

Особенности влияния графена и оксида графена на стрессоустойчивость клеток *Escherichia coli*, динамику бактериальной ДНК и ДНК-связывающего белка Dps

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

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

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

* ramm@mail.ru

Ключевые слова: бактериальная жизнеспособность и стрессоустойчивость; стабилизация ДНК бактерий; белок Dps; ДНК-белковые комплексы; молекулярная динамика; моделирование биологических молекул на графене

Мотивация и цель: Исследовать влияние графена и оксида графена на стрессоустойчивость бактерий *Escherichia coli* (*E. coli*). Выявить различия в динамике дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и стабилизирующего ее белка на поверхности графена, оксида графена и в растворе. Полученные данные представляют практический интерес для разработки новых способов стерилизации и для исследования структуры биологических молекул и их комплексов на поверхности графеновых подложек. Результаты исследований могут быть использованы при создании основанных на биологических молекулах наноматериалов с заданными свойствами [1, 2].

Методы и алгоритмы: Бактерии *E. coli* K12 выращивали на среде LB в присутствии разных концентраций графена (Г) и оксида графена (ГО) при температуре 28 °С. Бактериальные популяции, полученные в опытных и контрольных (без добавок Г и ГО) условиях, подвергали 30-минутному воздействию температуры 55 °С и 1–2-минутному воздействию УФ-излучения, определяя количество выживших клеток и оценивая стрессоустойчивость опытных популяций по сравнению с контрольной. Методами молекулярного моделирования исследованы полноатомные модели систем графена, оксида графена, ДНК-связывающего белка Dps бактерии *E. coli* и участков ДНК (25–135 пар нуклеотидов) в несвязанном состоянии и гистоноподобных комплексах. Расчеты молекулярной динамики проводились в полноатомном приближении в периодических ячейках с использованием программного комплекса Gromacs при постоянной температуре 28 °С (поддерживалась с помощью термостата Ланжевена) и давлении 1 атм (поддерживалось с помощью баростата Парринелло–Рамана). Для определения термодинамических характеристик связывания ДНК с молекулами белка Dps применен метод поиска линейной энергии взаимодействия (LIE).

Результаты: Микробиологические исследования показали, что рост бактерий *E. coli* K12 в присутствии Г и ГО влиял на жизнеспособность и стрессоустойчивость выросших популяций. В опытных популяциях после

стрессовых воздействий (55 °С, 30 мин и УФ-облучение, 1–2 мин) количество выживших клеток снижалось на 4–6 порядков, тогда как в контрольной – на 1–3. Эффект был прямо пропорционален количеству Г и ГО, присутствующих в среде во время роста бактерий. При определенных стрессовых режимах клетки опытных популяций погибали полностью, тогда как в контрольных популяциях выживали на уровне 10^6 клеток/мл.

Методами молекулярного моделирования проведено сравнительное исследование конформационной подвижности биологических молекул ферритиноподобного ДНК-связывающего белка Dps (DNA-binding protein from starved cells) *E. coli* и участков ДНК разной длины в растворе, а также на поверхности графена и оксида графена. В многочисленных исследованиях установлено, что Dps является основным белком, обеспечивающим стабилизацию ДНК и выживаемость бактериальных клеток в стрессовых условиях [3]. Он представляет собой гомододекамер с полостью внутри, обладает функциями секвестрации железа в клетке бактерий и обеспечивает выживание бактериальных клеток благодаря способности сокристаллизации с ДНК [3, 4], обеспечивая защиту бактериального генома в стрессовых условиях. Кроме того, это перспективный биополимер для использования в качестве наноматериала [1, 2]. Расчеты молекулярной динамики на 0.1–0.5 мкс траекториях показывают, что графеновые подложки обоих типов существенным образом влияют на подвижность N-концевых (ДНК-связывающих) участков ближайших к поверхности субъединиц белка, связывая их на своей поверхности. Структура белка в целом значительно стабильнее на подложке из неокисленного графена, чем окисленного, на которой начинает изменяться четвертичная структура белка. Проведенный анализ главных компонент (рис. 1) показывает, что адсорбированные на поверхности неокисленного графена N-концы субъединиц, расположенных вдоль нормали к поверхности подложки, испытывают сильные флуктуации, которые передаются всей субъединице в целом, что приводит к структурным перестройкам внутри молекулы белка (поры расширяются, субъединицы смещаются друг относительно друга).

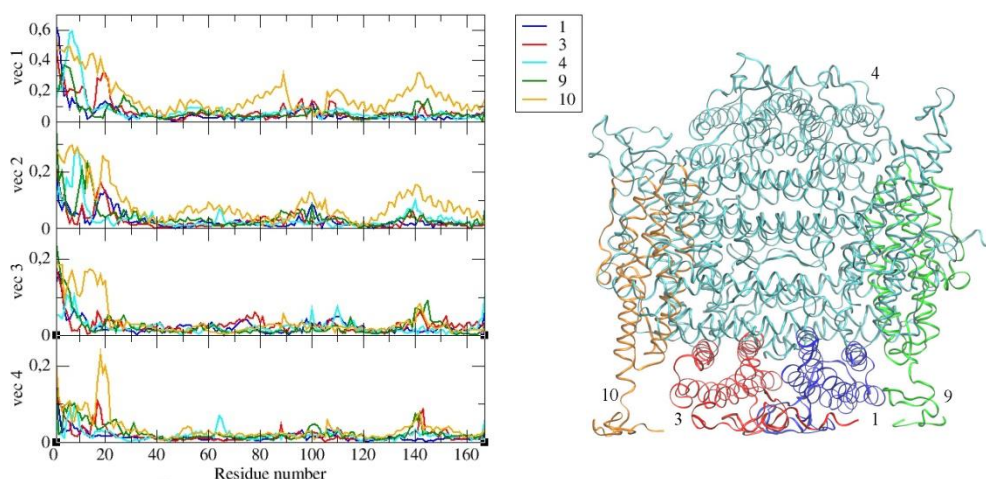


Рис. 1. Слева – анализ среднеквадратичных флуктуаций аминокислотных остатков пяти из 12 субъединиц белка Dps, адсорбированного на поверхность неокисленного графена, относительно четырех собственных векторов (vec1-vec4). Справа – структура белка Dps, цифрами обозначены пять субъединиц, соответствующие графику слева

Исследовалась динамика комплексов Dps-ДНК на графеновых подложках. Показано, что при приближении комплекса к подложке олигонуклеотиды (25 пар нуклеотидов) отрываются от белка и адсорбируются на графене и оксиде графена. Гистоноподобные комплексы Dps с ДНК (165 пар нуклеотидов) также претерпевают структурные перестройки: ДНК начинает отрываться от белка и приближаться к графеновой подложке (рис. 2).

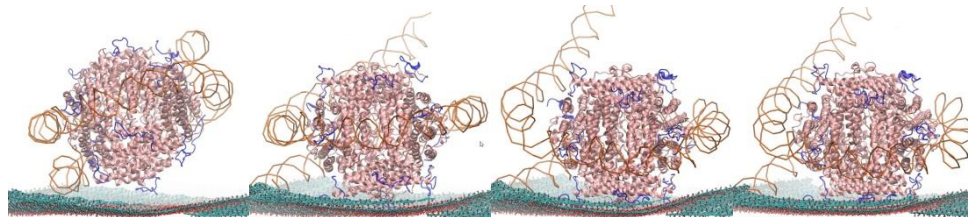


Рис. 2. Комплекс белка Dps с ДНК (165 пар нуклеотидов) на оксиде графена в течение времени траектории (слева направо): начальное положение, 100 нс, 200 нс, 300 нс. Белок Dps – розовый, N-концевые аминокислотные остатки – синие, ДНК – оранжевая спираль, оксид графена – голубая подложка

Образование комплексов ДНК-Dps на графеновых подложках происходит, однако такие комплексы оказываются менее стабильны, чем комплексы в растворе. Свободная энергия связывания ДНК ниже в том случае, если молекула оказывается связанной с графеновой подложкой и белком, нежели только с белком.

Выводы: Обнаружено, что рост бактерий *E. coli* в присутствии Г и ГО приводит к резкому снижению их стрессоустойчивости к температурному и УФ воздействию, что может быть использовано для разработки новых способов стерилизации. В результате проведенных молекулярно-динамических расчетов выявлено влияние подложек графена и оксида графена на динамику и структуру комплексов ДНК-стабилизирующего белка Dps *E. coli* с ДНК. Показано, что неокисленный графен может привести к изменению четвертичной структуры белка. ДНК в комплексах стремится связаться одновременно и с белком, и с подложкой, что приводит к структурным перестройкам или разрушению комплексов Dps-ДНК.

Финансирование: Расчеты проводились на высокопроизводительной вычислительной системе МВС–10П в Межведомственном суперкомпьютерном центре Российской академии наук (МЦЦ РАН). Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России (Тема FFZE-2022-0011, № 122040400089-6, 122040800164-6).

Peculiarities of the influence of graphene and graphene oxide on the stress resistance of *Escherichia coli* cells, the dynamics of bacterial DNA and the DNA-binding protein Dps

Tereshkin E.V.^{1*}, Loiko N.G.², Potokina V.V.², Kovalenko V.V.¹, Krupyanskiy Y.F.¹, Tereshkina K.B.¹

Key words: bacterial viability and stress resistance; stabilization of bacterial DNA; Dps protein; DNA-protein complexes; molecular dynamics; modeling of biological molecules on graphene

Motivation and Aim: To study the effect of graphene and graphene oxide on the stress resistance of *Escherichia coli* (*E. coli*) bacteria. Identify differences in the dynamics of deoxyribonucleic acid (DNA) and the protein that stabilizes it on the surface of graphene, graphene oxide and in solution. The data obtained are of practical interest for the development of new sterilization methods and for researchers of the structure of biological molecules and their complexes on the surface of graphene substrates. The research results can be used to create nanomaterials based on biological molecules with specified properties [1, 2].

Methods and Algorithms: *E. coli* K12 bacteria were grown in LB medium in the presence of different concentrations of graphene (G) and graphene oxide (GO) at a temperature of 28 °C. Bacterial populations obtained under experimental and control (without G and GO additives) conditions were subjected to 30 min exposure to a temperature of 55 °C and 1–2 min exposure to UV radiation, determining the number of surviving cells and assessing the stress resistance of the experimental populations compared to the control. Using molecular modeling methods, all-atom models of graphene, graphene oxide, the DNA-binding protein Dps of the bacterium *E. coli* and DNA oligonucleotides (25–135 base pairs) in an unbound state and in histone-like complexes were studied. Molecular dynamics simulations were carried out in the all-atom approximation in periodic boxes using Gromacs at a constant temperature of 28 °C (maintained using a Langevin thermostat) and a pressure of 1 atm (maintained using a Parrinello-Raman barostat). To determine the thermodynamic characteristics of DNA binding to Dps protein molecules, the linear interaction energy (LIE) method was used.

Results: Microbiological studies showed that the growth of *E. coli* K12 bacteria in the presence of G and GO influenced the viability and stress resistance of the grown populations. In the experimental populations, after stress exposure (55 °C, 30 min and UV irradiation, 1–2 min), the number of surviving cells decreased by 4 to 6 orders of magnitude, while in the control population by 1 to 3. The effect was directly proportional to the amount of G and GO present in the medium during bacterial growth. Under certain stress conditions, the cells of the experimental populations died completely, while in the control populations they survived at a level of 10⁶ cells/ml.

Using molecular modeling methods, a comparative study of the conformational mobility of biological molecules of the ferritin-like DNA-binding protein Dps (DNA-binding protein from starved cells) of *E. coli* and DNA sections of different lengths in solution, as well as on the surface of graphene and graphene oxide, was carried out. Numerous studies have established that Dps is the main protein that ensures DNA stabilization and the survival of bacterial cells under stressful conditions [3]. It is a homododecamer with a cavity inside and has the functions of sequestering iron in the bacterial cell and ensures the survival of bacterial cells due to the ability to co-crystallize with DNA [3, 4], providing protection of the bacterial genome under stressful conditions. In addition, it is a promising biopolymer for use as a nanomaterial [1, 2]. Molecular dynamics simulations on 0.1–0.5 μs trajectories show that graphene substrates of both types

significantly affect the mobility of the N-terminal (DNA-binding) regions of the protein subunits closest to the surface, binding them to their surface. The protein structure as a whole is much more stable on a substrate made of unoxidized graphene than on an oxidized one, on which the quaternary structure of the protein begins to change. The analysis of the principal components (Fig. 1) shows that the N-termini of subunits adsorbed on the surface of unoxidized graphene, located along the normal to the surface of the substrate, experience strong fluctuations, which are transmitted to the entire subunit as a whole, which leads to structural rearrangements inside the protein molecule (pores expand, subunits move relative to each other).

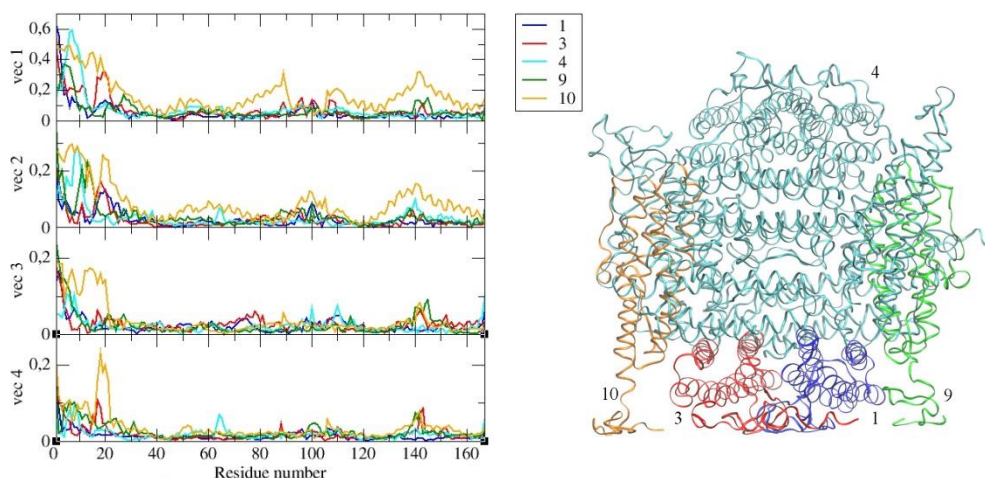


Fig. 1. On the left is an analysis of the root mean square fluctuations of amino acid residues of five of the 12 subunits of the Dps protein adsorbed on the surface of unoxidized graphene, relative to four eigenvectors (vec1-vec4). On the right is the structure of the Dps protein, with numbers indicating the five subunits that correspond to the graphs on the left

The dynamics of Dps-DNA complexes on graphene substrates was studied. It was shown that when the complex approaches the substrate, oligonucleotides (25 nucleotide pairs) are detached from the protein and adsorbed on graphene and graphene oxide. Histone-like complexes of Dps with DNA (165 base pairs) also undergo structural rearrangements: DNA begins to detach from the protein and approaches the graphene substrate (Fig. 2).

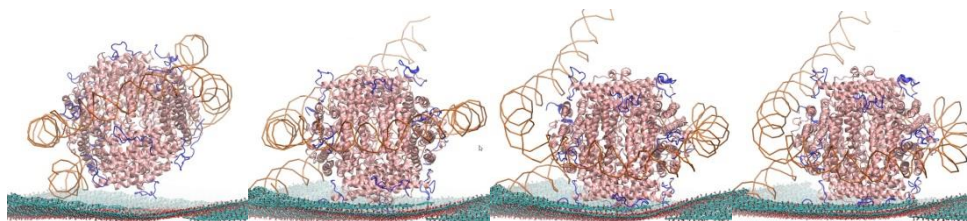


Fig. 2. Dps protein complex with DNA (165 nucleotide pairs) on graphene oxide during the trajectory time (from left to right): initial position, 100 ns, 200 ns, 300 ns. Dps protein – pink, N-terminal amino acid residues – blue, DNA – orange helix, graphene oxide – blue substrate

The formation of DNA-Dps complexes on graphene substrates occurs, but such complexes turn out to be less stable than complexes in solution. The free energy of DNA binding turns out to be lower if it is bound to both the graphene substrate and the protein, rather than only to the protein.

Conclusion: It was found that the growth of *E. coli* bacteria in the presence of G and GO leads to a sharp decrease in their stress resistance to temperature and UV exposure, which can be used to develop new sterilization methods. As a result of molecular dynamics simulations, the influence of G and GO substrates on the dynamics and structure of complexes of the DNA-stabilizing protein Dps of *E. coli* with DNA was revealed. It has been shown that G can lead to changes in the quaternary structure of the protein. DNA in complexes tends to contact both the protein and the substrate (G or GO) simultaneously, which leads to structural rearrangements or destruction of Dps-DNA complexes.

Funding: This study was carried out as part of a state task of the Ministry of Education and Science of Russia on the topic FFZE-2022-0011 (registration numbers 122040400089-6 and 122040800164-6). The computations were performed on MVS-10P at the Joint Supercomputer Center of the Russian Academy of Sciences.

Список литературы/References

1. Kamitake H., Uenuma M., Okamoto N., Horita M., Ishikawa Y., Yamashita I., Uraoka Y. Floating gate memory with charge storage dots array formed by Dps protein modified with site-specific binding peptides. *Nanotechnology*. 2015;26(19):195201. doi 10.1088/0957-4484/26/19/195201
2. Gupta N.K., Karuppanan S.K., Pasula R.R., Vilan A., Martin J., Xu W., May E.M., Pike A.R., Astier H.P.A.G., Salim T., Lim S., Nijhuis C.A. Temperature-Dependent Coherent Tunneling across Graphene-Ferritin Biomolecular Junctions. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2022;14(39):44665-44675. doi 10.1021/acsami.2c11263
3. 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
4. Tereshkin E.V., Tereshkina K.B., Krupyanskii Yu.F. Predicting Binding Free Energies for Dps Protein-DNA complexes and Crystals Using Molecular Dynamics. *Supercomput Front Innovations*. 2022;9(2):33-45. doi 10.14529/jsfi220203