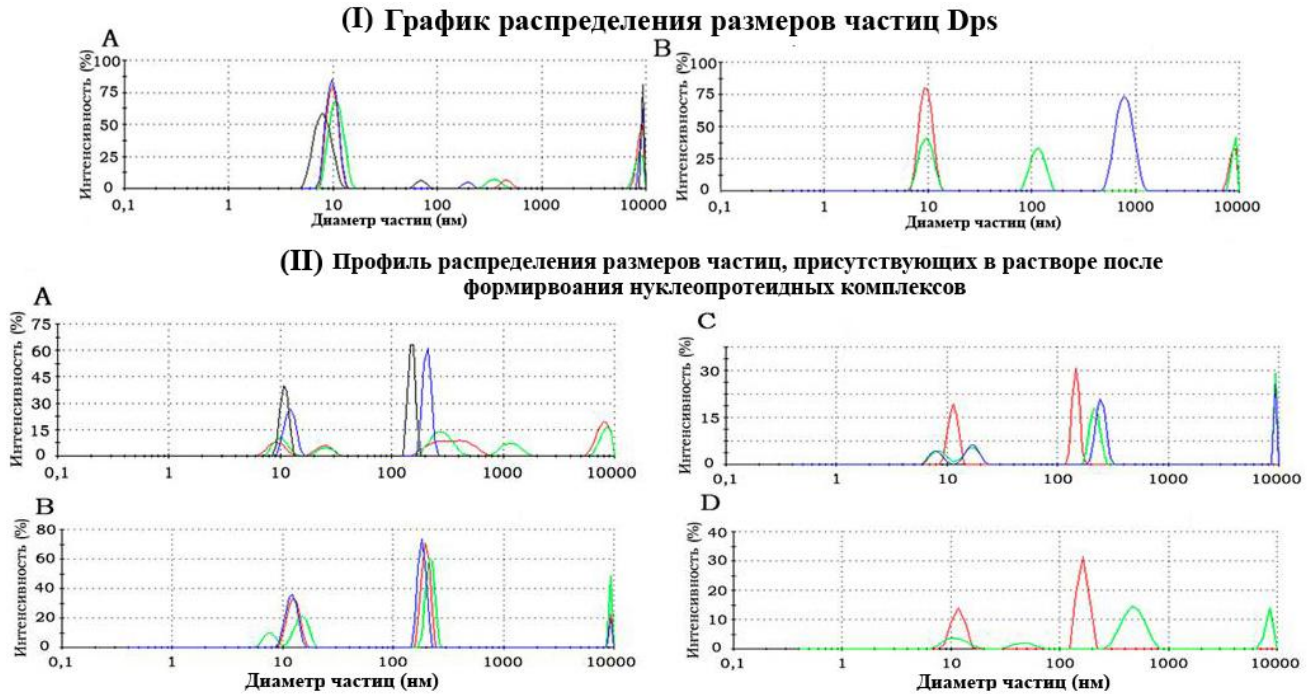


Рис. 20. (I) Распределение размеров частиц в растворе белка Dps при действии различных температур. (A): красная линия – 25°C; зелёная линия – 35°C; синяя линия – 45°C; чёрная линия – 55°C; (B): красная линия – 60°C; зелёная линия – 65°C; синяя линия – 70°C. (II) Распределение размеров частиц в растворе 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

Нагревание раствора до 75°C не приводит к значительному перераспределению размеров частиц (Рис. 20(II)C). При этом не удалось зарегистрировать агрегаты радиусом ~ 1000 нм, обнаруженные для чистого белка в таких же условиях (Рис. 20B). Увеличение температуры до 80-85°C (Рис. 20(II)D) вызывало формирование частиц размером около 109.9 нм (43.3%), а также приводило к уменьшению размера более крупных частиц до 135.7 нм, выявленных при 75°C, тогда как повышение температуры до 90°C привело к уменьшению фракции частиц размером 10.8 нм и формированию небольшого количества частиц размером 43.8 нм, а также значительного числа частиц размером 479.6 нм. Это свидетельствует о повышении устойчивости Dps к тепловой денатурации в присутствии ДНК.

Спектры флуоресценции были зарегистрированы для нуклеопротеидных комплексов, сформированных Dps и фрагментами ДНК (*H*, *S* и *Y5-Y6-Y7*) в диапазоне температур, использованном на предыдущем этапе. 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, что свидетельствует о некотором перемещении триптофанов на поверхность белка. Повышение температуры приводило к снижению интенсивности флуоресценции, выявив относительно небольшое её падение при переходе от 65°C к 70°C. Это может свидетельствовать о некоторой защитной роли ДНК по отношению к Dps (Рис. 21). Спектр, зарегистрированный для комплекса Dps и линейного фрагмента *S* имел интенсивность и форму, идентичную спектру нативного белка. Однако при 40°C его интенсивность снижалась более резко, а после 45°C снова наблюдалось увеличение интенсивности максимума. Спектр, зарегистрированный для комплекса Dps с ДНК *Y5-Y6-Y7* при 20°C имел максимум интенсивности, близкий к таковому у нативного белка, и был смещён в коротковолновую область, аналогично другим ДНК-белковым комплексам. Дальнейшее нагревание комплекса Dps+Y не приводило к повышению интенсивности флуоресценции, что может отражать стабильность связывания, не переходящего в неспецифическое взаимодействие. Таким образом, 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, что может быть обусловлено разным набором формирующихся ДНК-белковых контактов. Если это так, то и энергии связей, стабилизирующих нуклеопротеидный комплекс, будут отличаться.

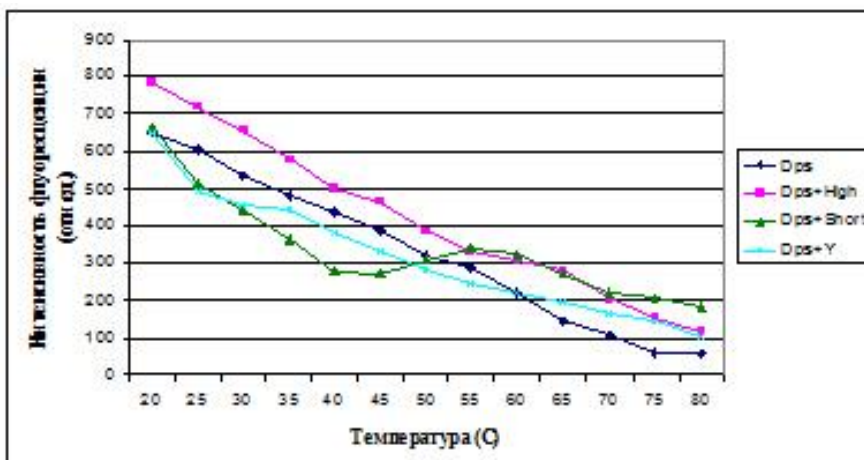


Рис. 21. Температурная зависимость интенсивности эмиссии при 322 нм для Dps и его комплексов с различными фрагментами ДНК.

Поскольку наиболее выраженные отличия в спектрах флуоресценции были зарегистрированы для нуклеопротеидных комплексов, полученных фрагментом *H* и *Y*-подобной ДНК *Y5-Y6-Y7*, то оценку констант связывания при формировании

нуклеопротеидного комплекса с Dps проводили с использованием этих фрагментов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что итоговые значения констант диссоциации значительно отличаются (Табл. 2). Величина отклика для комплекса с Y-подобной ДНК более чем в 4 раза ниже, чем для нуклеопротеида, сформированного с линейной ДНК. При этом время достижения максимального значения отклика обеих реакционных систем практически одинаково.

Таблица 2. 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

Полученные данные хорошо согласуются с результатами, полученными ранее (Рис. 18) 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 (Ceci, 2004) 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 (Табл. 2).

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 (Grant et al., 1998). 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 (Рис. 22) с использованием программы Swiss-PdbViewer (Guex et al., 1997).

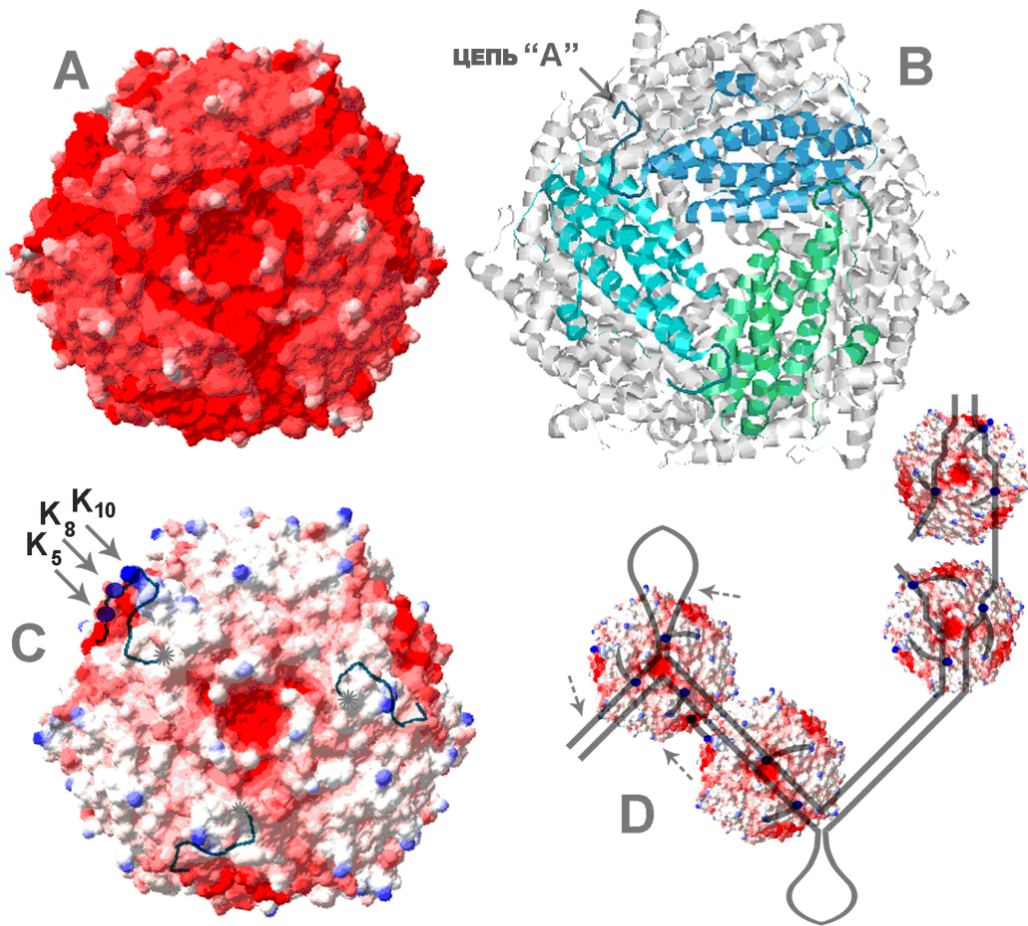


Рис. 22. Распределение электростатического потенциала (А и С) на поверхности додекамера Dps (В) и возможные способы формирования внутри и межмолекулярных контактов (Dps). А: распределение электростатического потенциала показано с использованием пороговых значений отрицательного потенциала -12 эВ (красный) и -1.5 эВ (белый). С: то же, что А, но пороговые уровни -12 эВ и -4.8 эВ. Синим цветом показаны области с потенциалом больше 0 эВ. К₅, К₈, К₁₀ – позиции остатков лизина; серые звездочки – неструктурированные участки полипептидных цепей. В – кристаллическая структура Dps (Grant et al., 1998)

На Рис. 22А видно, что практически вся поверхность молекулы заряжена отрицательно. Однако изменение порогового значения для белого цвета с -12 эВ до -4.8 эВ позволяет выявить области с особенно высоким отрицательным потенциалом (Рис. 22С). Таким образом, стало ясно, что эти области расположены на расстоянии, достаточном для взаимодействия с лизинами 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* (Ceci et al., 2003). Таким образом, ДНК, имеющая более высокий отрицательный электростатический потенциал, чем пятна на поверхности белковой глобулы, перетягивает на себя один, два или три N-конца вершины (Рис. 22D). В результате отрицательно заряженные домены освобождаются и с ними

могут связаться N-концевые модули соседних молекул Dps. Но сближение возможно и для комплексов, образованных на удалённых друг от друга участках, формируя при этом крупные агрегаты. Следовательно, присутствие ДНК стимулирует формирование белок-белковых взаимодействий за счет перераспределения контактов на поверхности белковой глобулы Dps, что приводит к освобождению потенциальных мишеней для взаимодействия с N-концевыми модулями других молекул Dps.

3.15 Белок Dps распределён по бактериальной ДНК неслучайным образом. Для изучения профиля распределения Dps вдоль бактериального генома были использованы бактериальные клетки, собранные на экспоненциальной фазе роста (Рис. 23А).

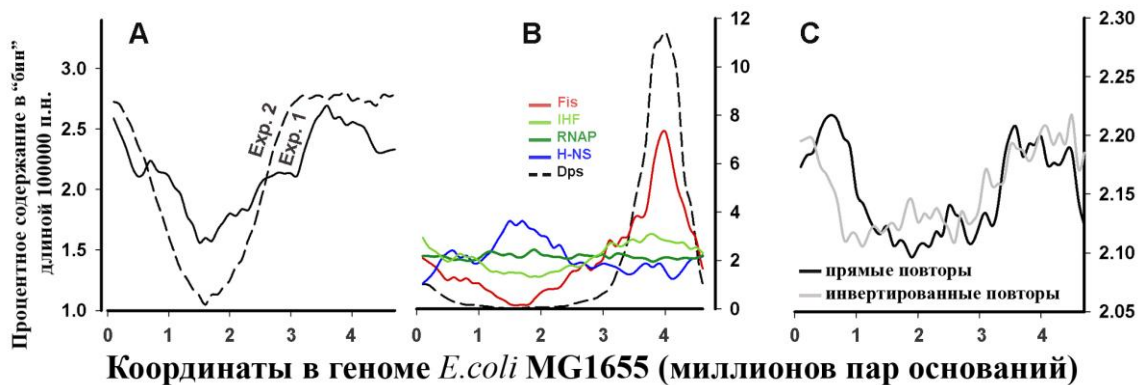


Рис. 23. Профиль распределения в геноме сайтов связывания Dps и их корреляция тандемными повторами и местами связывания основных белков нуклеоида. **А:** Распределение сайтов связывания Dps (CLC GW). **В:** То же для комбинированного набора данных (CS) и областей контакта белков Fis (Roy et al., 2008), IHF (Saraswathi et al., 2009), H-NS (Chowdhury et al., 2010) и РНК-полимеразы (Chowdhury et al., 2010). **С:** То же для прямых (длина 5-24 п.н., спейсер 1-15 п.н.) и инвертированных (длина 5-18 п.н., спейсер 1-15 п.н.) повторов, полученных из генома *E. coli* MG1655 с помощью программы Unipro UGENE.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в автоматическом режиме формирования пиков в CLC GW, средние размеры сайтов связывания Dps по данным двух экспериментов оказались разными и составили 102 ± 104 п.н. и 214 ± 220 п.н., соответственно (Рис. 23). Это может отражать некоторые функциональные особенности Dps, которые были по-разному реализованы в условиях двух экспериментов. Фильтрации и триммингу выявленные области не подвергались и напрямую использовались для картирования программным пакетом CLC WB. По этой причине следующее картирование было проведено для последовательностей одинаковой длины 50 нуклеотидов. Анализ профиля распределения сайтов связывания Dps в масштабе всего бактериального генома в обоих экспериментах свидетельствует об их повышенной плотности вблизи ориджина репликации (Рис. 24А, левая панель). Это может указывать на

обогащение этого участка предпочтительными мишенями для связывания Dps, или отражать различия в копийности ДНК, которая выше рядом с ориджином репликации (Рис. 24В, левая панель).

Значения параметра R для максимумов, выявленных в первом эксперименте, варьировали от 1.52 до 2.56. Геномные мишени Dps, обнаруженные при использовании компьютерного алгоритма «Matcher», оказались длиннее, чем те, которые были выявлены с использованием программы CLC GW (Рис. 23). Их средний размер, даже при исключении длинных оперонов рРНК, составил 292 п.н. (Рис. 25). 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.)

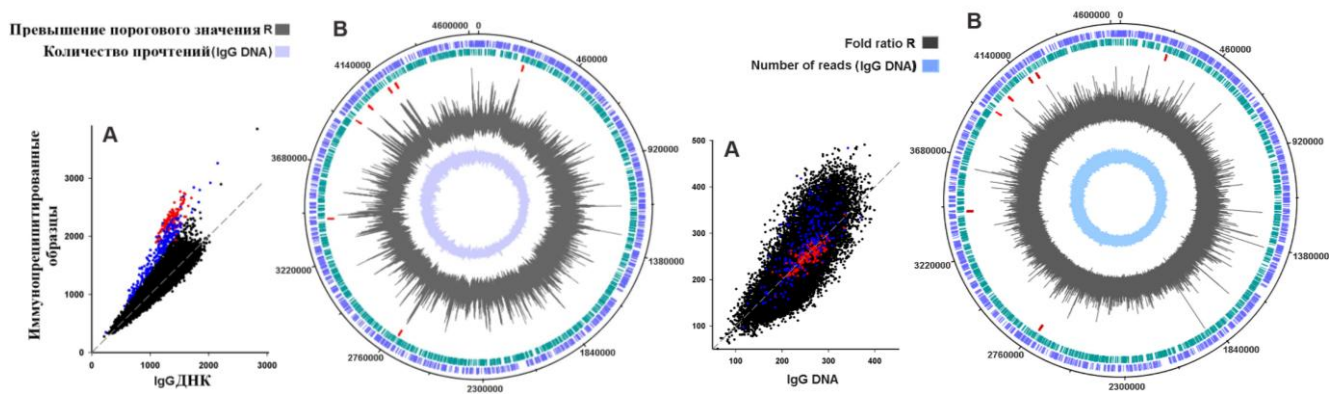


Рис. 24. Профиль распределения Dps на геномной ДНК *E. coli* MG1655. **А:** Корреляция между числом прочтений опытного и контрольного образцов. Красные точки - гены рибосомных РНК. Голубые точки - $R \geq 1.4$. Пунктирная линия - биссектриса координатной плоскости. **В:** Профиль сайтов связывания Dps в геноме, рассчитанный по параметру R в «бегущем окне» 35 н.п. (первый эксперимент) 25 п.н. (второй эксперимент) Два внешних кольца - распределение генов на генетической карте по верхней и нижней цепи генома. 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.

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. 23В, 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.

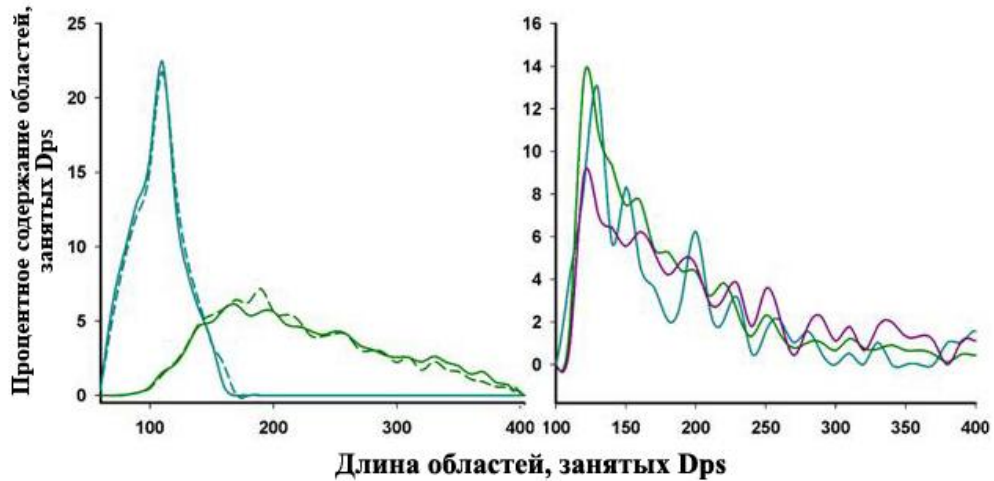


Рис. 25. Гистограммы распределения мест связывания Dps, выявленные CLCGW (слева) и Matcher (справа) для первого и второго экспериментов (голубые и зелёные графики, соответственно). Сплошные и пунктирные линии на левой панели - пики, полученные с использованием стандартных и строгих критериев, соответственно. Фиолетовый график на правой панели - распределение размеров для общего набора CS

3.16 Сайты связывания Dps обогащены инвертированными повторами.

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 (Okonechnikov et al., 2012). Было выявлено 1134 общих пар оснований, что в 1.24 раза превышает ожидаемое значение (Рис. 26). Было установлено, что пары инвертированных повторов чаще ожидаемого находятся в нуклеотидных последовательностях сайтов связывания Dps, но реже расчётного обнаруживаются в областях не занятых Dps.

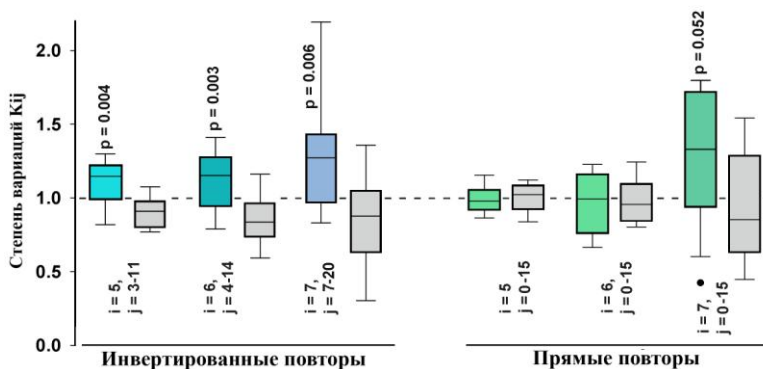


Рис. 26. Распределение показателей перекрытия CS-области (цветные столбики) и UR-области (серые столбики) с областями, содержащими прямые и инвертированные повторы, охарактеризованные с помощью значения K_{ij} . Черными точками - выпавшие значения.

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. 26). 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»

Проведенное картирование с использованием экспериментальных данных, полученных в работах (Grainger et al., 2007; Myers et al., 2013), свидетельствует 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. 27, левая панель) (Grainger et al., 2006).

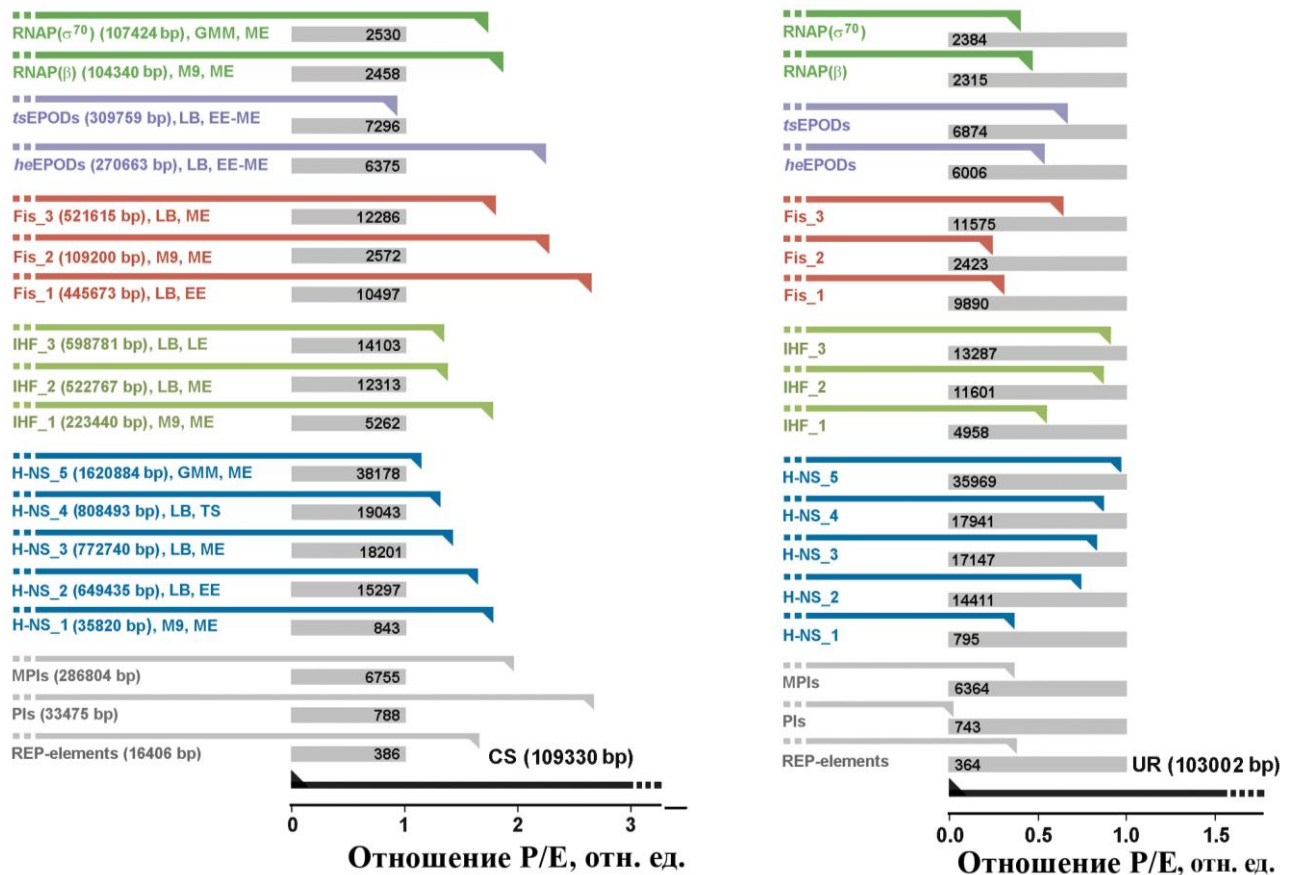


Рис. 27. Слева - уровни перекрытия мишеней Dps со структурными и функциональными элементами генома для прямых и инвертированных повторов в виде отношения обнаруженного перекрытия P к ожидаемому значению E . Справа - уровни перекрытия структурных и функциональных элементов генома с участками ДНК, не взаимодействующими с Dps. Цифрами указаны размеры каждого из наборов и ожидаемое число общих пар оснований. Черная линия внизу рисунка - массив набора UR.

При переходе к стационарному росту степень перекрытия мест связывания H-NS и Dps уменьшается (Рис. 27, левая панель). Количество совпадений для областей связывания Dps, содержащихся в наборе CS, с сайтами связывания белка IHF носит аналогичных характер. Всего в Cs обнаружено 177

областей с зарегистрированными в работах (Myers et al., 2013) 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 (Ohniwa et al., 2006), 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 с 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. 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 обнаружено шесть групп с консенсусными последовательностями: 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 ($E = 3.6e-006$). 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, занятыми другими белками нуклеоида.

3.19 Отсутствие молекул Dps в бактериальной клетке по-разному влияет на экспрессию генов. Поскольку результаты двух экспериментов ChIP-seq выявили принципиальные различия во взаимодействии Dps с рибосомными оперонами, было целесообразно проверить зависимость их экспрессии от присутствия Dps. В качестве представителей генов рибосомального оперона были использованы *groA* и *groB*. Результаты первого эксперимента свидетельствуют о том, что они полностью заняты молекулами Dps, включая кодирующую часть гена, тогда как во втором эксперименте в этой области сигнал не превышал уровень порогового значения контрольных образцов (Рис. 28).

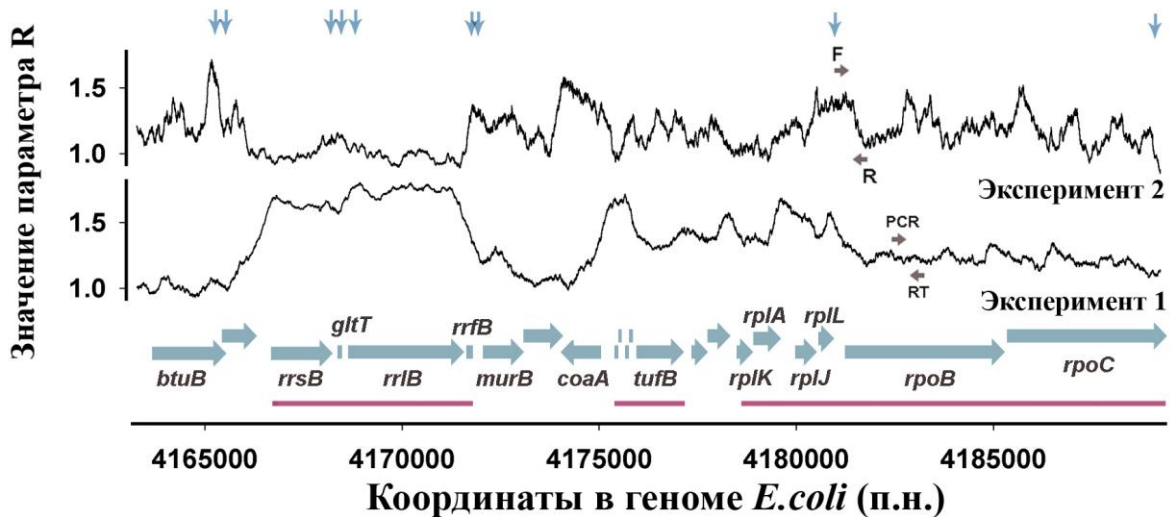
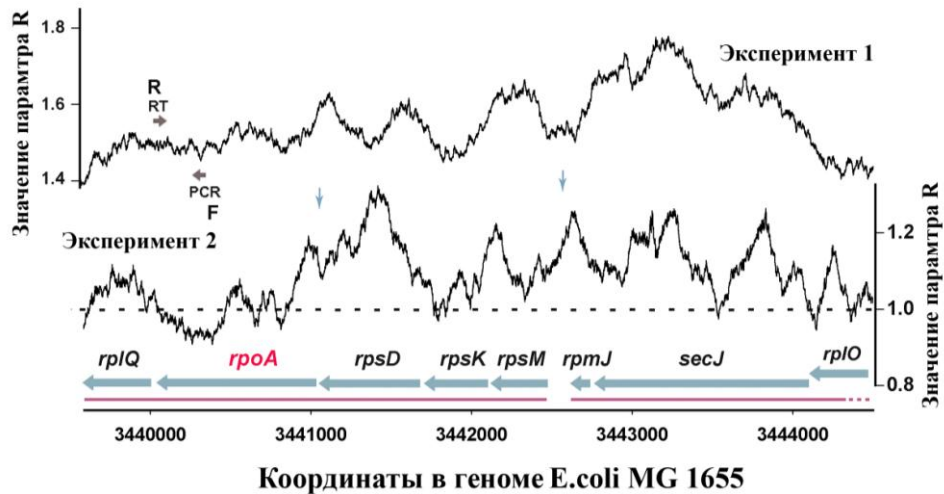


Рис. 28. Профиль распределения сайтов связывания Dps с тремя оперонами рибосомных генов. Голубые горизонтальные стрелки - гены; фиолетовые линии - рибосомные опероны. Вертикальные стрелки - позиции инвертированных повторов. Горизонтальные серые стрелки - позиции праймеров для qRT-PCR.

На Рис. 28 приведен пример 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, кодирующими большие субъединицы РНК-полимеразы (*rpoB* и *rpoC*). 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. 28), 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*.

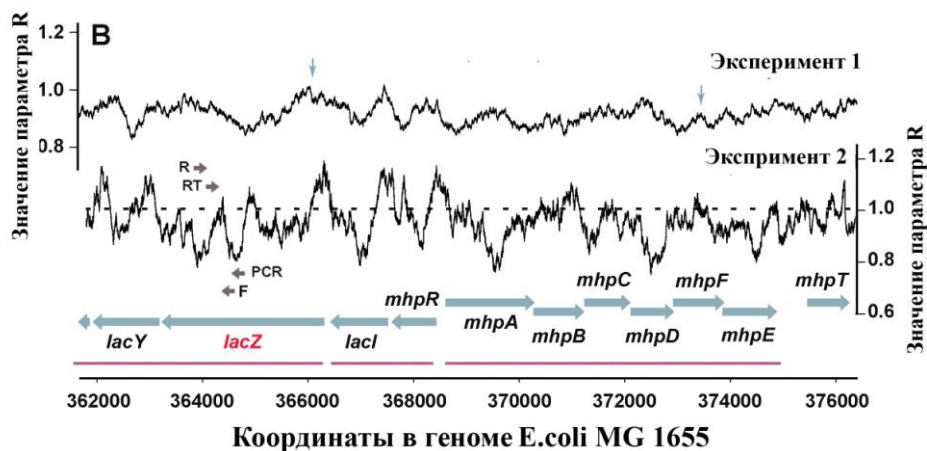
Аналогичный результат был получен для гена *rpoA*, который кодирует α -субъединицу РНК-полимеразы и транскрибируется в составе полицистрона *rpsMKD-rpoA-rplQ* (Рис. 29). В первом эксперименте оперон, содержащий ген *rpoA*, и соседний оперон, состоящий из генов *rplNXE-rpsNH-rplFR-rpsE-rpmD-rplO-secY-rpmJ*, 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. 29).



Координаты в геноме E.coli MG 1655

Рис. 29. Профиль распределения сайтов связывания Dps с двумя оперонами рибосомных белков. Голубые горизонтальные стрелки - гены; фиолетовые линии - рибосомные опероны. Вертикальные стрелки - позиции инвертированных повторов. Горизонтальные серые стрелки - позиции праймеров для и qRT-PCR.

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. 30). Анализ профилей распределения Dps в двух экспериментах ChIP-Seq, проиллюстрированных на Рис. 28-30, 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.



Координаты в геноме E.coli MG 1655

Рис. 30. Профиль распределения сайтов связывания Dps для геномной области с оперонами *lacZYA*, *mhpR-lacI* и *mhpABCDE*. Голубые горизонтальные стрелки - гены; фиолетовые линии - опероны. Вертикальные стрелки - позиции инвертированных повторов. Горизонтальные серые стрелки - позиции праймеров для qRT-PCR

Способность Dps связываться с выбранными участками ДНК была подтверждена для фрагментов, амплифицированных из нуклеотидных последовательностей генов *rpoA* и *rpoB* (Рис. 31А) В этих экспериментах в качестве положительного контроля был использован ранее исследованный фрагмент регуляторной области гена *dps* *S*. 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. 30), при четырехкратном избытке белка проявлял хорошо детектируемую способность связываться с Dps *in vitro* (Рис. 31А). 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.

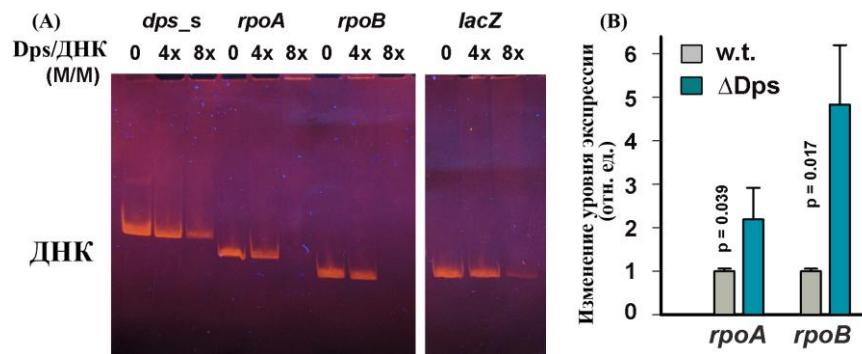


Рис. 31. *In vitro* Dps взаимодействует с фрагментами генов *rpoA*, *rpoB* и *lacZ* (А) а его удаление из клеток влияет на экспрессию *rpoA* и *rpoB* (В). Уровни экспрессии для *rpoA* и *rpoB* соответственно. Фрагмент кодирующей области гена *lacZ* был - референсный продукт. Вертикальные черточки - t-критерий Стьюдента. (Данные получены совместно с М.Н. Тутукиной).

Как и ожидалось, удаление гена *dps* оказало аналогичное влияние на экспрессию генов *rpoA* и *rpoB* (Рис. 31В). 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 *rpoB* 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. 32А). Он подтверждает взаимодействие Dps с промоторной областью гена *dps* *in vivo*, которое на

протяжении всей работы неоднократно было зарегистрировано *in vitro*. Для проверки способности Dps влиять на экспрессию собственного гена, вся промоторная область этого гена, включая все экспериментально-проверенные промоторы (Grainger et al., 2006; Grainger et al., 2007), выявленные *in silico*, была встроена в плазмиду pET28b-eGFP перед геном *gfp* (Рис. 32B).

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 отн. ед.). Аналогичный эффект наблюдался и в случае исследований с помощью qRT-PCR для экспоненциально растущих клеток (Рис.32D).

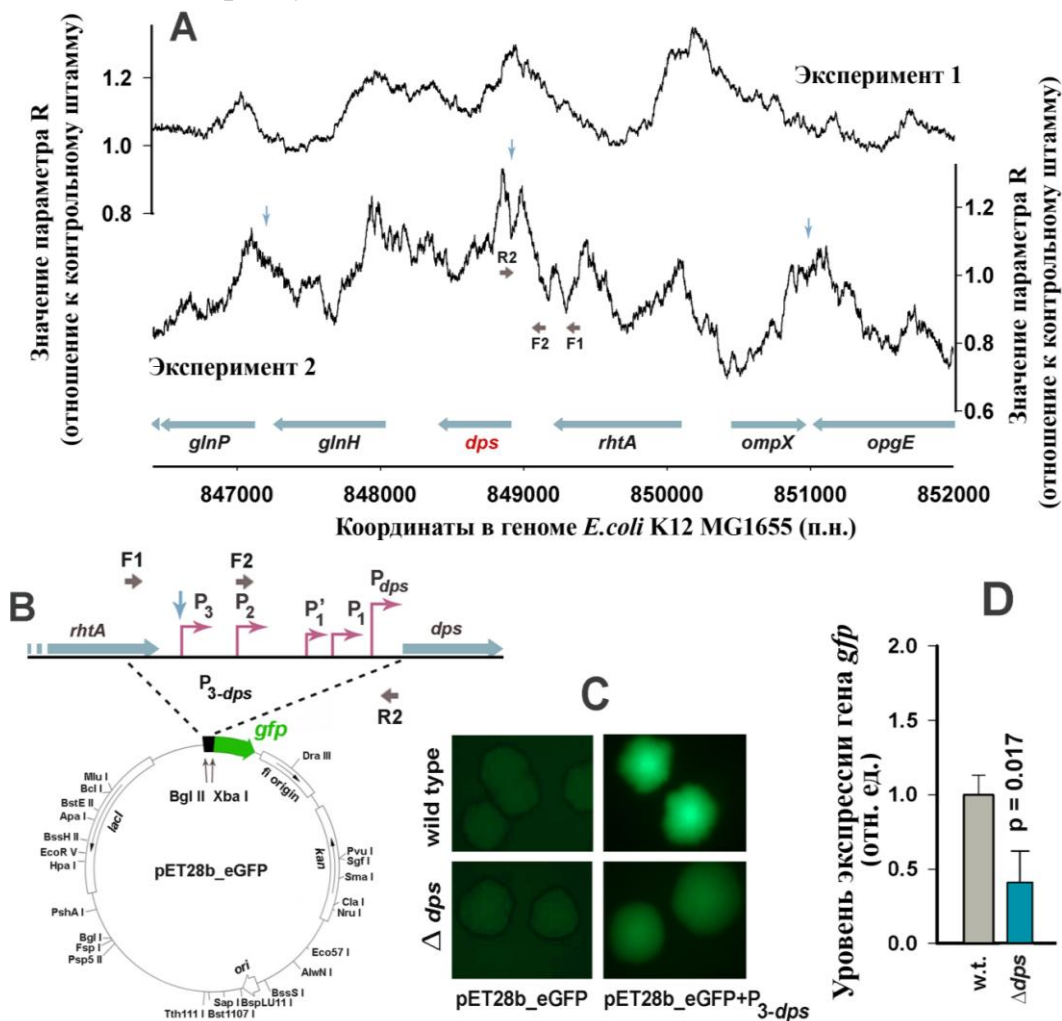


Рис. 32. Исследование авторегуляции гена *dps* **A:** Профили сайтов связывания Dps в двух экспериментах для локуса, содержащего ген *dps*. Голубые горизонтальные стрелки - гены. Вертикальные стрелки - расположение инвертированных повторов длиной более > 7 п.н. (голубые стрелки). **B:** Схема репортерного вектора pET28b-eGFP, содержащего вставку промоторной области *dps*. **C:** Фотография колоний *E. coli* MG 1655, трансформированных pET28b-eGFP, имеющей или нет промоторную вставку. **D:** Изменения эффективности экспрессии *gfp* в зависимости от делеции *dps*. Вертикальные черточки - стандартной ошибки. (Данные получены совместно с У.С. Швыревой)

Промоторная область *dps* имеет два участка первичных контактов с Dps, выявленных с помощью футпринтинга (Рис. 10). 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 (Gama-Castro et al., 2011)). Другой участок (216-281 п.н. от P_{dps}) имеет в центре инвертированный повтор длиной 30 н.о. (Рис. 32А и 32В). Ослабление конкуренции с Fis в области расположения первого сайта связывания может объяснить ингибирующий эффект, вызываемый делецией *dps* (рис. 32D). 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. 31 и 32, являются весомыми указаниями на регуляторный потенциал Dps, а промоторную область *dps* можно рассматривать в качестве удобной модели для дальнейших исследований этого потенциала.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Все использованные в работе фрагменты ДНК взаимодействовали с Dps, но эффективность этого взаимодействия оказалась разной. 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. Это соответствует представлению о том, что сродство к денатурированной ДНК у Dps выше, чем к внутренним участкам двойной спирали. С помощью электрофоретического фракционирования смеси, полученной при самосборке искусственных разветвленных ДНК, было установлено, что Dps ещё эффективнее взаимодействует с триплексами, а не дуплексами. Таким образом, разветвлённые структуры ДНК и стыки двуспиральной ДНК с однонитевыми участками имеют особенности, обеспечивающие повышенное сродство Dps к ним. Такой особенностью может являться наличие трех ветвей Y-образной ДНК, которые одновременно могут связаться со сгруппированными в триплеты N-концевыми участками мономеров Dps. Способность Dps распознавать разветвлённые участки в природной ДНК может иметь значение для репарации однонитевых и двунитевых разрывов, а также для разворачивания шпилечных структур. Y-подобные структуры могут формироваться практически в любом сегменте ДНК, содержащем, как минимум два прямых повтора нуклеотидной

последовательности (Halsey et al., 2004). 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 такие повторы, должно быть под специальным контролем клеточных систем. Однако специальных механизмов, адаптированных под эти задачи, в настоящее время у бактерий не обнаружено, так что белок Dps можно рассматривать как один из участников данного процесса. Число прямых повторов в сайтах связывания Dps оказалось повышенным только для повторов длиной не менее 7 п.н., что не исключает биологического значения взаимодействия с ними Dps. Для инвертированных повторов, наоборот, обнаружено явное превышение числа таких областей в мишенях для Dps. Эта разница для двух типов повторов с перевесом в пользу энергетически более реалистичных симметричных шпильчатых структур может служить дополнительным аргументом в пользу структурной специфичности Dps. Наибольшее количество сайтов связывания выявлено в последней четверти генома, что является биологически значимыми и позволяет быстро его ремоделировать в условиях стресса.

Существует один важный аспект комплексообразования Dps с Y-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. 22С). В таком случае, даже малейшая утечка токсичных ионов Fe^{2+} может стать опасной для целостности генома. Таковую угрозу тем более следует учесть, так как полученные данные с использованием XANES-спектроскопии и Мёссбауэровской спектроскопии свидетельствуют о наличии во внутренней полости Dps ионов железа в различном зарядовом состоянии.

Самым неожиданным результатом полногеномного анализа сайтов связывания Dps было обнаружение в них доминирующих мотивов TG-tGAT или GATA. Их присутствие нельзя игнорировать, и они могут быть важны для взаимодействия с Dps. Но отсутствие типичного ДНК-связывающего домена у Dps и наличие выявленных мотивов в сайтах, специфически распознаваемых другими белками нуклеоида, также позволяют предположить, что Dps предпочитает связываться с ДНК вблизи областей, занятых другими белками. Обнаружение зависимости экспрессии трёх генов от присутствия в клетках Dps указывает на его регуляторную функцию. В данной работе опосредованные

отсутствием Dps изменения впервые были зарегистрированы на уровне мРНК для клеток экспоненциально растущих культур.

3. 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 нуклеопротеидных 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 нуклеопротеидного 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.

Публикации по теме диссертации

1. **S. Antipov**, S. Turishchev, Y. Purtov, U. Shvyreva, A. Sinelnikov, Y. Semov, E. Preobrazhenskaya, A. Berezhnoy, N. Shusharina, N. Novolokina, V. Vakhtel, V. Artyukhov, O. Ozoline. The oligomeric form of the *Escherichia coli* Dps protein depends on the availability of iron ions // 2017 – *The Molecules*. V. 22, P.1904.

2. **Antipov S.S.**, Tutukina M.N., Preobrazhenskaya E.V., Kondrashov F.A., Patrushev M.V., Toschakov S.V., Dominova I., Shvyreva U.S., Vrublevskaya V.V., Morenkov O.S., Sukharicheva N.A., Panyukov V.V., Ozoline O.N. The Nucleoid Protein Dps Binds Genomic DNA of 1 *Escherichia coli* in a Non random Manner // *Plos One* – 2017 – V. 12(8), P.e0182800.

3. S.Yu. Turishchev, **S.S. Antipov**, N.V. Novolokina, O.A. Chuvenkova, A.A. Sinelnikov, E.V. Preobrazhenskaya, R. Ovsyannikov, A.V. Tarasov, D.A. Koyuda, O.N. Ozoline, E.P. Domashevskaya Synchrotron study of *Escherichia coli* ferritin Dps inorganic core // 2017 – *FEBS Journal* - T. 284. № S1. P.203.

4. **Antipov S.**, Shvyreva U., Preobrazhenskaya E., Semov Y., Vakhtel V., Artyukhov V., Ozoline O. Characterization of iron ions associated with the *E. coli* Dps protein and their influence on the protein oligomeric form // 2017 – *FEBS Journal* - 2017. T. 284. № S1. P. 202.

5. Бессонова Т.А., Шумейко С.А., Пуртов Ю.А., **Антипов С.С.**, Преображенская Е.В., Тутукина М.Н., Озолин О.Н. Гексуронаты влияют на олигомерную форму структурного белка бактериального нуклеоида Dps и его способность к взаимодействию с линейными фрагментами ДНК // *Биофизика*. – 2016. Т.61(6), С.1059-1067.

6. 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.

7. **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.

8. Purtov Y.A., Glazunova O. A., **Antipov S.S.**, Pokusaeva V.O., Fesenko E.E., Preobrazhenskaya E.V., Shavkunov K.S., Tutukina M.N., Lukyanov V.I., Ozoline O.N. Promoter islands as a platform for interaction with nucleoid proteins and transcription factors // *Journal of Bioinformatics and Computational Biology* – 2014 V.12(2), P.1441006.

9. **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.

10. Покусаева В.О., **Антипов С.С.**, Швырева У.С., Тутукина М.Н., Озолин О.Н. Суперпродукция, выделение и очистка функционально активного бактериоферритина Dps *E.coli* // *Сорбционные и хроматографические процессы* – 2012. Т.12(6), С.922-930.

11. **Антипов С.С.**, Курганов К.В., Чемерис Н.К., Озолин О.Н. / Бактериоферритин как биосенсор и наноструктура // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова* - 2007 Т.3, С.40-44.

12. Bessonova T.A., Shvyreva U.S., Gagarinskaya D.I., **Antipov S.S.**, Tutukina M.N., Ozoline O.N. The Dps bacterial nucleoid protein is associated with sugar metabolism // Статья в сборнике МССМВ 2017: Proceedings, 2017 - <http://mccmb.belozersky.msu.ru/2017/proceedings/abstracts/128.pdf>.

13. Tutukina M.N., **Antipov S.S.**, Shvyreva U.S., Bessonova T.A., Preobrazhenskaya E.V., Purtov Yu.A., Kondrashov F., Ozoline O.N. The Dps nucleoid protein from *E.coli*: is DNA protection accompanied by transcriptional regulation? // Статья в сборнике МССМВ 2017: Proceedings, 2017 -<http://mccmb.belozersky.msu.ru/2017/proceedings/abstracts/75.pdf>.

14. Ozoline O.N., Shavkunov K.S., Glazunova O.A., Fesenko E.E., Tutukina M.N., Kiselev S.S., Antipov S.S., Pokusaeva V.O., Panyukov V.V. Promoter islands as instruments of bacterial evolution // Статья в сборнике МССМВ 2013: Proceedings, 2013 - <http://mccmb.belozersky.msu.ru/2013/abstracts/abstracts/29.pdf>.

15. **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 // Статья в сборнике «Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы» (Воронеж), 2013 – С. 24 – 26.

16. Turishchev S., **Antipov S.**, Novolokina N., Chuvenkova O., Sinelnikov A., Preobrazhenskaya E., Ovsyannikov R., Tarasov A., Koyuda D., Ozoline O., Domashevskaya E. Atomic and electronic structure of hybrid nanomaterial bacterioferritin Dps aggregated from *Escherichia coli* inorganic cores // 2017 - the 17th European conference on applications of surface and interface analysis (24-29 September 2017, Montpellier, France) P.92-93.

17. Новолокина Н.В., Турищев С.Ю., **Антипов С.С.**, Чувенкова О.А., Преображенская Е.В., Озолин О.Н., Домашевская Э.П. Электронное строение и состав неорганических наноразмерных ядер гибридных нанобъектов – ферритинов Dps *E.coli* // 2017 – Сборник тезисов XXIV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам «Ломоносов - 2017» (Москва, 10-14 апреля 2017г.) С. 632-633.

18. Турищев С.Ю., **Антипов С.С.**, Новолокина Н.В., Преображенская Е.В., Чувенкова О.А., Овсянников Р., Сеньковский Б.В., Харин А.Н., Домашевская Э.П. Синхротронные исследования гибридных наноматериалов на примере бактериоферритина Dps // «Физико-химические процессы в конденсированных средах и на межфазных границах, ФАГРАН—2015» (г. Воронеж,- 10-13 ноября 2015 г.), Сборник тезисов, 2015, С. 411 – 412.

19. Преображенская Е.В., **Антипов С.С.**, Мелехов В.В., Артюхов В.Г., Озолин О.Н. Оценка сродства белка Dps к линейным и разветвленным молекулам ДНК // Сборник тезисов V СЪЕЗД БИОФИЗИКОВ РОССИИ (г.Ростов-на-Дону, 4-10 октября 2015) С. 110.

20. **Антипов С.С.**, Мелехов В.В., Артюхов В.Г., Озолин О.Н. Бактериоферритин Dps, как белок нуклеоида со структурной специфичностью // Сборник тезисов V СЪЕЗД БИОФИЗИКОВ РОССИИ (г.Ростов-на-Дону, 4-10 октября 2015) С. 65.

21. 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 // STRANN`2014 (S.Piterburg, 22-25 April 2014) P.92-93.

22. Преображенская Е.В., Мелехов В.В., Озолин О.Н., **Антипов С.С.** Проектирование комплекса, формирующего Y-образную структуру из трёх частично комплементарных олигонуклеотидов // Сборник тезисов БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 18-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых (Пушино, 21 – 25 апреля 2014 г.) С. 113– 114.

23. Мелехов В.В., Швырева У.С., Тимченко А.А., Озолин О.Н., **Антипов С.С.** Конформационные особенности нативного белка Dps, его апо-формы и насыщенного ионами железа // Сборник тезисов БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 18-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых (Пушино, 21 – 25 апреля 2014 г.) С. 103– 104.

24. 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 // International PhD School on «Application of Scanning Probe Microscopy (SPM) in Life Sciences, Soft Matter and Nanofabrication», (Aalborg, Denmark, Aug 26-30 2013) http://same-nano.com/Abstracts2013/School2013_Abstract_Antipov.pdf.

25. **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 БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 17-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых (Пушино, 21 – 26 апреля 2013 г.) С.90-91.

26. Преображенская Е.В., Буркова Д.В., Покусаева В.О., **Антипов С.С.**, Артюхов В.Г., Озолин О.Н. Исследование эффективности взаимодействия белка Dps с участками ДНК *E.coli*, в зависимости от их физико-химических характеристик // Сборник тезисов Международная конференция молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика '13», (Пушино, 21-23 октября 2013 г.) С.64 – 65.

27. Покусаева В.О., **Антипов С.С.**, Озолин О.Н. Взаимодействие бактериоферритинаdps *E.coli* с разными по физико-химическим свойствам фрагментами бактериальной ДНК // Сборник тезисов IV Съезда биофизиков России (г. Нижний Новгород 20-26 августа 2012) С.240;

28. **Антипов С.С.**, Озолин О.Н. «Влияние ЭМИ СВЧ на регуляторные системы *E.coli*» // 2013 - Издательство LAP Lambert Academic Publishing, ISBN 978-3-659-46997-8, 149 С.

29. Антипов С.С., Покусаева В.О. «Исследования структурно-функциональных свойств бактериоферритина Dps *E.coli*» // 2016 - Издательство LAP Lambert Academic Publishing, ISBN 978-3-659-82700-6, 72 С.

Работы № 1-11 опубликованы в изданиях, рекомендованных перечнем ВАК.