

Структура кристаллов комплекса ДНК с гистоноподобным белком Dps

Коваленко В.В.^{1*}, Лойко Н.Г.², Терешкин Э.В.¹, Терешкина К.Б.¹,
Крупянский Ю.Ф.¹

¹ Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, Москва, Россия

² Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

* vladislavkovalenko785@gmail.com

Ключевые слова: просвечивающая электронная микроскопия; кристаллизация ДНК; молекулярное моделирование

Мотивация и цель: Бактериальные клетки в ходе эволюции выработали универсальные наследственные стратегии адаптации, основанные на структурных, биохимических и генетических перестройках, позволяющие сохранить часть популяции и выжить в любых неблагоприятных условиях. Бактериальные стратегии адаптации в первую очередь направлены на защиту ДНК с помощью нуклеоид-ассоциированных белков [1]. Так, при приближении к стационарной фазе роста в бактериях запускается молекулярный механизм выработки (до 200 000 единиц) ферретиноподобного белка Dps (DNA-binding protein of starved cells). Белок Dps участвует в конденсации ДНК, уплотняя ее в более высокоупорядоченную «биокристаллическую» или «фибронанокристаллическую» структуру, максимально защищающую от разрушительных воздействий. Несмотря на высокий интерес со стороны научного сообщества к данной теме, до сих пор не получено точной молекулярной структуры комплекса ДНК-Dps. Однако решение этого вопроса важно, так как прольет свет на механизмы выживания бактерий в стрессовых условиях и позволит подобрать новые способы стерилизации в пищевой промышленности и медицине.

Методы и алгоритмы: Для определения структуры макромолекулярных комплексов и молекулярных механизмов взаимодействия ДНК с Dps использованы методы просвечивающей электронной микроскопии, дополненные инструментами молекулярного моделирования.

Результаты: Кристаллические *in vitro* комплексы Dps-ДНК были получены смешиванием очищенного белка Dps (3.4 мг/мл) с линейным двуцепочечным фрагментом ДНК (0.25 нг/мкл) pBluescript II SK(+) длиной 2961 пар оснований непосредственно на покрытую углеродом медную сетку ТЭМ (SPI) с последующим немедленным добавлением ЭДТА (0.14 мМ). Таким образом, кристаллы формировались непосредственно на сетке ПЭМ. Снимки ПЭМ содержали множество кристаллов линейного размера от 50 до 500 нм (рис. 1). Томограммы были получены с использованием программного обеспечения Jeol для томографии (Jeol, Япония). Угол наклона гониометра колеблется от –60 до +60 (с постоянным шагом 1 градус). Серия изображений была выровнена с помощью

программного обеспечения Digital Micrograph (Gatan, США), а затем восстановлена с помощью алгоритма обратной проекции в IMOD4.11. Томография содержала периодические области электронной плотности, с пространственной группой P1 и постоянными элементарной ячейки $a = 84.1 \text{ \AA}$, $b = 77.0 \text{ \AA}$, $c = 45.0 \text{ \AA}$, $\alpha = 90.00^\circ$, $\beta = 90.00^\circ$, $\gamma = 113.30^\circ$. Белок Dps в додекамерной четвертичной форме (сферическая форма приблизительно $90 \text{ \AA}$ в диаметре) [2] не может разместиться в данной элементарной ячейке. Сама электронная плотность внутри элементарной ячейки имела форму пирамиды с полостью внутри в виде усеченного конуса, что по виду совпадала с частью додекамерной формы белка Dps в области соприкосновения трех мономеров Dps, образующих так называемую Dps пору. Для подтверждения существования белка в тримерной четвертичной структуре, методами молекулярного моделирования в программном пакете Gromacs 5.1 [3] в полноатомном силовом поле AMBER был проведен расчет трех мономеров белка Dps в водном растворе в течение 1 микросекунды. По результатам расчетов была вычислена потенциальная энергия взаимодействия мономеров (-185.98 кДж/моль). Далее отрелаксированный тример и молекулы ДНК были размещены в электронную плотность кристалла с помощью программы UCSF Chimera [4] (рис. 2).

Выводы: В нашем эксперименте была впервые обнаружена структура белка Dps в четвертичной форме, отличной от додекамерной, внутри кристаллических образований очень малого размера. Подобные структуры также были обнаружены нами в покоящихся клеточных образцах *E. coli* [5], где размер периодической решетки внутриклеточных кристаллов был меньше, чем диаметр додекамера Dps. По-видимому, белок Dps в клетках, защищенных от внешних стрессовых воздействий также находится в тримерной четвертичной структуре.

Финансирование: Исследование проведено при финансовой поддержке гранта РФФ № 23-24-00250.

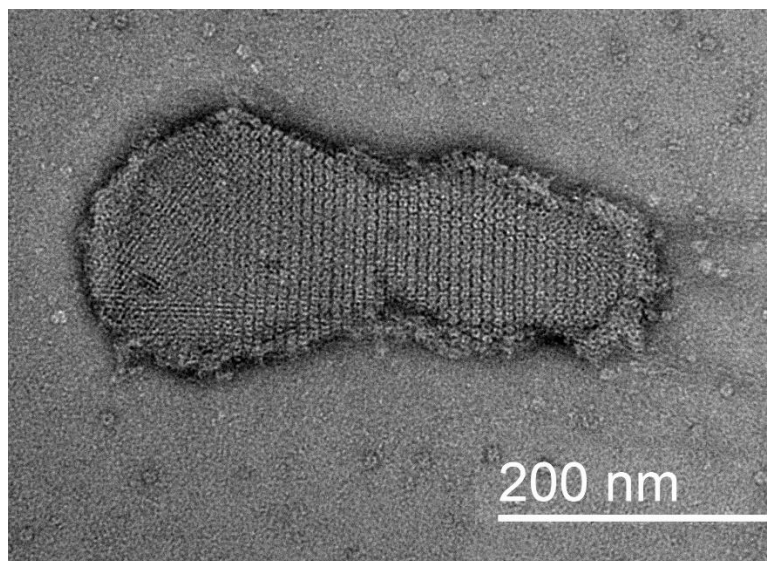


Рис. 1. ПЭМ снимок кристаллического комплекса ДНК-Dps

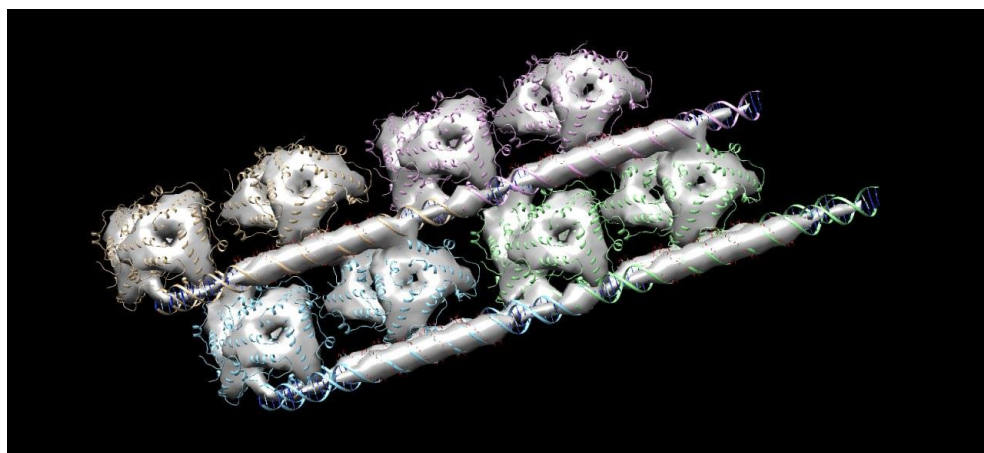


Рис. 2. Финальное расположение тримеров белка Dps и молекул ДНК в карту электронной плотности, полученную из томографии

Crystal structure of DNA with histone-like protein Dps complex

Kovalenko V.V.^{1*}, Loiko N.G.², Tereshkin E.V.¹, Tereshkina K.B.¹,
Krupyanskii Yu.F.¹

¹ N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, RAS, Moscow, Russia

² Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology", RAS, Moscow, Russia

* vladislavkovalenko785@gmail.com

Key words: transmission electron microscopy; DNA crystallization; molecular modeling

Motivation and Aim: Evolutionary bacterial cells evolution have developed universal hereditary adaptation strategies based on structural, biochemical, and genetic rearrangements that allow them to conserve a part of the population and survive in any unfavorable conditions. Bacterial adaptation strategies are primarily aimed at protecting DNA with the help of nucleoid-associated proteins [1]. Thus, as bacteria approach the stationary phase of growth, a molecular mechanism of production (up to 200,000 units) of the ferretin-like protein Dps (DNA-binding protein of starved cells) is triggered. The Dps protein participates in the condensation of DNA, compacting it into a more highly ordered “biocrystalline” or “fibro-nanocrystalline” structure that maximizes protection from damaging effects. Despite the high interest of the scientific community in this topic, the exact molecular structure of the DNA-Dps complex has not yet been obtained. However, the solution of this issue is important, as it will shed light on the mechanisms of bacterial survival under stress conditions and allow to select new methods of sterilization in the food industry and medicine.

Methods and Algorithms: Transmission electron microscopy techniques supplemented with molecular modeling tools were used to determine the structure of macromolecular complexes and molecular mechanisms of interaction between DNA and Dps.

Results: Crystalline in vitro Dps-DNA complexes were obtained by mixing purified Dps protein (3.4 mg/mL) with a linear double-stranded DNA fragment (0.25 ng/μL) of pBluescript II SK(+) with a length of 2961 base pairs directly onto a carbon-coated

copper TEM grid (SPI) followed by immediate addition of EDTA (0.14 mM). Thus, crystals were formed non-intermediately on the PEM grid. TEM images contained many crystals with linear sizes ranging from 50 to 500 nm (Fig. 1). Tomograms were obtained using Jeol tomography software (Jeol, Japan). The goniometer tilt angle ranged from -60 to $+60$ (with a constant step of 1 degree). The image series were aligned using Digital Micrograph software (Gatan, USA) and then reconstructed using the back-projection algorithm in IMOD4.11. The tomography contained periodic regions of electron density, with space group P1 and unit cell constants equal to $a = 84.1 \text{ \AA}$, $b = 77.0 \text{ \AA}$, $c = 45.0 \text{ \AA}$, $\alpha = 90.00^\circ$, $\beta = 90.00^\circ$, $\gamma = 113.30^\circ$. The Dps protein in the dodecameric quaternary form (spherical shape approximately $90 \text{ \AA}$ in diameter) [2] cannot be fit into this unit cell. The very electron density inside the unit cell had the shape of a pyramid with a cavity inside in the form of a truncated cone, which coincides with the part of the dodecameric form of the Dps protein in the region of contact of three Dps monomers forming the so-called Dps pore. To confirm the existence of the protein in the trimeric quaternary structure, three monomers of the Dps protein in aqueous solution for 1 microsecond were calculated by molecular modeling methods in the Gromacs 5.1 software package [3] in the all-atom AMBER force field. The potential energy of monomer interaction -185.98 kJ/mol was obtained based on the results of the calculated trajectories. Further, the trimer structure after energy relaxation process and DNA molecules were placed in the electron density of the crystal using the UCSF Chimera program [4] (Fig. 2).

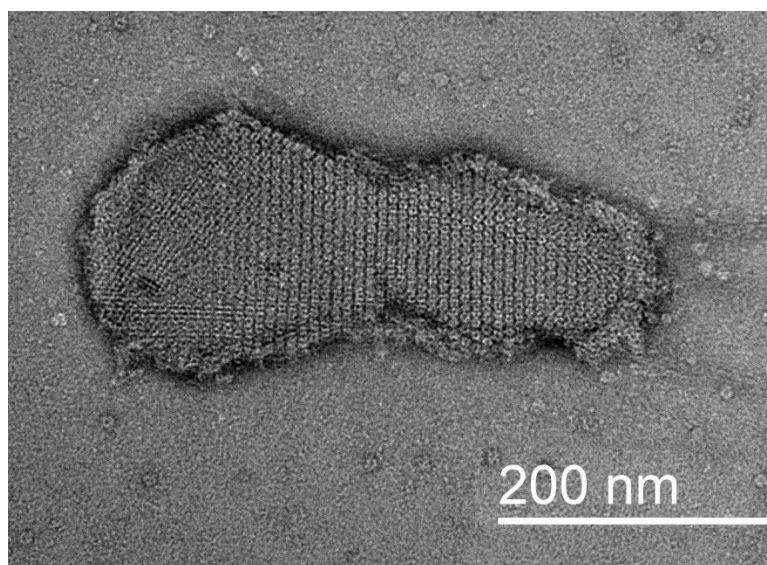


Fig. 1. TEM image of the crystalline complex of DNA-Dps

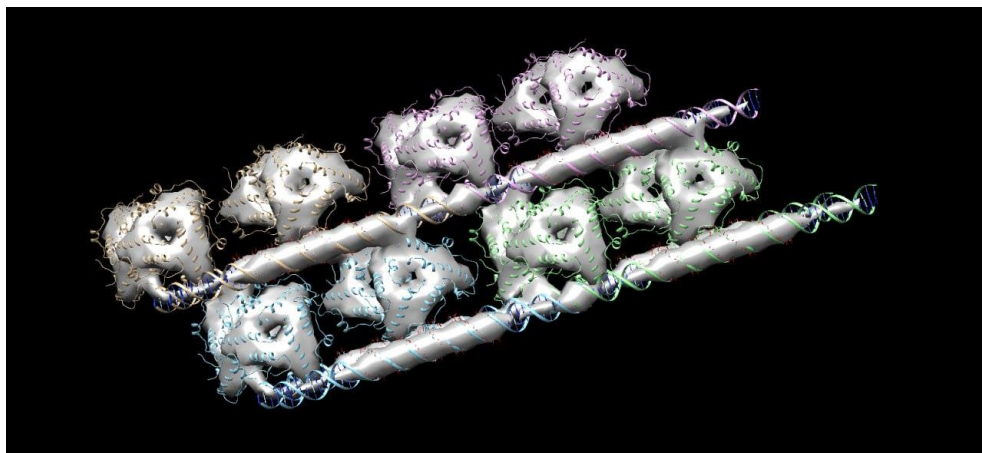


Fig. 2. Final arrangement of Dps protein trimers and DNA molecules in the electron density map obtained from SEM tomography

Conclusion: In our experiment, the structure of Dps protein in the quaternary form different from the dodecamer inside crystalline formations of very small size was detected for the first time. We also found similar structures in resting cell samples of *E. coli* [5], where the size of the periodic lattice of intracellular crystals was smaller than the diameter of the Dps dodecamer. Apparently, the Dps protein in cells protected from external stress effects is also in a trimeric quaternary structure.

Funding: The study was financially supported by RSF grant #23-24-00250.

Список литературы/References

1. Minsky A., Shimoni E., Frenkiel-Krispin D. Stress, order and survival. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(1):50-60. doi 10.1038/nrm700
2. Grant R.A., Filman D.J., Finkel S.E., Kolter R., Hogle J.M. The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA. *Nat Struct Biol.* 1998;5(4):294-303. doi 10.1038/nsb0498-294
3. Berendsen H.J.C., van der Spoel D., van Drunen R. GROMACS: A message passing parallel molecular dynamics implementation. *Comput Phys Commun.* 1995;91(1):43-56. doi 10.1016/0010-4655(95)00042-E
4. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E., UCSF Chimera – A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004;25(4):1605-1612. doi 10.1002/jcc.20084
5. Loiko N., Danilova Y., Moiseenko A., Kovalenko V., Tereshkina K., Tutukina M., El-Registan G., Sokolova O., Krupyanskiy Y. Morphological peculiarities of the DNA-protein complexes in starved *Escherichia coli* cells. *PloS One.* 2020;15(10):e0231562. doi 10.1371/journal.pone.0231562