

ГЕКСУРОНАТЫ ВЛИЯЮТ НА ОЛИГОМЕРНУЮ ФОРМУ СТРУКТУРНОГО БЕЛКА БАКТЕРИАЛЬНОГО НУКЛЕОИДА Dps И ЕГО СПОСОБНОСТЬ СВЯЗЫВАТЬСЯ С ЛИНЕЙНЫМИ ФРАГМЕНТАМИ ДНК

© 2016 г. Т.А. Бессонова* **, С.А. Шумейко*, Ю.А. Пуртов*, С.С. Антипов* *** **** ***** , Е.В. Преображенская* ***, М.Н. Тутукина* ****, О.Н. Озолинь* ****

*Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3;

**Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, 620002, Екатеринбург, ул. Мира, 19;

***Воронежский государственный университет, 394006, Воронеж, Университетская пл., 1;

****Пущинский государственный естественно-научный институт, 142290, Пущино, просп. Науки, 3;

*****Химико-биологический институт Балтийского федерального университета имени Иммануила Канта, 236041, Калининград, ул. Университетская, 2

E-mail: ozoline@rambler.ru

Поступила в редакцию 02.09.16 г.

Белки семейства Dps выполняют в бактериальных клетках две функции. Являясь ферритинами, они защищают клетки от токсичного действия Fe^{2+} , а взаимодействуя с ДНК – конденсируют геном в отсутствие источников питания, при этом большое значение имеет способность Dps к самоагрегации. Механизм выхода генома из конденсированного состояния пока не известен. В работе исследовано влияние двух лигандов сахарной природы на взаимодействие Dps с ДНК *in vitro*. Впервые установлено, что D-глюкуронат и D-галактуронат, в отличие от D-глюкозы, способны разрушать додекамерную структуру белка. D-глюкуронат при этом стимулировал образование бинарных комплексов с линейными фрагментами ДНК. В результате гибкого молекулярного докинга было обнаружено, что молекулы всех трех углеводов потенциально могут образовывать кластер внутри белковой полости Dps, но D-глюкуронат и D-галактуронат связываются и в области межсубъединичных контактов олигомера. Обусловленная этим дестабилизация межсубъединичных связей может быть основным фактором, провоцирующим распад белка на более мелкие олигомерные формы. Закономерно снижая агрегацию, такое изменение структуры может играть ключевую роль в деконденсации генома при переходе клетки к фазе быстрого роста.

Ключевые слова: Dps, гексуронаты, нуклеоид, ДНК-белковые комплексы, молекулярный докинг.

Упаковка ДНК на различных фазах роста бактериальной культуры играет важную роль, так как от нее зависит реализация практически всех процессов, происходящих в клетке. Основным архитектурным фактором, обеспечивающим плотную упаковку ДНК на стационарной фазе роста кишечной палочки (*Escherichia coli*), является белок Dps [1,2]. Это мультифункциональный белок, состоящий из 12 одинаковых субъединиц [3], который способен компактировать ДНК [4], окислять ионы переходных металлов и накапливать их оксиды внутри своей полости [5]. Механизм окисления железа белком Dps относительно хорошо изучен и по своей сути мало отличается от механизма, характерного для других ферритинов. Закономерности,

лежащие в основе взаимодействия Dps с ДНК, изучены гораздо хуже. Однако известно, что, защищая клетки от различных стрессов во время стационарного роста [6,7], Dps также предотвращает разрушение бактериальной хромосомы в условиях осмотического [8] и окислительного [9] стрессов в метаболически-активных клетках.

К настоящему времени известно, что во взаимодействии с ДНК принимают участие неструктурированные N-концевые модули 12 субъединиц, выступающие над поверхностью белковой глобулы и имеющие в своем составе три аминокислотных остатка лизина и один остаток аргинина [3]. Наличие этих аминокислот предполагает возможность формирования электро-

Праймеры, использованные в работе

Название	Последовательность (подчеркнуты отсутствующие в геноме линкеры)	Позиция 5'-конца геномной последовательности	Нить	Длина фрагмента с линкерами
dps_XbaI	5'-TCCTCTAGATGTTATGTCCCAGT-3'	848930	+	259 н.п.
dps_BglII	5'-ATGCAGATCTTCTCGCTACTTTTC-3'	849169	-	
fliA_XbaI	5'-AACCTCTAGACGCAATGCTTCGTGAC-3'	2001702	+	368 н.п.
fliA_BglII	5'-GCGCAGATCTTATCAGGCCTACAAGT-3'	2002049	-	

статических контактов с отрицательно заряженным фосфатным остовом ДНК. Поэтому долгое время считалось, что Dps, подобно гистонам, может связываться с любыми участками ДНК независимо от их нуклеотидной последовательности. Однако оказалось, что Dps способен выбирать один из двух конкурирующих фрагментов ДНК *in vitro* [10], что свидетельствует о некоторой селективности в отношении нуклеотидных последовательностей или структурных особенностей ДНК. Это значит, что биологическая роль Dps может не ограничиваться его участием в защитной конденсации бактериальной хромосомы или отдельных генетических локусов, но вопрос о возможности его участия в регуляции генной экспрессии пока остается открытым.

Для исследования такой возможности принципиальное значение имеет доступность бинарных комплексов Dps с разными фрагментами ДНК. Однако их образование пока удалось зарегистрировать только методом атомно-силовой микроскопии [10]. Это обусловлено склонностью молекул Dps к быстрой агрегации в присутствии ДНК. В образовании белок-белковых контактов участвуют все те же N-концевые модули, которые при этом связываются с отрицательно заряженной поверхностью Dps [4]. Присутствие ДНК провоцирует перестройку сформировавшихся контактов и способствует перекрестному взаимодействию разных молекул белка. В результате получают агрегаты, которые при использовании электрофоретического фракционирования (задержка ДНК-белковых комплексов в геле) не входят в гель.

Эта способность к агрегации принципиально важна для конденсации генома. В результате на поздней стационарной фазе роста в бактериальных клетках, содержащих огромное количество Dps [2], образуются кристаллоподобные структуры [11]. Чтобы клетка вновь могла перейти в фазу быстрого роста при появлении новых источников питания, эту структуру необходимо разрушить. Учитывая крайне высокую стабильность комплексов Dps-ДНК, ясно,

что это невозможно сделать простым прекращением синтеза новых молекул белка. Поэтому возникло предположение о зависимости прочности комплексов, формируемых Dps с ДНК, от какого-то компонента, который появляется в клетках вместе с новыми источниками питания. Поиск этого компонента и стал основной целью данной работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Основным объектом исследования был белок Dps *E. coli*. Синтез рекомбинантного Dps осуществляли в клетках *E. coli* BL21*(DE3), трансформированных плазмидой pGEM_dps, а выделение и очистку белка проводили согласно разработанной нами ранее методике [12].

Аmplификацию фрагментов, выбранных для анализа эффективности их взаимодействия с белком Dps, проводили с помощью полимеразной цепной реакции на программируемом термостате Thermocycler (Biometra, Германия). Последовательности использованных в работе праймеров и позиции их 5'-концов в геноме *E. coli* K-12 MG1655 (GenBank U00096.3) приведены в таблице.

Все праймеры были максимально выровнены по GC-составу, поэтому программа амплификации для обоих фрагментов была одинаковой и состояла из следующей последовательности (всего 35 циклов):

94°C – 3 мин (предварительная денатурация ДНК-матрицы);

94°C – 20 с (плавление цепей);

55°C – 30 с (отжиг праймеров);

71°C – 30 с (синтез второй цепи ДНК).

Смесь для полимеразной цепной реакции (20 мкл) содержала по 10 пмоль праймеров, 0,1 мМ каждого dNTP, 10 нг геномной ДНК, 1 X Taq-буфер (67 мМ трис-HCl, pH 8,8, 2 мМ MgCl₂, 15 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,2% бычьего сывороточного альбумина), 1 U Taq ДНК-полимеразы («Евроген», Россия), стерильную деионизованную воду. Полученные ампликоны очи-

шали от праймеров и субстратов электрофоретическим фракционированием в 5% полиакриламидном геле. Электрофорез проводили в трис-боратном буфере (89 мМ трис-НСl, 89 мМ борной кислоты, 2 мМ EDTA, pH 8,0) в электрическом поле с напряжением 200–250 В и силой тока 70–110 мА. После разделения фрагментов гель окрашивали бромистым этидием и визуализировали в проходящем ультрафиолетовом свете. Полученные после электрофоретического разделения фрагменты ДНК экстрагировали из геля по методике, описанной в работе [13].

Для оценки эффективности взаимодействия Dps с ДНК-мишенями был использован метод задержки ДНК-белковых комплексов в геле (EMSA, Electrophoretic Mobility Shift Assay). Комплексы формировали в течение 40 мин при 30°C в 15 мкл буфера, содержащего 10 мМ трис-НСl (pH 8,0), 0,02 мМ EDTA, 10 мМ NaCl, после чего в пробы добавляли 50% глицерин и наносили на 5% полиакриламидный гель, предварительно прогретый до 30°C. Для изучения зависимости комплексообразования от присутствия в среде сахаров в пробу добавляли D-глюкозу, D-глюкуронат или D-галактуронат в концентрации 5 мМ. Для поиска минимальной концентрации питательного вещества, вызывающей изменения в структуре белка, использовали диапазон концентраций D-глюкуроната от 40 до 1 мМ (ранее для изучения влияния сахаров на связывание белков с ДНК была использована концентрация 100 мМ [14]). Для визуализации полос гели окрашивали бромистым этидием и нитратом серебра [15]. О взаимодействии между очищенным белком и фрагментом ДНК судили по убыли свободной ДНК или по образованию комплекса с меньшей (по сравнению со свободной ДНК) электрофоретической подвижностью.

Для моделирования взаимодействия молекул исследуемых углеводов (α -D-глюкоза, D-галактуронат и D-глюкуронат) с олигомером белка Dps был использован метод последовательного молекулярного докинга. Мишенью служила модель олигомера Dps, взятая из Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1DPS>) [3]. Эта модель (код: 1dps) была получена в 1998 г. методом рентгеновской дифракции с разрешением 1,6 Å, что является достаточным для расчетов методом гибкого докинга [16]. В процессе подготовки к расчетам из модели были удалены присутствовавшие в ней молекулы воды и ионы натрия.

Модели углеводов, использованные в качестве лигандов для докинга, были получены в

циклической форме с использованием PubChem DB и программы Open Babel (v. 2.2.3) [17]. Гибкий молекулярный докинг осуществляли с использованием пакета программ Autodock VINA [18]. Расположение лигандов на поверхности молекулы-мишени визуализировали с помощью Python Molecular Viewer (v. 1.5.6) [19]. Для докинга была использована вся поверхность белка Dps в ячейке размером 124 × 124 × 124 Å. Были проведены три серии последовательных расчетов по 120 раундов для каждого углевода. В каждой серии после очередного раунда докинга модель лиганда с наибольшей аффинностью добавлялась к модели мишени, а полученная таким образом новая модель использовалась в качестве мишени для следующего раунда. В итоге были получены структуры, состоящие из одной молекулы олигомера Dps и 1–120 молекул соответствующего углевода.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основной целью данного исследования был поиск клеточного компонента, способного повлиять на характер взаимодействия Dps с ДНК. Так как наиболее масштабные перестройки генома, опосредованные Dps, имеют место при недостатке питательных веществ, а их появление закономерно приводит к быстрому восстановлению экспоненциального роста, мы предположили, что прочность комплексов, формируемых Dps с ДНК, может зависеть от какого-то вещества, используемого бактериями для питания. Выбор D-глюкозы, являющейся субстратом гликолиза, и D-глюкуроната, являющегося интермедиатом энергетически более выгодного метаболического пути Эшвелла, был обусловлен именно этими соображениями.

Так как для перехода генома из кристаллоподобной структуры стационарной фазы в активное состояние экспоненциального роста необходима дезагрегация хроматина, мы предположили, что это может сопровождаться формированием бинарных комплексов с фрагментами ДНК. Поэтому в качестве тестового метода, способного выявить изменения в характере ДНК-белковых контактов, был выбран метод задержки ДНК-белковых комплексов в геле (EMSA). В качестве модельных мишеней для взаимодействия с Dps были выбраны два фрагмента бактериальной ДНК. Один из фрагментов – из регуляторной области гена *dps* – был использован нами ранее [10] и в условиях конкуренции связывался с Dps эффективнее, чем фрагмент соседнего участка. Второй фрагмент был взят из регуляторной области гена *fliA*,

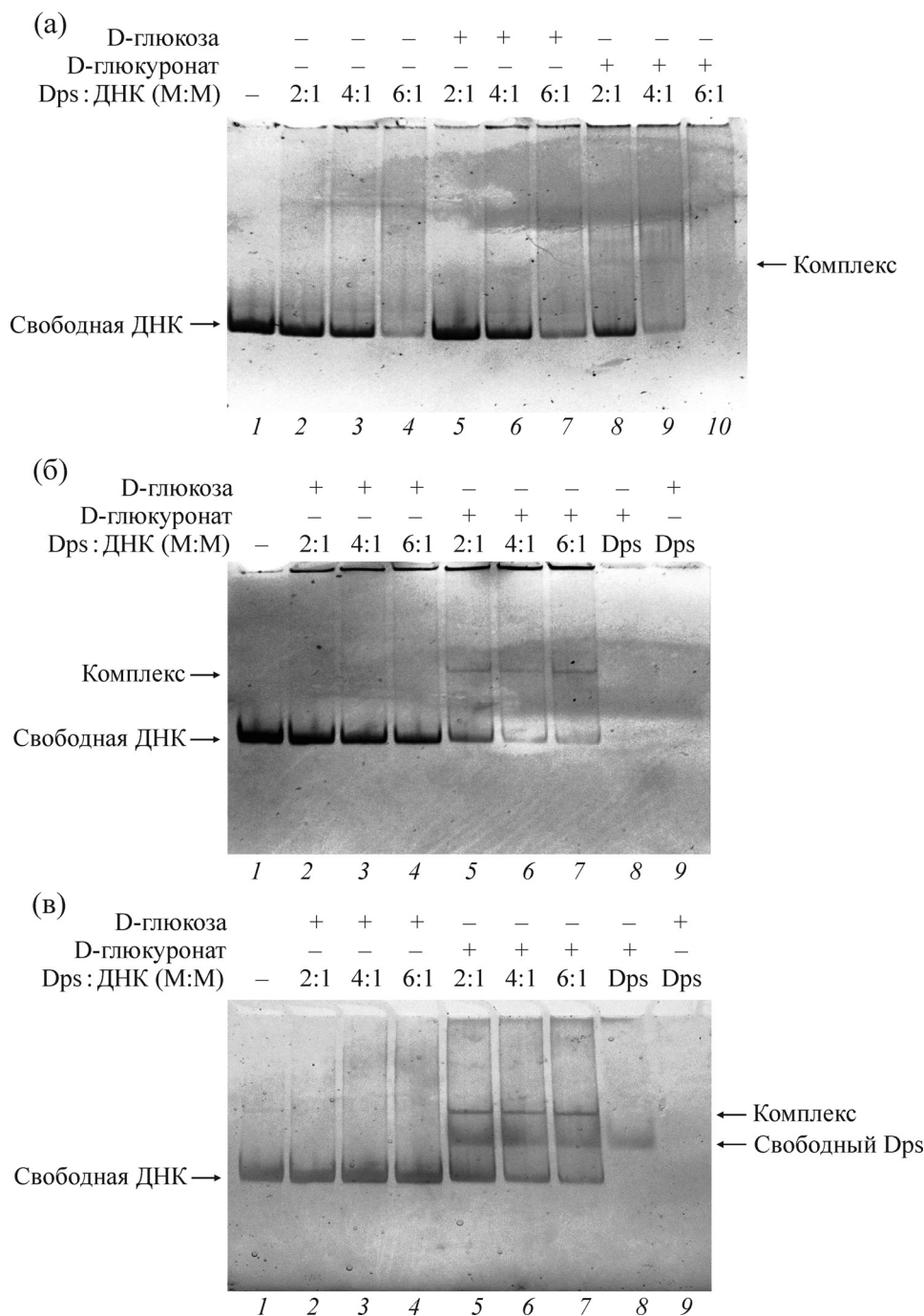


Рис. 1. Зависимость комплексообразования Dps с линейными фрагментами ДНК регуляторных областей генов *dps* (а) и *fliA* (б,в) от углеводов. Показаны результаты электрофоретического фракционирования макромолекул и их комплексов, дорожка М – маркер. Состав проб и молярное соотношение Dps к ДНК указано над дорожками. Гели на панелях (а) и (б) были прокрашены бромистым этидием; на панели (в) – нитратом серебра.

кодирующего $\sigma^{28}(\sigma^F)$ -субъединицу РНК-полимеразы, под контролем которой находятся гены клеточной подвижности.

На рис. 1 показаны результаты электрофоретического фракционирования проб, содержащих модельные фрагменты ДНК (дорожка 1),

белок Dps (дорожки 8 и 9 на панелях (б) и (в) и ДНК-белковые комплексы. По убыванию свободной ДНК видно, что Dps взаимодействует с фрагментом из регуляторной области своего гена (дорожки 2–4 на панели (а)), хотя образующиеся комплексы из-за агрегации не входят

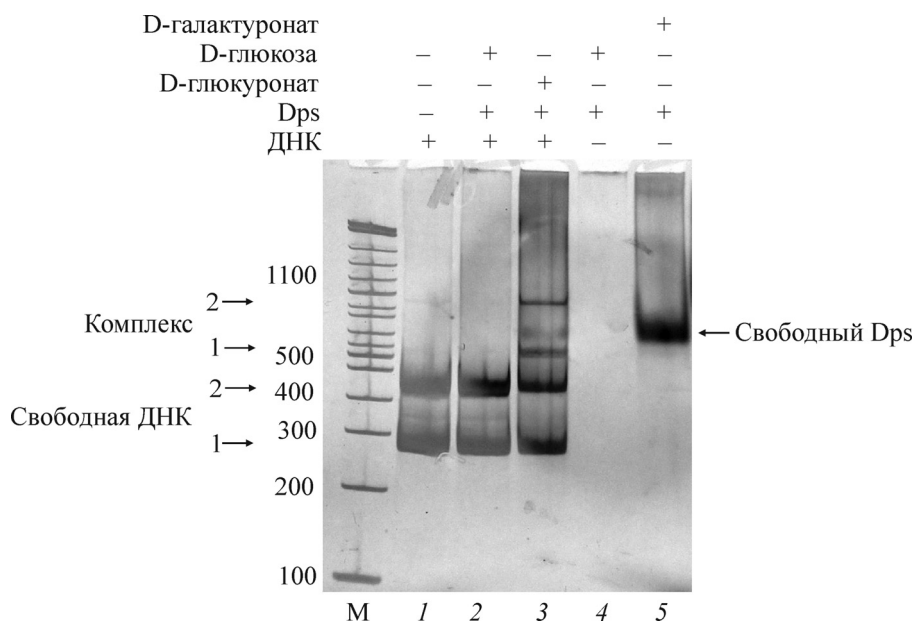


Рис. 2. Зависимость олигомерной формы Dps и эффективности его взаимодействия с модельными фрагментами ДНК от углеводов. Показаны результаты электрофоретического фракционирования макромолекул и их комплексов. Состав проб указан над дорожками. Фрагмент 1 взят из регуляторной области гена *dps*, фрагмент 2 – из промоторной области гена *fliA*. Молярное соотношение Dps к ДНК во всех случаях составляло 4:1. Окраска нитратом серебра.

в гель. Присутствие 5 мМ D-глюкозы ничего не меняло (дорожки 5–7, панель (а)), но добавление D-глюкуроната (дорожки 8–10, панель (а)) не только уменьшило долю свободной ДНК, что свидетельствует об увеличенной эффективности связывания, но и впервые позволило зарегистрировать слабую полосу, по подвижности похожую на бинарный комплекс Dps с линейным фрагментом ДНК. Похожая полоса в присутствии глюкуроната, но не глюкозы, была зарегистрирована и для другого модельного фрагмента (панель (б)). Два использованных углевода, следовательно, не равноценны по их воздействию на Dps.

Прокраска геля нитратом серебра, способная обнаружить место миграции не только ДНК, но и белка (панель (в)), выявила еще одну особенность D-глюкуроната. Оказалось, что он влияет на электрофоретическую подвижность самого белка, который в присутствии глюкозы совсем не входит в гель (дорожка 9), а в присутствии глюкуроната мигрирует с одинаковой скоростью, независимо от того, есть в пробе ДНК (дорожки 5–7) или нет (дорожка 8). Скорее всего, это свидетельствует о влиянии D-глюкуроната на олигомерную форму Dps либо путем предотвращения формирования додекамера в процессе его равновесной ассоциации/диссоциации, либо посредством его участия в разрушении додекамера.

Для того чтобы убедиться в том, что дополнительная полоса, обнаруженная на дорожках 5–7, действительно соответствует ДНК-белковым комплексам, а не каким-то особым олигомерам белка, способным прокрашиваться бромистым этидием, был поставлен аналогичный эксперимент, но в качестве мишеней для связывания Dps использованы два фрагмента ДНК разной длины (таблица), взятых из регуляторных областей генов *fliA* и *dps* (рис. 2). Как и в предыдущем эксперименте, присутствие глюкозы не влияло на олигомерную форму белка и не приводило к появлению дополнительных полос на геле (дорожки 2 и 4). В присутствии глюкуроната, напротив, были зарегистрированы две полосы с подвижностью, соответствующей ожидаемым комплексам. Следовательно, глюкуронат является функционально-активным лигандом Dps, способным влиять на эффективность его связывания с ДНК.

Принципиально разное влияние глюкозы и глюкуроната на олигомерную форму Dps было наименее ожидаемым результатом данной работы. Поэтому влияние на структурное состояние Dps было проверено еще для одного интермедиата пути Эшвелла – D-галактуроната, который является оптическим изомером глюкуроната. Он вызвал аналогичные изменения в белке (рис. 2, дорожка 5). Это означает, что гексуронаты, используемые бактериальной клеткой в качестве альтернативных источников

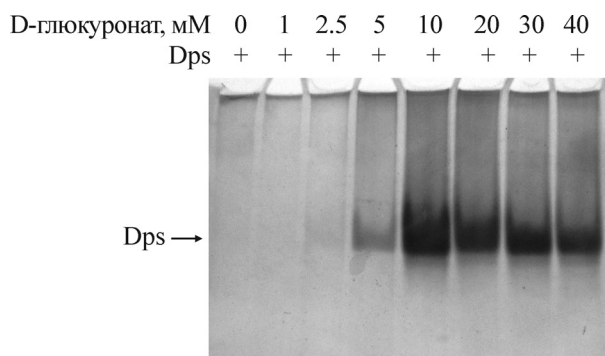


Рис. 3. Зависимость олигомерной формы белка Dps от концентрации D-глюкуроната. Показаны результаты фракционирования белка в 5% полиакриламидном геле без добавления денатурирующих агентов. Молярная концентрация D-глюкуроната в пробах указана над дорожками. Гель окрашен нитратом серебра.

питания, параллельно с этим могут изменять структурное состояние Dps и характер его взаимодействия с ДНК.

В соответствии с этим возникает вопрос о том, может ли наблюдаемая форма белка, которая по подвижности приблизительно соответствует димеру или тримеру, распадаться до мономеров при более высокой концентрации лигандов? Исходно мы снизили рабочую концентрацию лигандов со 100–200 мМ, традиционно используемых для такого типа экспериментов [14,20,21], до 5 мМ с тем, чтобы приблизить их молярное соотношение с белком до величин, сопоставимых с модельными экспериментами (изложены в следующем разделе). Зависимость олигомерной формы Dps от концентрации D-глюкуроната в диапазоне от 1 до 40 мМ была исследована в специальной серии экспериментов, но дальнейшие изменения не были выявлены (рис. 3).

Таким образом, концентрацию сахаров 5–10 мМ можно считать оптимальной для изучения закономерностей комплексообразования Dps с линейными фрагментами ДНК. Следует отметить, что именно такие концентрации были эффективными и при исследовании влияния другого источника питания – аминокислот – на способность транскрипционного фактора DecR связываться с регуляторной областью оперона *yhaOM*, отвечающего за детоксификацию L-цистеина [22].

Чтобы понять, каким образом гексуронаты могут влиять на способность Dps к олигомеризации, был использован метод последовательного молекулярного докинга моделей использованных нами углеводов на трехмерную модель додекамера Dps. Его результаты свиде-

тельствуют о различиях как в расположении наиболее предпочтительных мест связывания гексуронатов по сравнению с глюкозой (рис. 4), так и в динамике изменения свободной энергии в каждом последующем раунде докинга (рис. 5).

Тем не менее для всех трех углеводов наиболее предпочтительным местом связывания первых моделей оказалась поверхность одной из четырех одинаковых пор, открывающихся в полость олигомера и формирующихся на месте стыка трех субъединиц Dps (отмечены стрелками на рис. 4в). В дальнейшем наиболее предпочтительными местами связывания новых молекул лиганда становились участки, преимущественно расположенные внутри белковой полости. Для α -D-глюкозы эта закономерность сохранялась на протяжении всего модельного эксперимента, т.е. последовательного докинга 120 моделей лигандов. Для D-галактуроната и D-глюкуроната, наряду с заполнением внутренней полости белка, наблюдалось встраивание моделей в межсубъединичное пространство белковой структуры (отмечено звездочками на рис. 4б,в). Это отличие от α -D-глюкозы особенно наглядно в случае D-глюкуроната, молекулы которого при добавлении 42–84-го лиганда (наиболее активно в ходе 57–75 раундов докинга) последовательно формировали протяженный кластер на внутренней поверхности межсубъединичного контакта. Подобный эффект на тех же стадиях добавления лигандов наблюдался и для D-галактуроната, хотя и в меньшей степени, а в случае α -D-глюкозы отсутствовал.

Следует отметить, что по мере заполнения наиболее предпочтительных сайтов связывания размещение 70–90-х моделей углеводов сопровождалось постепенным повышением рассчитанных значений ΔG (рис. 5). Однако на поздних раундах последовательного докинга предпочтительной областью связывания новых лигандов становилась поверхность, сформированная ранее присоединенными моделями углеводов, а не поверхность белка. При этом энергия потенциального связывания (ΔG) снижалась (рис. 5). Этот эффект наблюдался для всех трех лигандов, хотя и в разной степени. Позднее и наименее явно это выражено для моделей α -D-глюкозы, раньше всего для D-галактуроната, но наиболее явным является уменьшение ΔG в случае D-глюкуроната. В случае D-галактуроната и D-глюкуроната формировался слой из моделей молекул углеводов вдоль одной из внутренних стенок додекамера, который становился все более предпочтительной мишенью для связывания последующих молекул. Пока-

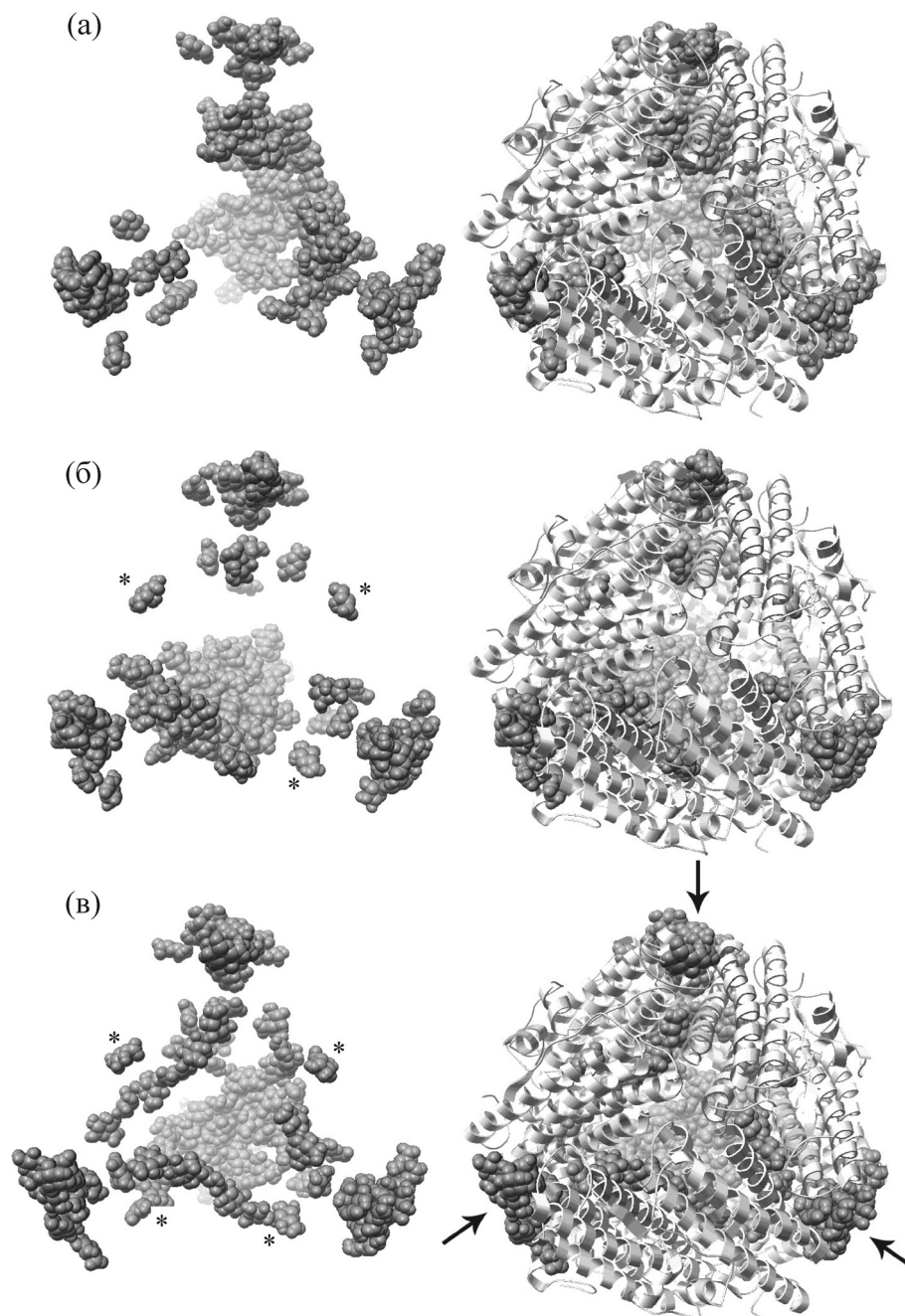


Рис. 4. Результаты последовательного молекулярного докинга α -D-глюкозы (а), D-галактуроната (б), D-глюкуроната (в) с додекамером Dps. Справа приведены белок-углеводные комплексы на последних стадиях последовательного докинга. Отдельные модули в трехмерной структуре Dps показаны ленточными моделями, а атомы лигандов – объемными сферами. Во всех случаях комплекс представлен с одного визуального ракурса относительно белка. Стрелками показаны три из четырех порообразующих вершин, четвертая вершина находится на заднем плане. Слева углеводная часть комплексов показана отдельно. Лиганды, попавшие на стык двух субъединиц, на переднем плане отмечены звездочками. На панели (в) хорошо видны треки углеводных кластеров, формирующиеся на противоположной им внутренней поверхности додекамера.

зательно, что в случае D-галактуроната «затравкой» для формирования этого слоя становились молекулы лигандов, расположенные в области межсубъединичного контакта. Напротив, в случае α -D-глюкозы связывание проис-

ходило на большем пространстве полости белка и аффинность потенциального связывания изменялась при этом меньше.

Так как экспериментально была обнаружена дестабилизация олигомера Dps только в при-

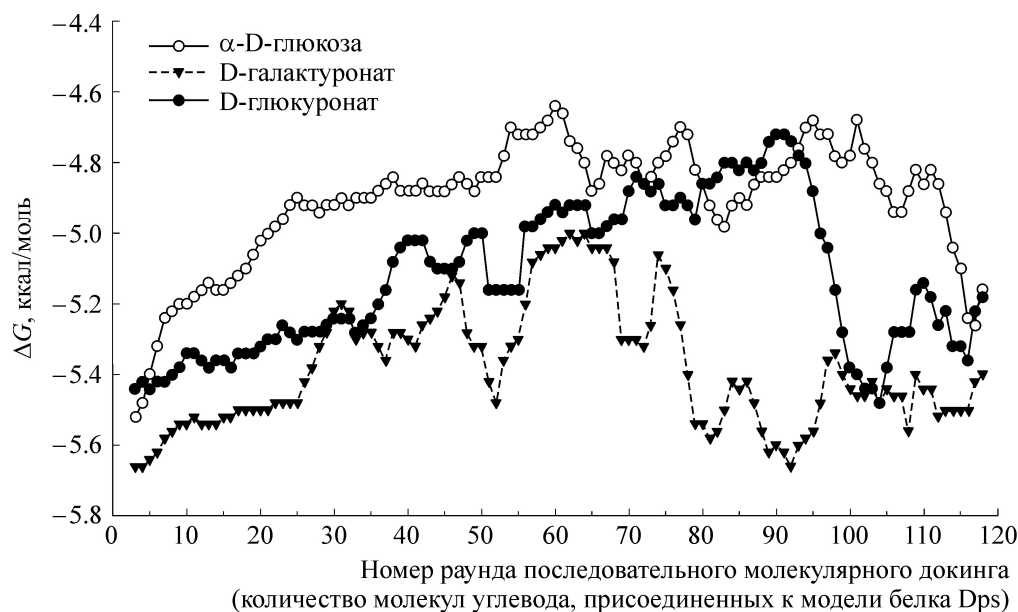


Рис 5. Динамика изменения энергии связывания лигандов при последовательном молекулярном докинге модели α-D-глюкозы (светлые кружки), D-галактуроната (темные кружки) и D-глюкуроната (треугольники) с 3D-моделью додекамера Dps. Используются значения энергии взаимодействия, рассчитанные для моделей молекул углеводов, взаимодействующих с белком (первый раунд докинга) или белок-углеводным комплексом (раунды докинга 2–120) с наибольшей аффинностью.

сутствии D-галактуроната и D-глюкуроната, можно предположить, что связывание этих углеводов в области межсубъединичных контактов Dps дестабилизирует сеть межсубъединичных водородных связей, удерживающих додекамер, и провоцирует его распад на более мелкие олигомерные формы. Дополнительным фактором дестабилизации может оказаться образование кластеров из молекул D-глюкуроната и D-галактуроната на внутренней поверхности белка, примыкающей к потенциальным межсубъединичным местам контакта. Отсутствие таких кластеров и межсубъединичных контактов в случае α-D-глюкозы и меньшая аффинность связывания могут объяснить сохранность олигомерного комплекса в присутствии α-D-глюкозы.

Таким образом, в рамках данной работы нами экспериментально обнаружено взаимодействие D-глюкуроната и D-галактуроната с Dps и доказано влияние этих углеводов (но не D-глюкозы) на олигомерную форму белка. Возможные причины разного влияния углеводов на структуру Dps исследованы методом молекулярного докинга, в результате которого обнаружено встраивание D-глюкуроната и D-галактуроната в область межсубъединичных контактов Dps, что вполне объясняет экспериментально обнаруженную разницу. В работе впервые методом задержки в геле были зарегист-

рированы бинарные комплексы Dps с линейными фрагментами ДНК и установлено, что присутствие D-глюкуроната стимулирует это взаимодействие. Следовательно, углеводы могут играть роль кофакторов Dps, модулирующих его ДНК-связывающую активность, в том числе при конденсации и деконденсации генома.

Основные исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант №14-14-00985, ЮАП, ССА, МНТ, ОНО). Очистка белка была выполнена в рамках проекта Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-34-01062 мол_а, ЕВП).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. Almiryn, A. J. Link, D. Furlong, et al., *Genes & Development* **6**, 2646 (1992).
2. T. A. Azam, A. Iwata, A. Nashimura, et al., *J. Bacteriol.* **181** (20), 6361 (1999).
3. R. A. Grant, D. J. Filman, S. E. Finkel, et al., *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 294 (1998).
4. P. Ceci, S. Cellai, E. Falvo, et al., *Nucl. Acids Res.* **32** (19), 5935 (2004).
5. G. Zhao, P. Ceci, A. Ilari, et al., *J. Biol. Chem.* **277**, 27689 (2002).
6. S. Nair and S. E. Finkel, *J. Bacteriol.* **186** (13), 4192 (2004).
7. S. G. Wolf, D. Frenkiel, T. Arad, et al., *Nature* **400**, 83 (1999).

8. K. C. Jeong, K. F. Hung, D. J. Baumler, et al., *BMC Microbiol.* **8**, 181 (2008).
9. A. Martinez and R. Kolter, *J. Bacteriol.* **179**, 5188 (1997).
10. V. V. Melekhov, U. S. Shvyreva, A. A. Timchenko, et al., *PLoS One* **10** (5), e01265041 (2015).
11. D. Frenkiel-Krispin, S. Levin-Zaidman, E. Shimoni, et al., *EMBO J.* **20**, 1184 (2001).
12. В. О. Покусаева, С. С. Антипов, У. С. Швырева и др., *Сорбц. и хром. процессы* **12** (6), 1011 (2012).
13. Т. Маниатис, Э. Фрич и Дж. Сэмбрук, *Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование* (Мир, М., 1984).
14. C. Bates-Utz, A. B. Nguyen, D. J. Smalley, et al., *J. Bacteriol.* **186**, 7690 (2004)
15. M. N. Tutukina, K. S. Shavkunov, I. S. Masulis, et al., *Mol. Biol.* **44**, 439 (2010).
16. J. Pouyez, A. Mayard, A. M. Vandamme, et al., *Biochimie* **94** (11), 2423 (2012)
17. N. M. O'Boyle, M. Banck, C. A. James, et al., *J. Cheminf.* **3**, 33 (2011)
18. O. Trott and J. A. Olson, *J. Comp. Chem.* **31**, 455–46 (2010)
19. G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, et al., *J. Com. Chem.* **30** (16), 2785 (2009).
20. M. N. Tutukina, A. V. Potapova, P. K. Vlasov, et al., *J. Biomol. Struct. Dyn.* **34** (10), 2296 (2016).
21. M. N. Tutukina, A. V. Potapova, J. A. Cole, et al., *Microbiology* **162** (7) 1220 (2016).
22. T. Shimada, K. Tanaka, and A. Ishihama, *Microbiology*, doi: 10.1099/mic.0.000337 (2016).

Hexuronates Affect Oligomeric Form of a Structural Protein of Bacterial Nucleoid Dps and Its Ability to Bind to Linear DNA Fragments

T.A. Bessonova* **, S.A. Shumeiko*, Yu.A. Purtov*, S.S. Antipov* * **** ***,
E.V. Preobrazhenskaya* ***, M.N. Tutukina* ****, and O.N. Ozoline* ******

**Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin,
ul. Mira 19, Yekaterinburg, 620002 Russia*

****Voronezh State University, Universitskaya pl. 1, Voronezh, 394006, Russia*

*****Pushchino State Institute of Natural Sciences, prosp. Nauki, 3, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia*

******Institute of Chemistry and Biology, Immanuel Kant Baltic Federal University,
Universitetskaya ul. 2, Kaliningrad, 236041, Russia*

Proteins of the Dps family perform a dual function in bacterial cells. As ferritins, they protect cells from destructive effects of Fe²⁺ ions, while interacting with DNA they condense the genome in the absence of nutrients and the ability of Dps to self-aggregate is of a great importance. The way of genome remodelling from the condensed state to the active one is not yet known. Here, the effects of two sugar ligands on interaction between Dps and DNA have been studied *in vitro*. For the first time it was demonstrated that D-glucuronate and D-galacturonate, but not D-glucose, can decompose the dodecameric structure of the protein and D-glucuronate stimulated the formation of binary complexes with the linear DNA fragments. As a result of flexible molecular docking, it was found that the molecules of all three sugars potentially can form clusters inside the protein cavity of Dps, but D-glucuronate and D-galacturonate were also bound in the region of intersubunit contacts of oligomer. The consequent destabilization of the intersubunit bonding network can be the main factor provoking the protein decay to the smaller oligomeric forms. Such a structural rearrangement, leading to a reduction in aggregation, may play a key role in genome decondensation during cell transition to the phase of rapid growth.

Key words: Dps, hexuronates, glucose, nucleoid, DNA-protein complexes, molecular docking