

Динамика связывания ДНК со стресс-ассоциированными ДНК-связывающими бактериальными белками

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

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

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

* quebra-mola@yandex.ru

Ключевые слова: стабилизация ДНК бактерий; белок Dps; кристаллы ДНК-Dps; ферритиноподобные белки у бактерий; полноатомное молекулярное моделирование

Мотивация и цель: Переход бактериальных клеток в покоящееся состояние при стрессах сопровождается значительным снижением их чувствительности к антибиотикам, антисептикам, дезинфектантам и консервантам, что создает существенные проблемы в области антибактериальных мероприятий для медицины и производств, где требуется соблюдение условий стерильности [1]. Важную роль в сохранении генетического материала бактерий в таких состояниях играют ферритиноподобные ДНК-связывающие белки Dps и их гомологи [2]. Целью данной работы было выявление множественности этих белков среди бактерий, в том числе болезнетворных, и исследование возможностей связывания ими ДНК у ряда бактерий.

Методы и алгоритмы: Методами молекулярного моделирования и биоинформатики проведены сравнительные исследования структур белков Dps и гомологичных им у ряда бактерий и их комплексов с ДНК. Изучение образования и эволюции комплексов проведено методом классической молекулярной динамики на основе программного комплекса Gromacs в полноатомном приближении на траекториях до 1 мкс согласно разработанным ранее протоколам [3].

Результаты: Dps (DNA protection during starvation protein) представляет собой гомододекамер и у бактерии *Escherichia coli* (*E. coli*) выполняет важнейшие функции [2]. Прежде всего, он защищает клетку от опасных ионов Fe^{2+} , аккумулируя их во внутренней полости в связанном состоянии Fe^{3+} ---белок. Также, наряду с не содержащим гема бактериальным ферритином FtnA и бактериоферритином Bfr, он связывает бактериальную ДНК, защищая ее в неблагоприятных условиях. Последнее возможно благодаря связыванию ДНК свободными N-концами белка и способности в определенных условиях легко образовывать сокристаллы ДНК-Dps. Изучение литературных источников и баз данных дает понимание того, что гомологичные Dps *E. coli* белки распространены повсеместно у бактерий и архей. В базе данных Uniprot обнаруживается более 25 тыс. записей. Несколько десятков расшифрованных экспериментальными методами структур, относящихся к 37 видам бактерий и архей, выложены в базе данных PDB.

Как хорошо видно из результатов выравнивания первичных последовательностей гомологов Dps некоторых бактерий (рис. 1), аминокислотные остатки, входящие в феррооксидазные центры и отвечающие за связывание Fe^{2+} , у всех бактерий совпадают. В то время как общее сходство последовательностей ограничивается 20 %. Основные различия в ДНК-связывающей способности должны определяться структурой N- и С-концевых «хвостов», которые захватывают ДНК и обеспечивают начальные этапы ее упаковки.

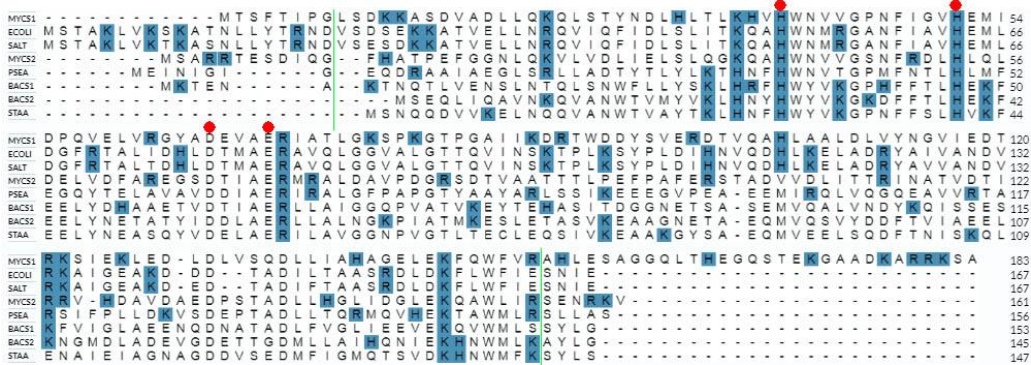


Рис. 1. Выравнивание первичных аминокислотных последовательностей ДНК-связывающих белков бактерий (сверху вниз): *Mycobacterium smegmatis* Dps1, *Escherichia coli* Dps, *Salmonella typhimurium* Dps, *Mycobacterium smegmatis* Dps2, *Pseudomonas aeruginosa* Dps, *Bacillus subtilis* MrgA, *Bacillus subtilis* Dps, *Staphylococcus aureus* MrgA. Выделены положительно заряженные аминокислотные остатки. Красными кружками обозначены аминокислотные остатки, входящие в сайты связывания Fe^{2+} . Зелеными линиями примерно ограничены N-концевые и С-концевые участки

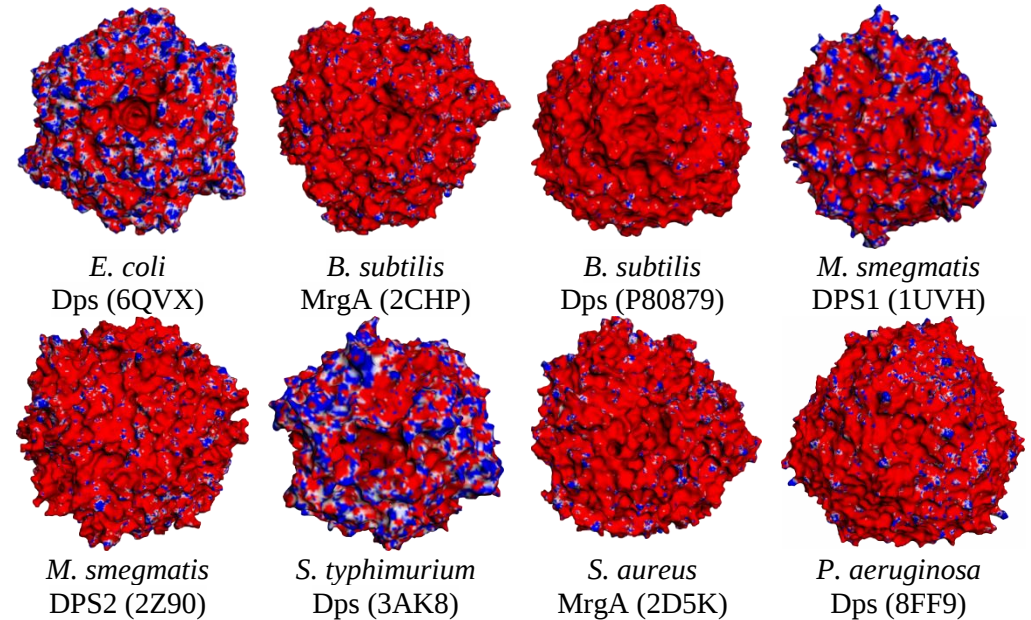


Рис. 2. Поверхности Ван-дер-Ваальса белков Dps, окрашенные в соответствии с рассчитанными электростатическими потенциалами от электроотрицательного (красный) до электроположительного (синий) при pH = 7.2. Приведен вид со стороны ферритиновой поры. Под рисунками указаны названия бактерий, белков, код PDB (код AlphaFold для Dps *Bacillus subtilis*)

Следует отметить, что в процессе образования ДНК-белкового комплекса ДНК и белок подстраиваются друг под друга. ДНК изгибается. Радиусы гирации белков при сближении с ДНК (рис. 3) снижаются по сравнению с белками в растворе. Способность образования рассматриваемых комплексов имеет температурную и pH зависимость.

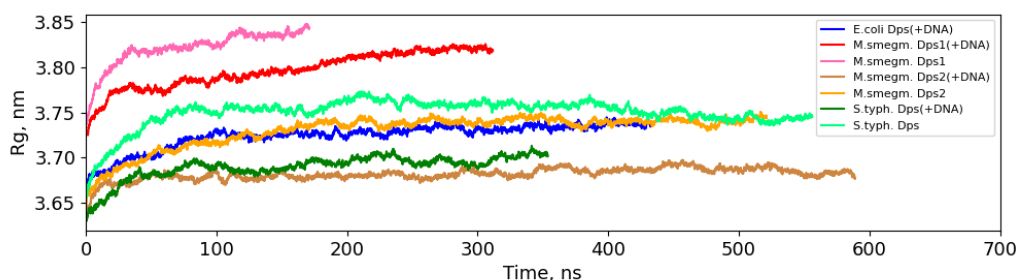


Рис. 3. Радиусы гирации белков Dps в растворе и в комплексах с ДНК

Выводы: В работе исследован ряд ДНК-связывающих ферритиноподобных бактериальных белков Dps. Выравнивание первичных последовательностей указывает на высокую консервативность связывающих железо центров и широкое разнообразие длин, а также последовательностей концевых участков. Показано, что способные связывать ДНК белки встречаются и у грамположительных, и у грамотрицательных бактерий. Основное влияние на способность связывать ДНК оказывает заряд поверхности белка и наличие длинных (порядка 10–20 аминокислотных остатков) свободных концов, которые встраиваются в бороздки ДНК и подтягивают ДНК к поверхности белка.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 23-24-00250. Расчеты проводились на высокопроизводительной вычислительной системе МВС–10П в Межведомственном суперкомпьютерном центре Российской академии наук (МСЦ РАН).

Dynamics of DNA binding to stress-associated DNA-stabilizing bacterial proteins

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

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

² *Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology”, RAS, Moscow, Russia*

* *quebra-mola@yandex.ru*

Key words: bacterial DNA stabilization; Dps protein; DNA-Dps crystals; ferritin-like proteins in bacteria; all-atom molecular modeling

Motivation and Aim: The transition of bacterial cells to a starved state under stress is accompanied by a significant decrease in their sensitivity to antibiotics, antiseptics, disinfectants and preservatives, which creates significant problems in the field of antibacterial measures for medicine and industries where sterility conditions are required [1]. Ferritin-like DNA-binding proteins Dps and homologues play an important role in

preserving the genetic material of bacteria in such conditions [2]. The purpose of this work was to determine the prevalence of these proteins among bacteria, including pathogenic ones, and to study the possibilities of their DNA binding in a number of bacteria.

Methods and Algorithms: Using molecular modeling and bioinformatics methods, comparative studies of the structures of Dps proteins and homologous proteins in a number of bacteria and their complexes with DNA were carried out. The formation and evolution of complexes was studied using the method of classical molecular dynamics based on the Gromacs software package in the all-atom approximation on trajectories up to 1 μ s according to a previously developed protocols [3].

Results: Dps (DNA protection during starvation protein) is a homododecamer and performs essential functions in the bacterium *Escherichia coli* (*E. coli*) [2]. First, it protects the cell from dangerous Fe^{2+} ions, accumulating them in the internal cavity in the bound state of Fe^{3+} ---protein. Also, along with the non-heme bacterial ferritin FtnA and bacterioferritin Bfr, it binds bacterial DNA, protecting it under stress conditions. The latter is possible due to the binding of DNA by the free N-termini of the protein and the ability, under certain conditions, to easily form DNA-Dps co-crystals. A study of literature sources and databases provides an understanding that proteins homologous to *E. coli* Dps are ubiquitous in bacteria and archaea. More than 25 thousand entries are found in the Uniprot database. Several dozen structures related to 37 species of bacteria and archaea, resolved by experimental methods, are posted in the PDB database.

As is clearly seen from the results of alignment of the primary sequences of Dps homologs of some bacteria (Fig. 1), the amino acid residues included in the ferroxidase centers and responsible for Fe^{2+} binding are the same in all bacteria. While the overall sequence similarity is limited to 20 %. The major differences in DNA-binding capacity is apparently determined by the structure of the N- and C-terminal “tails” that capture DNA and provide the initial steps of its packaging.

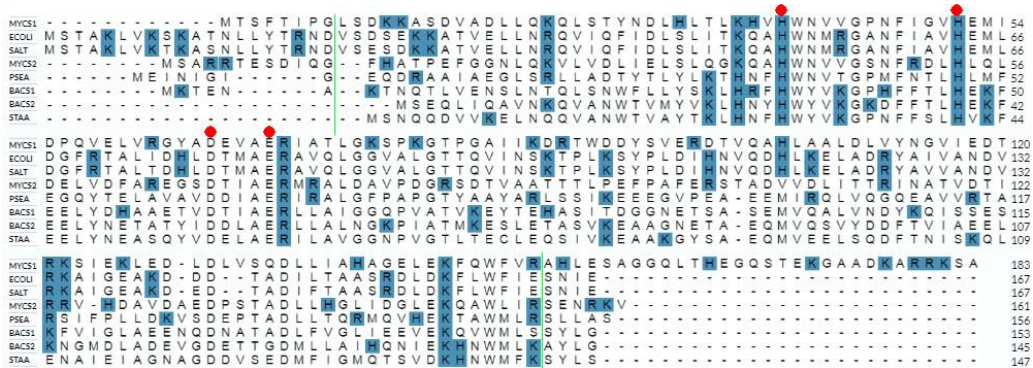


Fig. 1. Alignment of primary amino acid sequences of bacterial DNA-binding proteins (from top to bottom): *Mycobacterium smegmatis* Dps1, *Escherichia coli* Dps, *Salmonella typhimurium* Dps, *Mycobacterium smegmatis* Dps2, *Pseudomonas aeruginosa* Dps, *Bacillus subtilis* MrgA, *Bacillus subtilis* Dps, *Staphylococcus aureus* MrgA. Positively charged amino acid residues are highlighted. Red circles indicate amino acid residues included in Fe^{2+} binding sites. Green lines roughly delimit the N-terminal and C-terminal regions

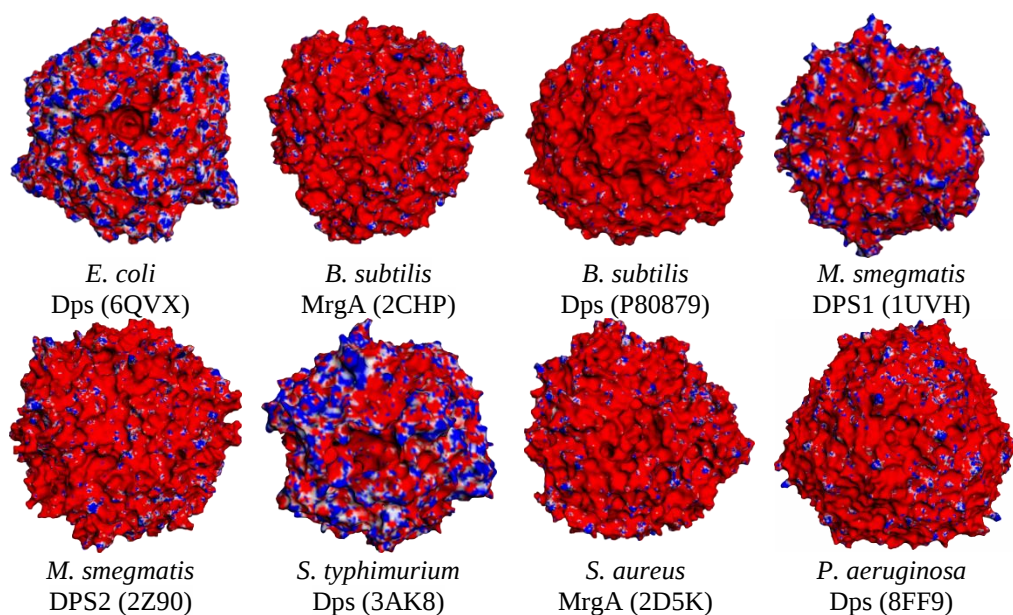


Fig. 2. Van der Waals surfaces of Dps proteins, colored according to calculated electrostatic potentials from electronegative (red) to electropositive (blue) at pH=7.2. The view is shown from the side of the ferritin pore. Below the figures are the names of bacteria, proteins, and the PDB code (AlphaFold code for Dps *Bacillus subtilis*)

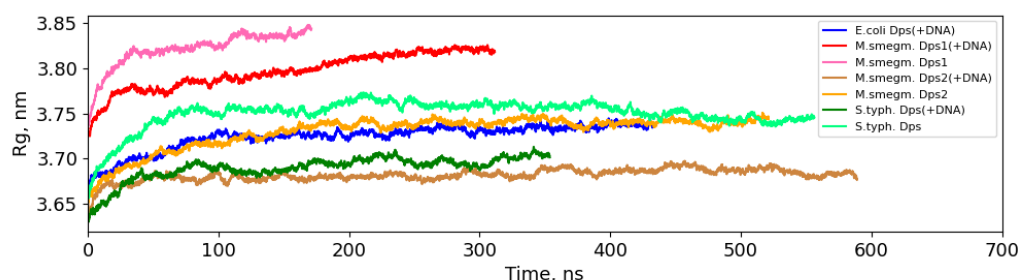


Fig. 3. Radii of gyration for Dps proteins in solution and in complexes with DNA

It should be noted that during the formation of a DNA-protein complex, DNA and protein adapt to each other. DNA bends. The radii of gyration of proteins when approaching DNA (Fig. 3) decrease compared to proteins in solution. The ability to form the complexes under consideration is temperature and pH dependent.

Conclusion: In this work, a number of DNA-binding ferritin-like bacterial proteins Dps were studied. The alignment of the primary sequences indicates high conservation of the iron-binding centers and a wide variety of lengths as well as sequences of the terminal regions. It has been shown that proteins capable of binding DNA are found in both gram-positive and gram-negative bacteria. The main influence on the ability to bind DNA is exerted by the surface charge of the protein and the presence of long (about 10–20 amino

acid residues) free termini, which are embedded in DNA grooves and pull the DNA to the protein surface.

Funding: The research was financially supported by RSF Grant No. 23-24-00250. The computations were performed on MVS-10P at the Joint Supercomputer Center of the Russian Academy of Sciences.

Список литературы/References

1. Windels E.M., Van den Bergh B., Michiels J. Bacteria under antibiotic attack: Different strategies for evolutionary adaptation. *PLoS Pathog.* 2020;16(5):e1008431. doi 10.1371/journal.ppat.1008431
2. Orban K., Finkel S.E. Dps Is a Universally Conserved Dual-Action DNA-Binding and Ferritin Protein. *J Bacteriol.* 2022;17;204(5):e0003622. doi 10.1128/jb.00036-22
3. Tereshkin E.V., Loiko N.G., Tereshkina K.B., Kovalenko V.V., Krupyanskii Y.F., Possible mechanisms of 4-hexylresorcinol influence on DNA and DNA–Dps nanocrystals affecting stress sustainability of *Escherichia coli*. *Russ J Phys Chem B.* 2022;16(4):726. doi 10.1134/S1990793122040285