

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ КЛАСТЕРОВ ДНК-DPS ПРИ ИЗМЕНЕНИИ КОНЦЕНТРАЦИИ 4-ГЕКСИЛРЕЗОРЦИНА

Терешкина К.Б.¹, Лойко Н.Г.², Терешкин Э.В.¹, Коваленко В.В.¹, Генералова А.А.¹, Крупянский Ю.Ф.¹

¹ Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 199991, РФ; e-mail: ksenia.tereshkina@chph.ras.ru,

² Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН
просп. 60-летия Октября, 7, корп. 2, г. Москва, 117312, РФ
Поступила в редакцию 20.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0508

Аннотация. Образование комплексов и кристаллов бактериальной нуклеоидной ДНК внутри клеток бактерий в ответ на неблагоприятные внешние воздействия представляет большой интерес как в биофизике и структурной биологии, так и в различных областях промышленности. Основную роль в конденсации и кристаллизации ДНК у бактерий в стрессовых условиях (голодание, температурный, окислительный и другие виды стресса) играют ДНК-связывающие белки DPS. В данной работе методом классической молекулярной динамики в полноатомном приближении исследуется динамическое поведение и структура комплексов белка DPS бактерии *Escherichia coli* в растворе с короткоцепочечной ДНК (25 пар нуклеотидов), при изменении концентрации фенольного липида 4-гексилрезорцина, являющегося химическим аналогом индукторов анабиоза бактерий. Изучается влияние изменения концентрации 4-гексилрезорцина от 0 до 50, 100 и 500 молекул на комплекс ДНК-DPS. Методом поиска линейной энергии взаимодействия получены данные о свободных энергиях связывания ДНК с белком без и в присутствии 4-гексилрезорцина. Показано, что большие концентрации 4-гексилрезорцина способствуют образованию комплексов ДНК с DPS. Для выявления особенностей динамического поведения ДНК и белка был проведён анализ главных компонент. Получены пространственные и энергетические характеристики комплексов.

Ключевые слова: DPS, стабилизация ДНК, 4-гексилрезорцин, *Escherichia coli*, молекулярная динамика.

В настоящее время приобретает всё большую актуальность проблема бактериальной устойчивости к антибиотикам, дезинфектантам, антисептикам и пр. Одним из способов защиты от стресса у бактерий является внутриклеточное связывание и кристаллизация ДНК с ферритиноподобными ДНК-связывающими белками DPS (DNA-binding protein from starved cells). Белки DPS представляют собой шарообразные гомододекамеры с полостью внутри (трететраэдрическая точечная группа симметрии T, 23-й класс по международной классификации). Каждая субъединица белка DPS *Escherichia coli* имеет экспонированный наружу свободный N-конец, богатый остатками лизина, с помощью которого происходит связывание ДНК [1]. При переходе бактериальной колонии в стационарную фазу роста, в 30 раз увеличивается синтез белка DPS и его последующая кристаллизация с образованием со-кристаллов с бактериальной хромосомой.

Также в стационарной фазе роста клеточной колонии резко увеличивается синтез аутоиндукторов анабиоза, производных алкилрезорцинов [2]. Одним из наиболее близким химическим аналогом этого типа соединений является 4-гексилрезорцин [3], воздействие которого на бактериальные клетки имеет концентрационный эффект от увеличения выживаемости клеток до их гибели [4].

Ранее было показано, что резорцины (5-метилрезорцин, 4-гексилрезорцин) способны мигрировать через клеточные мембраны, при этом предпочтительным путём является непосредственно бислой, а не каналы пориновых белков [4]. Внутри клетки эти соединения могут образовывать комплексы с белками [5-7].

Кристаллическая структура DPS *E. coli* была впервые расшифрована в 1998 году методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 1.6 Å [8]. Было показано, что белок DPS формирует шарообразные гомододекамеры с полостью внутри, похожие на ферритин. Расположение субъединиц таково, что белок относится к точечной группе симметрии T (23 по международной классификации).

В работе методами молекулярной динамики проведено моделирование систем DPS-ДНК с разным содержанием 4-гексилрезорцина (4-г.р.). Исследована система, состоящая из додекамера DPS, короткоцепочечной ДНК, молекул 4-г.р. в разной концентрации, ионов и воды (см. табл. 1). Двучепочечная ДНК в В-форме (5'- GTACATATGATGGGGTGATGGATA-3', 25 пар нуклеотидов) в начальный момент времени располагалась у поверхности DPS, чтобы исследовать воздействия 4-г.р. на пресформированные комплексы и проследить формирование комплексов за время расчёта.

Для расчёта динамики использовано полноатомное силовое поле AMBER99-PARMBS1, дополненное параметрами 4-г.р., полученными из квантово-химических расчётов и параметризованными для данного силового поля [4]. Расчёты динамики систем проведены методом классической молекулярной динамики в комплексе программ Gromacs 5.1. Мы использовали разработанный ранее протокол, включающий минимизацию энергии методом наискорейшего спуска и двуступенчатую релаксацию при постоянном объёме и давлении в

Таблица 1. Состав систем при расчётах комплексов DPS с ДНК и 4-гексилрезорцином (включая контрольные системы)

Обозначение системы	Число молекул				Число ионов		
	DPS	ДНК	4-г.р.	Вода, SPC/E	Na ⁺	Cl ⁻	Ca ²⁺
0	1	1	-	143457	480	424	20
50	1	1	50	142858	480	424	20
100	1	1	100	142292	480	424	20
500	1	1	500	137691	480	424	20
ДНК	-	1	-	56242	48	-	-

течение 200 пс, после которых осуществлялся расчёт динамики. Температура 313 К поддерживалась стохастическим (ланжевенским) термостатом с постоянной трения $0,5 \text{ пс}^{-1}$. Давление 1 атм. поддерживалось с помощью баростата Парринелло-Рамана с постоянной времени 2 пс. Электростатические взаимодействия на больших расстояниях рассчитывались методом суммирования по Эвальду (PME). Радиусы обрезания для всех типов взаимодействия брались равными 1,5 нм. Список соседей поддерживался с помощью схемы отсечки Верле и обновлялся каждые 10 фс. Быстрые степени свободы ограничивались с помощью алгоритма LINCS. Шаг интегрирования был выбран 2 фс. Длина траекторий составляла 100 нс и определялась выходом на плато графиков функций расстояний и энергий DPS-ДНК и DPS-4-г.р., то есть соответствовала распределению молекул 4-г.р. внутри расчётной ячейке и формированию комплексов DPS-ДНК в начальной конфигурации.

После получения траекторий, находились пространственные и энергетические характеристики систем. Потенциальная энергия взаимодействия молекул рассчитывалась как сумма электростатического и ван-дер-ваальсового вкладов. На основании расчётов системы ДНК в растворе (нижняя строка в табл. 1) и ДНК в комплексах с DPS при разной концентрации 4-г.р., производился поиск свободной энергии связывания методом линейной энергии взаимодействия:

$$\Delta G_{\text{лин.}} = \beta(\langle U_{DNA-\text{окр.}}^Q \rangle_{\text{белок}} - \langle U_{DNA-\text{окр.}}^Q \rangle_{\text{вода}}) + \alpha(\langle U_{DNA-\text{окр.}}^{LJ} \rangle_{\text{белок}} - \langle U_{DNA-\text{окр.}}^{LJ} \rangle_{\text{вода}}).$$

Здесь $\Delta G_{\text{лин.}}$ – свободная энергия, найденная методом расчёта линейной энергии взаимодействия, индекс DNA-окр. соответствует энергии взаимодействия ДНК с окружением. Верхние индексы Q и LJ обозначают соответствующие члены функции полной потенциальной энергии (потенциалы Кулона и Леннарда-Джонса); $\alpha = 0,18$ и $\beta = 0,33$ – эмпирические постоянные, подбираемые для каждого лиганда отдельно [9]. Нижние индексы «вода» и «белок» соответствуют расчётам ДНК в растворе и в комплексе с белком, соответственно.

Перед нахождением динамических характеристик ДНК и DPS проводился анализ главных компонент [10]. Из общей траектории с помощью утилиты `trjconv` выделялись траектории движения ДНК, каждой из субъединиц белка и отдельно 1-20 и 21-167 аминокислотных остатков каждой из субъединиц. При этом молекула или часть молекулы центрировалась в ячейке, чтобы избежать смещения её части в соседнюю ячейку из-за расчёта при периодических граничных условиях. Далее для уменьшения числа степеней свободы, рассматривались не все атомы белка и ДНК (что затруднено из-за необходимости использования большого объёма оперативной памяти и временных затрат), а С атомы белка и атомы фосфора ДНК. Строилась ковариационная матрица размером $3N \times 3N$, в которой каждый из элементов находился на основании одной из координат (x, y или z) каждого из N рассматриваемых атомов:

$$C_{ij} = \langle M_{ii}^{1/2}(x_i - \langle x_i \rangle) M_{jj}^{1/2}(x_j - \langle x_j \rangle) \rangle.$$

Здесь M_{ii} – единичная матрица; i, j – одна из атомных координат.

Матрица C диагонализировалась с помощью матрицы ортонормированного преобразования R, с выделением собственных векторов и собственных значений:

$$R^T C R = \text{diag}\{\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_{3N}\},$$

где столбцы матрицы R являются собственными векторами; $\lambda_1 \geq \lambda_2 \geq \dots \geq \lambda_{3N}$ – собственные значения. Собственное значение λ_i представляет собой среднеквадратичное колебание главного компонента $p_i(t)$.

Траектории проецировались на собственные векторы с получением главных компонент:

$$\mathbf{p}(t) = R^T M^{1/2}(\mathbf{x}(t) - \langle \mathbf{x} \rangle).$$

На рисунке 1 приведены полученные в результате расчётов структуры кластеров ДНК-DPS. Без добавления 4-г.р. (рис. 1, слева) ДНК удерживается у белка с помощью N-концевых участков (показаны зелёным цветом). При малых концентрациях 4-г.р. (показан фиолетовым), молекулы этого соединения равномерно распределяются

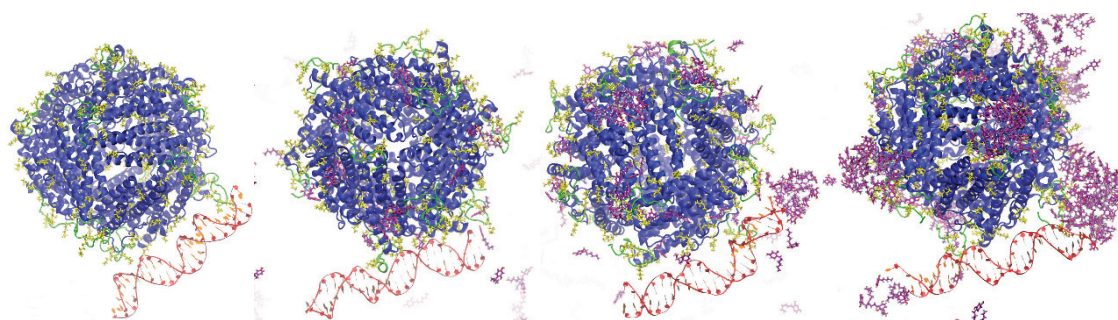


Рисунок 1. Структура комплексов ДНК (25 п.н.) с додекамером DPS *E. coli* без 4-г.р. и при добавлении 50, 100, 500 молекул 4-г.р. (слева направо). Синим показаны молекулы DPS (зелёным выделены подвижные N-концевые участки, жёлтым – остатки лизина); красным – ДНК, фиолетовым – молекулы 4-г.р.

на поверхности белка, связываясь с N-концами и остовом, но практически не затрагивая ДНК. Дальнейшее увеличение концентрации 4-г.р. приводит к образованию мицеллоподобных комплексов 4-г.р., которые адсорбируются на поверхности белка и связывают ДНК.

Для определения участия каждой из субъединиц белка в процессе связывания ДНК были рассчитаны значения потенциальной энергии взаимодействия субъединиц с ДНК и 4-г.р., усреднённые за последние 10 нс траектории. На рисунке 2 показаны графики потенциальной энергии взаимодействия субъединиц (мономеров DPS в составе гомододекамера) с ДНК и 4-г.р. (рис. 2а), а также радиусы гирации субъединиц и их частей (рис. 2б).

На врезке (рис. 2а) находится схема расположения субъединиц с соответствующими порядковыми номерами внутри додекамера DPS. Видно, что без добавления 4-г.р связывание ДНК в разной степени обеспечивается двумя субъединицами (6 и 11 субъединицы на рис. 2а, чёрная кривая). При концентрациях 4-г.р. 50 и 100 ДНК немного смещается относительно додекамера, однако основными центрами связывания также оказываются обе эти субъединицы. Наблюдается обратная корреляция потенциальной энергии связывания и

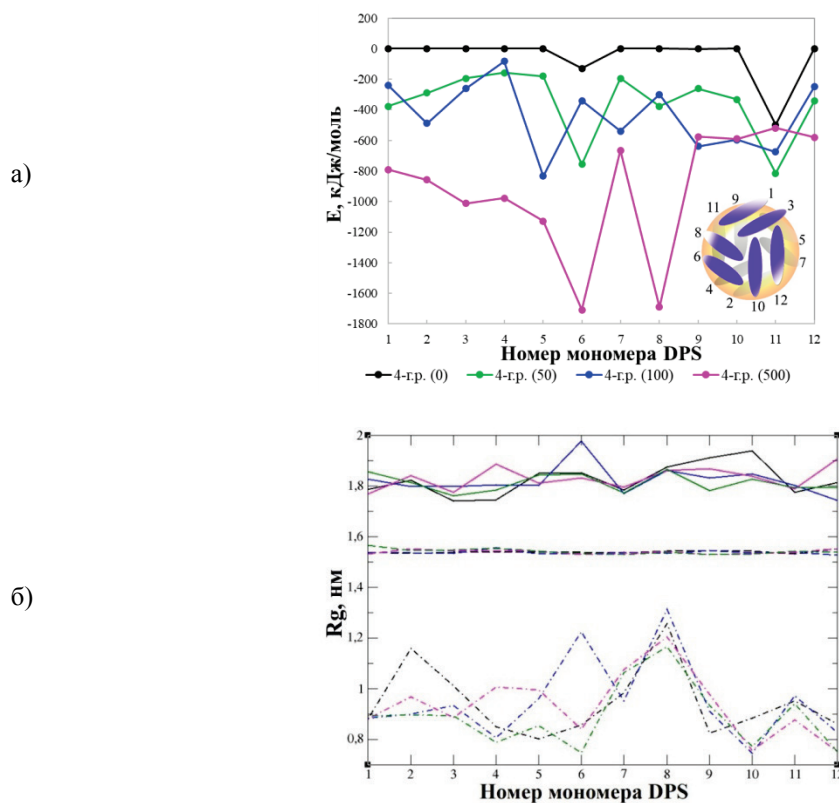


Рисунок 2. а – суммарная потенциальная энергия взаимодействия субъединиц додекамера DPS с ДНК и 4-г.р. На врезке: схематичное изображение гомододекамера DPS, жёлтая окружность соответствует форме молекулы додекамера DPS, синие эллипсы показывают расположение субъединиц, цифрами обозначены порядковые номера субъединиц, используемые на графиках. б – Значения радиусов гирации субъединиц додекамера DPS (сплошные линии), остова (26-167 аминокислотные остатки, штриховые линии) и N-концевых участков (1-25 аминокислотные остатки, штрихпунктирные линии). Приведены усреднённые данные по участку отфильтрованной PCA траектории от 90 до 100 нс для C-атомов. Чёрный цвет соответствует расчёту без 4-г.р., зелёный – добавлено 50 молекул 4-г.р., синий – 100 молекул, фиолетовый – 500 молекул

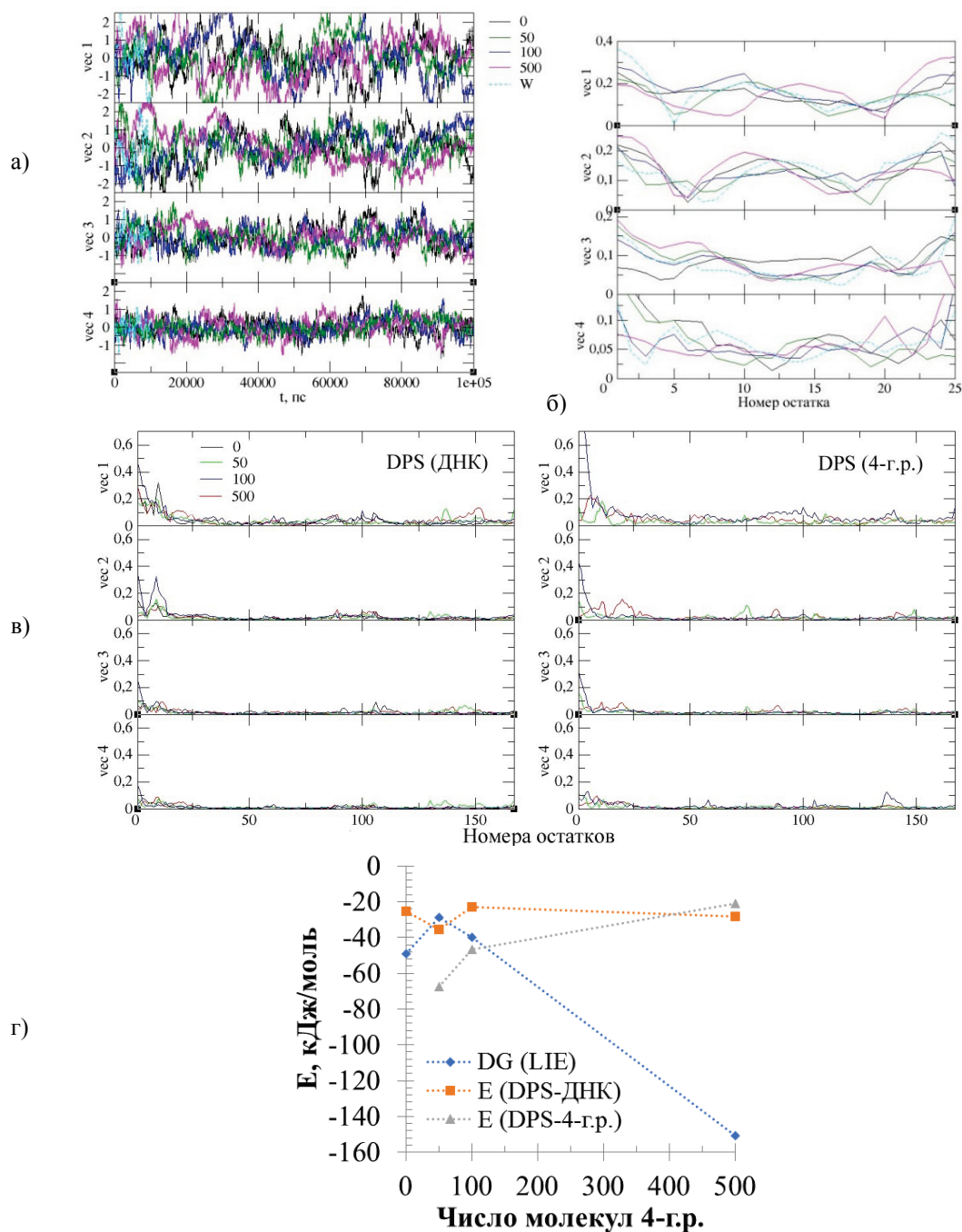


Рисунок 3. а – проекция траекторий движения ДНК на первые четыре собственных вектора (числовые подписи кривых указывают количество молекул 4-г.р. в системе, W – расчёт ДНК в растворе без белка и 4-г.р.); б – среднеквадратичные флуктуации ДНК относительно 1-4 собственных векторов (подписи см. выше); в – среднеквадратичные флуктуации субъединиц DPS относительно 1-4 собственных векторов для субъединиц, связавших ДНК (слева) и с наибольшим количеством адсорбированных молекул 4-г.р. (справа); г – свободная энергия, полученная методом поиска линейной энергии взаимодействия (синие ромбы), потенциальная энергия взаимодействия DPS с ДНК (на одну пару оснований, оранжевые квадраты), потенциальная энергия взаимодействия DPS с 4-г.р. (на одну молекулу 4-г.р., серые треугольники)

радиуса гирации субъединицы. При этом изменение радиуса гирации субъединицы (рис. 26, сплошные линии) обеспечивается колебаниями N-концевых участков (рис. 26, штрихпунктирные линии), в то время как остов молекулы сохраняет свою форму (рис. 26, штриховые линии) вне зависимости от концентрации 4-г.р. Общий радиус гирации остова додекамера DPS остаётся примерно постоянным. Он достигает максимума при малых концентрациях 4-г.р. (50 молекул) за счёт связывания одиночных молекул с поверхностью белка, что увеличивает подвижность N-концов.

Было обнаружено, что за наиболее масштабные коллективные колебания отвечают первые четыре главных компоненты, смещения относительно которых рассматривались при анализе результатов и построении отфильтрованных траекторий движения частей систем. Исследование смещений от времени при проекции

траекторий движения ДНК на собственные вектора (рис. 3а) показывает, что колебания молекулы ДНК не зависят от концентрации 4-г.р. (кривые 0, 50, 100, 500) и практически совпадают с колебаниями свободной ДНК в растворе (кривая W, 0-10000 пс).

Рассмотрение среднеквадратичных флуктуаций остатков молекулы ДНК (рис. 3б) также не показывает существенных различий в динамике ДНК в растворе, у поверхности белка и при добавлении 4-г.р. Наиболее подвижными во всех случаях оказываются концевые и средние участки ДНК. Субъединицы DPS, напротив, испытывают изменение в динамике под влиянием ДНК и 4-г.р. На рисунке 3в (слева) показаны графики среднеквадратичные флуктуации субъединиц для первых четырех собственных векторов. При связывании ДНК подвижность флуктуации остатков снижаются, однако N-концы полностью не теряют своей подвижности. В присутствии 500 молекул 4-г.р., повышается подвижность остова субъединицы в районе Lys148. Связывание 4-г.р. может приводить как к значительному уменьшению флуктуаций N-концевых остатков (кривые 50 и 500), так и существенному возрастанию флуктуаций (кривая 100). При этом заметно, что 4-г.р. оказывает влияние на весь остов молекулы. Флуктуации значительной части остова становятся заметно выше при 100 молекулах 4-г.р. в расчётной ячейке. Потенциальная энергия взаимодействия ДНК-DPS остаётся практически постоянной без 4-г.р. и в его присутствии, однако происходит перераспределение вкладов электростатических и ван-дер-ваальсовых взаимодействий. Это приводит к тому, что свободная энергия связывания ДНК, полученная методом поиска линейной энергии взаимодействия (LIE) изменяется от $\Delta G = -49$ кДж/моль при отсутствии 4-г.р., несколько увеличивается (оставаясь отрицательной) и затем снижается до $\Delta G = -150$ кДж/моль при 500 молекулах (рис. 3г). Потенциальная энергия взаимодействия одной молекулы 4-г.р. с DPS максимальна по модулю при наименьшем содержании 4-г.р. в ячейке. Увеличение количества молекул 4-г.р. с 50 до 100 в 1,5 раза уменьшает (по модулю) потенциальную энергию взаимодействия одной молекулы 4-г.р. с белком. Это свидетельствует о том, что молекулы 4-г.р. предпочтительнее образуют мицеллоподобные структуры, а не равномерно распределяют по поверхности DPS.

Таким образом, 4-г.р. с одной стороны способствует образованию комплексов ДНК-DPS, с другой стороны, его высокие концентрации приводят к образованию сверхстабильных комплексов с ДНК. Это может препятствовать последующему освобождению ДНК от белка DPS, невозможности считывания информации ДНК и приводить к гибели клетки.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России (Тема FFZE-2022-0011, № 122040400089-6 и 122040800164-6). Расчеты проводились на высокопроизводительной вычислительной системе МВС-10П в Межведомственном суперкомпьютерном центре Российской академии наук (МЦ РАН), проект СНРП2.

Список литературы / References:

1. Tereshkin E.V., Tereshkina K.B., Kovalenko V.V., Loiko N.G., Krupyanskiy Y.F. Structure of DPS protein complexes with DNA. *Russian Journal of Physical Chemistry B*, 2019, vol. 13, no. 5, pp. 769-777, doi: 10.1134/s199079311905021x.
2. Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. *Механизмы выживания бактерий*. М.: Медицина, 2005, 367 с. [Bukharin O.V., Gintsburg A.L., Romanova Yu.M., El-Registan G.I. *Survival mechanisms of bacteria*. M.: Medicine, 2005, 367 p. (In Russ.)]
3. Nikolaev Y.A., Tutel'yan A.V., Loiko N.G., et al. The use of 4-Hexylresorcinol as antibiotic adjuvant. *PLoS One*, 2020, vol. 15, no. 9, p. e0239147, doi: 10.1371/journal.pone.0239147.
4. Tereshkin E.V., Loiko N.G., Tereshkina K.B., Krupyanskiy Y.F. Migration of 4-Hexylresorcine Through *Escherichia coli* Cell Membranes. *Russian Journal of Physical Chemistry B*, 2021, vol. 15, no. 6, pp. 1026-1035, doi: 10.1134/S1990793121060099.
5. Терешкин Э.В., Терешкина К.Б., Крупянский Ю.Ф. Миграция орцинола через модельные мембраны *Escherichia coli*. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2020, т. 5, № 4, с. 619-622. [Tereshkin E.V., Tereshkina K.B., Krupyansky Yu.F. Migration of orcinol through model membranes of *Escherichia coli*. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2020, vol. 5, no. 4, pp. 619-622. (In Russ.)]
6. Лойко Н.Г., Мулюкин А.Л., Козлова А.Н., Каплун А.П., Сорокин В.В., Борзенков И.А., Николаев Ю.А., Капрельянц А.С., Эль-Регистан Г.И. Влияние гексилрезорцина, химического аналога микробных аутоиндукторов анабиоза, на стабильность мембранных структур. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2009, т. 45, № 2, с. 181-187. [Loiko N.G., Mulyukin A.L., Kozlova A.N., Kaplun A.P., Sorokin V.V., Borzenkov I.A., Nikolaev Yu.A., Kaprelyants A.S., El-Registan G.I. Influence of hexylresorcin, a chemical analogue of microbial auto-inducers of suspended animation, on the stability of membrane structures. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2009, vol. 45, no. 2, pp. 181-187. (In Russ.)]
7. Крупянский Ю.Ф., Нокс П.П., Лойко Н.Г., Абдулнасыров Э.Г., Коротина О.А., Степанов С.А., Захарова Н.И., Николаев Ю.А., Эль-Регистан Г.И., Рубин А.Б. Влияние химических шаперонов на свойства лизоцима и белка реакционного центра бактерий *Rhodobacter sphaeroides*. *Биофизика*, 2011, т. 56, № 1, с. 13-30. [Krupyansky Yu.F., Knox P.P., Loiko N.G., Abdunasyrov E.G., Korotina O.A., Stepanov S.A., Zakharova N.I., Nikolaev Yu.A., El-Registan G.I., Rubin A.B. Influence of chemical chaperones on the properties of lysozyme and protein of the reaction center of bacteria *Rhodobacter sphaeroides*. *Biophysics*, 2011, vol. 56, no. 1, pp. 13-30. (In Russ.)]

8. Grant R., Filman D., Finkel S. et al. The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA. *Nat Struct Mol Biol*, 1998, vol. 5, pp. 294-303, doi: 10.1038/nsb0498-294.
9. Aqvist J., Marelus J. The linear interaction energy method for predicting ligand binding free energies. *Combinatorial chem. & high throughput screening*, 2001, vol. 4, no. 8, pp. 613-626, doi: 10.2174/1386207013330661.
10. Amadei A., Linssen A.B., Berendsen H.J. Essential dynamics of proteins. *Proteins*, 1993, vol. 17, no. 4, pp. 412-425, doi: 10.1002/prot.340170408.

STRUCTURAL PECULIARITIES OF DNA-DPS CLUSTERS AT DIFFERENT CONCENTRATIONS OF 4-HEXYLRESORCINOL

Tereshkina K.B.¹, Loiko N.G.², Tereshkin E.V.¹, Kovalenko V.V.¹, Generalova A.A.¹, Krupyanskiy Y.F.¹

¹N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics Russian Academy of Sciences
ul. Kosygina, 4, Moscow, 199991, Russia; e-mail: ksenia.tereshkina@chph.ras.ru,

²Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences
60 let Oktjabrja pr-t, 7, bld. 2, Moscow, 117312, Russia

Received 20.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0508

Abstract. The formation of complexes and crystals of bacterial nucleoid DNA inside bacterial cells in response to adverse external influences is of great interest both in biophysics and structural biology, and in various fields of industry. The main role in the condensation and crystallization of DNA in bacteria under stressful conditions (starvation, temperature, oxidative, and other types of stress) is played by DNA-binding proteins DPS. In this work, the dynamic behavior and structure of *Escherichia coli* DPS protein complexes in solution with short-chain DNA (25 base pairs) are studied using classical molecular dynamics in the all-atom approximation with a change in the concentration of the phenolic lipid 4-hexylresorcinol, which is a chemical analog of bacterial anabiosis inducers. The effect of changing the concentration of 4-hexylresorcinol from 0 to 50, 100 and 500 molecules on the DNA-DPS complex is being studied. By searching for the linear interaction energy, data were obtained on the free energies of DNA-protein binding without and in the presence of 4-hexylresorcinol. It has been shown that high concentrations of 4-hexylresorcinol promote the formation of DNA complexes with DPS. To identify the features of the dynamic behavior of DNA and protein, the principal component analysis was carried out. The spatial and energy characteristics of the complexes was obtained.

Key words: DPS, DNA stabilization, 4-hexylresorcinol, *Escherichia coli*, molecular dynamics.