

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный
исследовательский центр Курчатовский институт»

На правах рукописи

Агапова Юлия Константиновна

**HU белок из *Spiroplasma melliferum*: структурная организация,
специфичность ДНК–связывания и низкомолекулярные ингибиторы**

1.5.3 – Молекулярная биология

Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

кандидат химических наук,

Ракитина Татьяна Владимировна

Москва, 2023

Оглавление.

Оглавление

Список сокращений	4
1 Введение.	6
1.1 Актуальность темы работы	6
1.2 Цель работы	7
1.3 Научная новизна	8
1.4 Теоретическая и практическая значимость работы	9
1.5 Основные положения, выносимые на защиту:.....	9
1.6 Личный вклад.....	10
1.7 Объем и структура диссертации	11
1.8 Полнота опубликования в печати и апробация результатов	11
1.8.1 Статьи в рецензируемых журналах:	11
1.8.2 Тезисы докладов	13
2 Литературный обзор	17
2.1 Нуклеоид–ассоциированные белки бактерий.....	17
2.2 Гистоноподобный белок HU.....	22
2.2.1 Общая характеристика HU белка.	23
2.2.2 Пространственная структура HU белка.....	24
2.2.3 Взаимодействие HU белка <i>E. coli</i> с нуклеиновыми кислотами.	26
2.2.4 Механизмы взаимодействия гистоноподобных белков с ДНК.....	27
2.2.5 Внеклеточные функции HU белка и его связь с патогенезом бактерий.....	38
2.2.6 HU белок – потенциальная фармакологическая мишень.....	42
3 Материалы и методы	45
3.1 Материалы.....	45
3.2 Методы.....	50
3.2.1 Клонирование генов HU белков и получение плазмидных конструкций.	50
3.2.2 Приготовление и трансформация химически–компетентных клеток <i>E.coli</i> и трансформация плазмидной ДНК.....	50
3.2.3 Нарботка рекомбинантных белков.....	51
3.2.4 Выделение и очистка рекомбинантных HU белков.	51
3.2.5 Электрофорез белков в денатурирующем полиакриламидном геле.	52
3.2.6 Метод анализа изменения электрофоретической подвижности ДНК.	53
3.2.7 Расчет констант диссоциации ДНК–белковых комплексов.....	53

3.2.8	Определение концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50})	54
3.2.9	Дифференциальная сканирующая калориметрия.	54
3.2.10	Сайт–направленный мутагенез.	55
3.2.11	Изотермическая титрационная калориметрия.	55
4	Результаты и обсуждения.	56
4.1	Биоинформатический анализ аминокислотных последовательностей гистоноподобных белков бактерий.	56
4.2	Получение рекомбинантных HU белков HUEcoli, HUNg, HUMgal, HUSpm и изучение их ДНК–связывающих способностей.	58
4.2.1	Получение белковых препаратов.	58
4.2.2	Сравнительный анализ особенностей ДНК–связывания исследуемых гистоноподобных белков.	60
4.3	Пространственная структура HUSpm, полученная методом рентгеноструктурного анализа.	67
4.3.1	Особенности границы между мономерами в димере HUSpm.	69
4.3.2	Структурные детерминанты термостабильности HUSpm.	75
4.4	Бисфенольные производные флуорена ингибируют ДНК–связывающую способность HU белков и рост микоплазмы в культуре.	78
4.4.1	Поиск низкомолекулярных ингибиторов HU белков.	78
4.4.2	Влияние БФП на ДНК–связывающие свойства HU белков и рост микоплазмы в культуре.	82
4.4.3	Уточнение сайта связывания БФП методом сайт–специфического мутагенеза.	85
	Заключение и выводы.	92
	Список литературы	93

Список сокращений

- БПФ – бисфенольные производные флуорена
- вкДНК – внеклеточная ДНК
- ВПВ – внеклеточные полимерные вещества
- ДМСО – Диметилсульфоксид
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДСК – дифференциально сканирующая калориметрия
- ДСН – додецилсульфат натрия
- дцДНК – двуцепочечная ДНК
- ИТС – изотермической титрационной калориметрии
- кДа – килодальтон
- ЛПС – бактериальные липополисахариды
- МУРР – метод мало углового рассеяния рентгеновских лучей
- НАБ – белок, ассоциированный с нуклеотидами (Nucleoid-Associated Proteins)
- оцДНК – одноцепочечная ДНК
- ПААГ – полиакриламидный гель
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- Трис – трис(гидроксиметил)аминометана
- ТЕМЕД – Тетраметилэтилендиамин
- ЭДТА – натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты
- ЯМР – ядерно-магнитный резонанс
- Dps-DNA – ДНК-связывающие белки из голодных клеток (binding protein from starved cells)
- EGCG – галлат эпигаллокатехина (epigallocatechin-3-gallate)
- EMSA– анализ изменения электрофоретической подвижности (Electrophoretic Mobility Shift Assay)
- FIS – фактор стимуляции инверсии (the Factor for Inversion Stimulation)
- Hbb – HU белок из *Borrelia burgdorferi*
- HEX – гексахлорфлуоресцеин

HU – гистоноподобный белок, впервые полученный из U93 штамма *Escherichia coli*

HUA –HU белок из *Anabaena*

HUbs – HU белок из *Bacillus stearothermophilus*

HUEcoli – HU белок из *Escherichia coli*

HUMgal – HU белок из *Mycoplasma gallisepticum*

HUNg – HU белок из *Neisseria gonorrhoeae*

H–NS – гистоноподобный белок структурирующий нуклеоид (the Histone–like Nucleoid Structuring protein)

HUSpm – HU белок из *Spiroplasma melliferum*

HUtm – HU белок из *Thermotoga maritima*

IHF – фактор интеграции хозяина (Integration host factor)

Lrp – Лейцин–чувствительный регуляторный белок

MtbHU – HU белок из *Mycobacterium tuberculosis*

PCA – метод главных компонент

PCA – рентгеноструктурный анализ

SHU – HU белок из *Staphylococcus aureus*

SMC–белки – белки структурной поддержки хромосом (Structural Maintenance of Chromosomes)

T4SS – функциональная бактериальная система секреции IV типа

TEV–протеаза – высокоспецифичная цистеиновая протеаза вируса гравировки табака

1 Введение.

1.1 Актуальность темы работы

Пространственная организация (архитектура) геномной ДНК имеет большое значение для регуляции всех процессов, связанных с хранением и реализацией генетической информации, не только в ядре эукариотической клетки, но и в гораздо более просто устроенном бактериальном нуклеоиде. За поддержание пространственной структуры нуклеоида отвечают нуклеоид-ассоциированные белки (НАБ). Гистоноподобный белок HU (гистоноподобный белок, впервые полученный из U93 штамма *Escherichia coli*) является наиболее консервативным и наиболее представленным НАБ бактериальной клетки.

Белок HU присутствует абсолютно во всех бактериях, но отсутствует в эукариотической клетке, что позволяет выделить его в качестве потенциальной фармакологической мишенью для разработки антибактериальных препаратов, востребованных в медицине и ветеринарии. В 2014 было показано, что низкомолекулярные ингибиторы, полученные методом молекулярного докинга на основании пространственной структуры HU белка из *Mycobacterium tuberculosis* (MtbHU), способны нарушать структуру нуклеоида и тормозить рост бактерии.

В большинстве бактерий отсутствие HU белка хотя и вызывает нарушение адаптационных способностей и патогенности, но зачастую компенсируется другими НАБ. В то же время, для самых простых представителей бактериального царства (*Mollicutes*) отсутствие HU белка становится летальным, так как он является единственным представителем НАБ в минимальной клетке. Предположительно, HU белок способен функционально замещать компоненты системы репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (MMR–mismatch repair), отсутствующие у многих представителей класса *Mollicutes*.

Микоплазмы, паразитические бактерии, характерными особенностями

которых является отсутствие клеточной стенки, редуцированный геном и ограниченные биосинтетические возможности, вызывают инфекционные заболевания человека и животных, плохо поддающиеся стандартной антибиотикотерапии. Кроме того, микоплазменные инфекции клеточных культур создают серьёзные проблемы для биотехнологических производств и научных исследований, использующих клеточные технологии.

Отсутствие пространственных структур HU белков микоплазменного происхождения, являлось препятствием для поиска их низкомолекулярных ингибиторов, обладающих антимиоплазменной активностью.

1.2 Цель работы

Целью работы было изучение природного разнообразия HU белков, сравнительный анализ ДНК связывающей способности HU белков микоплазменного и не микоплазменного происхождения, а также структурный анализ и поиск низкомолекулярных ингибиторов микоплазменного HU белка из *Spiroplasma melliferum*.

Для достижения цели были поставлены и решены следующие **задачи**:

Биоинформатический анализ близкородственных гистоноподобных белков бактерий (HU и IHF). Отбор модельных HU белков для функциональных исследований.

Получение и функциональная характеристика HU белков бактерий *Neisseria gonorrhoeae* (HUNg), *Spiroplasma melliferum* (HUSpm), *Mycoplasma gallisepticum* (HUMgal) и *Escherichia coli* (HUEcoli). Сравнительный анализ ДНК связывающей способности модельных HU белков.

Сравнительный анализ кристаллической структуры HUSpm. Поиск структурных детерминант его высокой термостабильности.

Поиск низкомолекулярных ингибиторов HUSpm методом молекулярного докинга. Изучение влияния бисфенольных производных флуорена (БПФ) на ДНК–связывающие свойства модельных HU белков (HUSpm, HUMGal и HUEcoli) и на рост микоплазмы в культуре.

Уточнение сайта связывания ингибиторов методом сайт-специфического мутагенеза.

1.3 Научная новизна

Биоинформатический анализ нескольких тысяч гистоноподобных белков (HU и IHF) выявил неправомерность разделения HU белков на α и β типы, на основании их сходства с α и β субъединицами HUEcoli.

Сравнение ДНК-связывающих свойств новых (полученных и охарактеризованных в данной работе) представителей HU с наиболее изученным (эталонным) белком HUEcoli, показало, что каждый белок HU имеет индивидуальный профиль сродства к различным ДНК-структурам, при этом повышенная специфичность к наиболее сложным структурам характерна для всех модельных белков.

Сравнительный анализ пространственной структуры HUSpm, дополненный исследованиями термостабильности белка дикого типа и мутантных форм показал, что аминокислотные остатки, ответственные за высокую термостабильность HUSpm отличаются от тех, о которых сообщалось в работах по исследованию термостабильности HU белков термофильных бактерий *Bacillus stearothermophilus* (HUbs), *Thermotoga maritima* (HUtm) и *Thermus thermophilus*.

Методом виртуального скрининга были обнаружены новые ингибиторы HU белков, относящиеся к бисфенольным производным флуорена, которые блокировали ДНК-связывающую способность HUSpm, HUMgal и HUEcoli со значениями IC_{50} в диапазоне от 5 до 10 мкм, а также подавляли рост микоплазмы в культуре.

Сайт направленный мутагенез HUSpm в совокупности с результатами, полученными параллельно с помощью гетероядерной спектроскопии ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) высокого разрешения и молекулярно-динамической симуляции, показал, что ингибирующее действие БПФ связано не с конкуренцией с ДНК, а с их способностью препятствовать образованию

высоко-аффинного ДНК-белкового комплекса.

1.4 Теоретическая и практическая значимость работы

Были расширены знания о семействе белков HU в целом и в частности о HU белках микоплазм.

Пространственная структура HUSpm, полученная с высоким разрешением, была использована для изучения структурных детерминант, определяющих высокую термостабильность белка, а также для поиска низкомолекулярных ингибиторов методом молекулярного докинга.

Были получены и охарактеризованы низкомолекулярные ингибиторы ДНК-связывающей способности HU белков, способные ингибировать рост микоплазмы в культуре, которые могут стать прототипами новых антибактериальных препаратов.

Было установлено, что в связывании БПФ и коротких модельных ДНК ключевую роль играют разные области HUSpm, что указывало на аллостерический механизм ингибирования, который ранее обсуждался в научной литературе, но не имел экспериментального подтверждения.

1.5 Основные положения, выносимые на защиту:

- На основании аминокислотной последовательности каждый представитель гистоноподобных белков HU/HNF (InterPro ID IPR000119) может быть однозначно отнесен к одной из трех групп: HU, HNF_A или HNF_B.
- Сравнение ДНК-связывающих свойств четырех представителей HU белков, показало, что каждый HU белок имеет свой индивидуальный профиль аффинности к различным ДНК-структурам, увеличение аффинности коррелирует с увеличением сложности и размера ДНК-структуры.
- Граница между мономерами в димере HUSpm обладает следующими особенностями по сравнению с другими структурно-изученными HU-белками: (1) увеличенное количество водородных связей и энергии гидрофобных контактов при полном отсутствие солевых мостиков между мономерами в димере; (2) участие остатков неконсервативной α -спирали и

неконсервативных остатков Phe в формировании дополнительного ароматического кластера в гидрофобном ядре димерного интерфейса.

- К детерминантам, ответственным за высокую термостабильность HUSpm, относятся неконсервативные остатки Phe14 и Phe29, полуконсервативный Phe31 и остаток Lys35, формирующий водородную связь с Gly48 из последовательности сигнала димеризации соседнего мономера.
- Бисфенольные производные флуорена (БПФ) способны ингибировать ДНК-связывающую активность HU белков с IC₅₀ в диапазоне 5-10 мкМ, а также подавлять рост микоплазмы в культуре.
- Замены положительно-заряженных остатков в центральной части ДНК-связывающего домена заметно влияют на ДНК-связывающую способность HUSpm, но не на связывание ингибитора с HU белком.

1.6 Личный вклад

Агапова Ю.К. принимала активное участие в планировании и постановке экспериментов, разработке методик, а также в обработке и анализе результатов.

Автором был проведён биоинформатический анализ, а также клонирование генов и получение (выделение и очистка) четырех рекомбинантных HU белков. Сравнение ДНК-связывающих свойств полученных HU было проведено с использованием метода изменения электрофоретической подвижности ДНК в геле.

Был проведён анализ пространственной структуры HUSpm и выявлены аминокислотные остатки, ответственные за высокую термостабильность HU белка. Были получены и охарактеризованы с использованием метода дифференциальной сканирующей калориметрии мутантные формы HUSpm.

Автором была проведена проверка способности бисфенольных производных флуорена ингибировать ДНК-связывающие свойства HU белков из *S. melliferum*, *M. gallisepticum* и *E. coli* и подавлять рост микоплазмы в культуре. Были получены мутантные формы HUSpm и проверена их

способность связывать модельные ДНК и БПФ. позволившие уточнить механизм действия ингибиторов.

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов определяется надёжностью применявшихся методов исследования, повторяемостью значений измеряемых параметров в многочисленных экспериментах. Полученные в работе результаты подтверждаются современными исследованиями в данной тематике.

1.7 Объем и структура диссертации

Работа написана на 109 страницах машинописного текста и включает 28 рисунка и 16 таблиц; содержит введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, обсуждение результатов, выводы, список использованной литературы. Библиографический указатель содержит 163 источников.

1.8 Полнота опубликования в печати и апробация результатов

Содержание работы отражено в 28 публикациях, в том числе в 9 статьях, опубликованных в рецензируемых научных журналах (WoS, Scopus, РИНЦ), и в 18 тезисах конференций. Был получен 1 патент.

1.8.1 Статьи в рецензируемых журналах:

1. **Agapova Yu. K.**, Altukhov D., Timofeev V., Stroylov V., Mityanov V., Korzhenevskiy D., Vlaskina A., Smirnova E., Bocharov E., Rakitina T. (2020). Structure-based inhibitors targeting the alpha-helical domain of the *Spiroplasma melliferum* histone-like HU protein. Scientific Reports. 15, 15128 - Scopus, WoS, Q1
2. Kamashev D.N., **Agapova Y.K.**, Rastorguev S.A., Talyzina A.A., Boyko K.M., Korzhenevskiy D.A., Vlaskina A., Vasilov R., Timofeev V.I., Rakitina T.V. (2017). Comparison of histone-like HU protein DNA-binding properties and HU/IHF protein sequence alignment. PLoS One., 12, e0188037. - Scopus, WoS, Q1

3. Boyko K.M., Rakitina T.V., Korzhenevskiy D.A., Vlaskina A.V., **Agapova Y.K.**, Kamashev D.E., Kleymenov S.Y., Popov V.O. (2016). Structural basis of the high thermal stability of the histone-like HU protein from the *mollicute Spiroplasma melliferum* KC3. *Sci. Rep.*, 6, 36366. - Scopus, WoS, Q1
4. **Агапова Ю.К.**, Талызина А.А., Алтухов Д.А., Лаврентьев А.Л., Тимофеев В.И., Ракитина Т.В. (2019) Виртуальный скрининг, мишенью которого были сигналы димеризации двух микоплазменных HU-белков, выявил разные типы ингибиторов, взаимодействующих с общими детерминантами связывания, *Кристаллография*, 64, 577-582 - Scopus, WoS, Q3
5. **Агапова Ю.К.**, Алтухов Д. А., Камашев Д. Э., Тимофеев В. И., Смирнова Е. В., Ракитина Т. В., (2020). Ингибитор, нацеленный на границу между мономерами белка HU из *Spiroplasma melliferum*, нарушает конформационную динамику и ДНК-связывающие свойства белка. *Кристаллография*. 2020, 65, 900-906- Scopus, WoS, Q3
6. **Агапова Ю.К.**, Петренко Д.Е., Тимофеев В.И., Ракитина Т.В. (2022). Сравнительный анализ границы между мономерами в димере бактериальных гистоноподобных белков HU методом ММ, *Кристаллография*, 67, 918–925 - Scopus, WoS, Q3
7. Талызина А.А., **Агапова Ю.К.**, Подшивалов Д.Д., Тимофеев В.И., Сидоров-Бирюков Д.Д., Ракитина Т.В., (2017). Применение виртуального скрининга и молекулярной динамики для анализа селективности ингибиторов HU белков, направленных на ДНК-распознающий сайт. *Кристаллография*, 62, 917–922 - Scopus, WoS, Q3
8. Юдкина О.В., Корженевский Д.А., Власкина А.В., Зейфман Ю.С., Фатеева Т.В., Митянов В.С., Стройлов В.С., **Агапова Ю.К.**, Ракитина Т.В. (2018) Бисфенольные производные флуорена, обладающие антимикоплазменной активностью, и способ их получения. Патент РФ RU 2657731С1.
9. Камашев Д.Э., Ракитина Т.В., Матюшкина Д.С., Евсютина Д.В., Ванюшкина А. А., **Агапова Ю.К.**, Анисимова В.Е., Дробышев А.Л., Бутенко И.О., Побегуц О.В., Фисунов Г. Ю. (2019). Изменение протеомного профиля *e. coli*

при удалении генов, кодирующих гистоноподобный белок HU: по данным дифференциального двумерного гель-электрофореза, *Биоорганическая химия*. 45, 524–533 - Scopus, WoS, Q4

10. Комолов А.С., **Агапова Ю.К.**, Тимофеев В.И., Ракитина Т.В. (2021). Влияние нарушения границы между мономерами в димере на структурно-динамические свойства HU-белка из *Spiroplasma melliferum*. Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования, 10, 15623–27. Scopus, WoS, Q3

1.8.2 Тезисы докладов

1. Франк-Каменецкая А.М., **Агапова Ю.К.**, Ракитина Т.В., «Влияние низкомолекулярных ингибиторов HU белков на их ДНК связывающую способность», сборник трудов национальной молодежной научной школы для молодых ученых, аспирантов и студентов старших курсов по современным методам исследований наносистем и материалов "Синхротронные и нейтронные исследования" (СИН-нано-2015), Москва, 6-10 августа 2015 года, стр. 128.
2. **Агапова Ю.К.**, Ракитина Т.В., Франк-Каменецкая А.М., «Изучение структурных основ термостабильности HU белка из микоплазмы *Spiroplasma melliferum*», сборник трудов 13-ой Курчатовской молодежной научной школы, секция «Биомедицинские технологии и ядерная медицина», Москва, 27-30 октября 2015 г, с. 44-45.
3. Франк-Каменецкая А.М., **Агапова Ю.К.**, Ракитина Т.В., «Изучение ДНК связывающей способности HU белков из *Spiroplasma melliferum* и их низкомолекулярных ингибиторов», сборник трудов 13-ой Курчатовской молодежной научной школы, секция «Биомедицинские технологии и ядерная медицина», Москва, 27-30 октября 2015 г, с. 93.
4. **Агапова Ю.К.**, Ракитина Т.В., Франк-Каменецкая А.М. «Необычная термостабильность HU белка из микоплазмы *Spiroplasma melliferum*», сборник трудов 58-ой научной конференции МФТИ, секция «НБИК-технологии», Москва, 23-28 ноября 2015 г.

5. **Ю.К. Агапова**, Д.А. Алтухов, А.В. Власкина, Д.А. Корженевский, А.Ю. Николаева, К.М. Бойко, Э.В. Бочаров, Т. В. Ракитина «Структурные основы термостабильности бактериальных НУ белков», сборник тезисов участников форума Наука будущего наука молодых, секция «Науки о жизни и медицина», Казань, 20—23 сентября 2016 г., с. 20-22.
6. Талызина А.А., Алтухов Д.А., **Агапова Ю.К.**, Власкина А.А., Корженевский Д.А., Ракитина Т.В., Тимофеев В.И., «Повышенная конформационная гибкость НУ белка из *Micoplasma gallisepticum*», сборник трудов 14-ой Курчатовской молодежной научной школы, секция «Биомедицинские технологии и ядерная медицина», Москва, 8-11 ноября 2016 г, с. 102.
7. **Агапова Ю.К.**, Алтухов Д.А., Власкина А.В., Корженевский Д.А., Николаева А.Ю., Бойко К.М., Бочаров Э.В., Ракитина Т.В., «Структурные основы термостабильности бактериальных НУ белков», сборник тезисов Первого кристаллографического конгресса, секция «Кристаллография в биологии и медицине», Москва, 21-26 ноября 2016 г, с. 227.
8. **Агапова Ю.К.**, Д.А. Алтухов, Камашев, Ракитина Т.В., «Сравнительный анализ ДНК-специфичности гистоноподобных белков из протеобактерий и микоплазм», сборник трудов 15-ой Курчатовской молодежной научной школы, секция «Биомедицинские технологии и ядерная медицина», Москва, 14-17 ноября 2017 г, с. 65.
9. **Агапова Ю.К.**, Алтухов Д.А., Тимофеев В.И., Корженевский Д.А., Власкина А.В. Бочаров В.Э., Ракитина Т.В., «Влияние конформационной подвижности на термальную стабильность и ДНК-связывающие свойства двух микоплазменных НУ белков», сборник тезисов Международной научная конференции "XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова" VIII Российский симпозиум "Белки и пептиды" Москва, 18-22 сентября 2017 г., стр.111-112.
10. Korzhenevskiy D.D., Altukhov V., Timofeev V.I., **Agapova Y.K.**, Vlaskina A., Bocharov E., Rakitina T. (2017). Structural basis underlying different stability and

- DNA-binding properties of two mycoplasmal HU-proteins. The FEBS Journal 284, Suppl. 1, 195.
11. **Агапова Y**, Fateeva T, Timofeev V, Rakitina T. (2018). Mycoplasma HU proteins restore growth deficit of E. coli with double genetic knockout of hupA and hupB genes. FEBS OPEN BIO, 8, 167.
 12. **Агапова Ю.К.**, Комолов А.С., Тимофеев В.И., Ракитина Т.В., «Влияние нарушения димерного интерфейса на структурно-динамические свойства HU белка из *Spiroplasma melliferum*», сборник тезисов тринадцатого ежегодного заседания Научного Совета по физике конденсированных сред при отделении физических наук РАН и научно-практического семинара «Актуальные проблемы физики конденсированных сред», 23–26 ноября 2020 г. Черноголовка, стр.102
 13. **Агапова Ю.К.**, Тимофеев В.И., Ракитина Т.В. Исследование прочности интерфейса между мономерами гистоноподобных HU белков метода MM-GBSA с целью создания методологии выявления термостабильных димеров. 64-й Всероссийской научной конференции МФТИ, 21 ноября - 03 декабря 2021 года, Москва-Долгопрудный-Жуковский
 14. **Агапова Ю.К.**, Алтухов Д.А., Тимофеев В.И., Ракитина Т.В. Интерфейс между мономерами в димере гистоноподобного белка HU как мишень для низкомолекулярных ингибиторов. Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» 8-11 февраля 2021 г, Москва.
 15. **Агапова Ю.К.**, Тимофеев В.И., Ракитина Т.В. Исследование термостабильности гистоноподобных HU белков методом MM-GBSA. XXXV Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». 8-11 февраля 2022, Москва.
 16. **Агапова Ю.К.**, Гапонов Ю.А., Алтухов Д., Тимофеев В.И., Штыкова Е.В., Бочаров Е.В, Ракитина Т.В. Структурные исследования гистоноподобного белка из *Spiroplasma melliferum* комплементарными методами структурной

биологии. XXIX Российская конференция по электронной микроскопии. 29-31 августа 2022 года.

17. Volynsky P., Gaponov Y., Altukhov D., Timofeev V., **Agapova Y.**, Vocharov E., Shtykova E., Rakitina T. Small-angle X-ray scattering study of histone-like protein from *Spiroplasma melliferum* in solution. Bioinformatics of genome regulation and structure/systems biology (BGRS/SB-2022), Новосибирск, 04-08 июля 2022 г.
18. **Агапова Ю.К.**, Петренко Д.Е., Тимофеев В.И., Ракитина Т.В. Анализ димерного интерфейса методом ММ-GBSA как способ предсказания термоустойчивости гистоноподобных белков HU. 65-й Всероссийской научной конференции МФТИ, 20-23 сентября 2023 года, Москва-Долгопрудный-Жуковский.

2 Литературный обзор.

2.1 Нуклеоид–ассоциированные белки бактерий.

За хранение и реализацию генетической программы функционирования живой клетки отвечают хромосомы, которые представляет собой комплексы нуклеиновых кислот с белками. В отличие от эукариотических клеток, где хромосомы в компактном виде находятся в ядре, безъядерные клетки прокариот, в том числе бактерий, содержат в цитоплазме только одну макромолекулу ДНК, замкнутую в кольцо и называемую нуклеоид. ДНК бактериальной хромосомы содержит от 1 до 5 миллионов пар оснований (п.о.) и имеет длину порядка 1–2 мм, что требует ее компактной упаковки. Упаковка нуклеоида в компактную структуру происходит за счёт различных внутриклеточных механизмов, включая молекулярный краудинг и суперспирализацию ДНК [1–3]. Реализация данных механизмов происходит при участии архитектурных белков, взаимодействующих с хромосомной ДНК и заставляющих ее складываться в компактную структуру за счёт соединения между собой отдельных частей нуклеоида, изгибания ДНК и накручивания её на белковую основу. Такие белки получили название называют нуклеотид–ассоциированных белков НАБ (Nucleoid–Associated Proteins)[4].

Среди бактериальных НАБ можно выделить семейство небольших (состоящих примерно из 90 аминокислотных остатков), основных белков. Такие белки часто называют гистоноподобными белками по аналогии с гистонами, упаковывающими ДНК у эукариот. Помимо участия в организации и компактизации хроматина, НАБ играют значительную роль в процессах, связанных с функционированием ДНК, например, в рекомбинации, репарации ДНК, репликации и транскрипции [5–8].

Состав НАБ различен у разных бактерий и наиболее хорошо изучен у *E. coli*, в которой НАБ можно разделить на три основные группы [9,10]:

1. Белки, изгибающие ДНК.

2. Белки, служащие мостиком между отдельными участками ДНК, связывая последние.
3. Белки, участвующие в альтернативных механизмах организации и компактизации ДНК.

К первой группе относится гистоноподобный белок структурирующий нуклеоид (Histone-like Nucleoid Structuring protein) или H-NS белок, с молекулярной массой 15,6 кДа. Путем репрессии определенных генов, он участвует в регуляции бактериальной транскрипции. [11,12]. Основными функциональными единицами H-NS являются димеры, которые, в свою очередь, олигомеризуются, формируя сложные структуры и связывая между собой различные участки ДНК, в результате чего происходит компактизация нуклеоида [13]. Характерной особенностью H-NS является наличие двух ДНК-связывающих доменов, которые могут взаимодействовать одновременно с двумя дуплексами ДНК, соединяя их наподобие застёжки-молнии [14]. За связывание с ДНК отвечает С-концевой домен этого белка, а N-конец участвует в олигомеризации [9].

Другим важным представителем этой группы является регуляторный, чувствительный к лейцину белок (Lrp). Этот белок обладает молекулярной массой в 15 кДа и функционально реагирует на изменение концентрации лейцина. Основной функциональной единицей Lrp является октамер, но могут существовать и более крупные олигомеры. Октамер, состоящий из четырех димеров, образуется за счет эквивалентных димер-димерных контактов, опосредованных С-концевыми участками белка. В результате получается «дискообразный» комплекс с несколькими сайтами связывания ДНК на поверхности, где за взаимодействие с ДНК отвечают N-концевые домены Lrp [15]. Такая «дисковидная» структура белкового комплекса, благодаря наличию множества точек возможного взаимодействия, наматывает на себя ДНК как нить на катушку, сближая удаленные друг от друга участки ДНК и тем самым эффективно ее, уплотняя [16]. Присутствие лейцина вызывает

диссоциацию Lrp и, соответственно, влияет на его ДНК–связывающие свойства [17,18].

Поддержание структурной организации бактериальных хромосом обеспечивает также SMC–белок (Structural Maintenance of Chromosomes), который представляет собой большую гомодимерную молекулу [19,20]. SMC–белки являются высококонсервативными во всех организмах от бактерий до человека. По сравнению с другими НАБ бактериальные белки SMC обладают высокой молекулярной массой (выше 150–200 кДа). SMC димер образует V–образную структуру с двумя длинными двуспиральными плечами. Эти антипараллельные двуспиральные структуры являются уникальными и найдены только в SMC–белках. Такое строение SMC позволяет ему взаимодействовать сразу с несколькими регионами ДНК, обеспечивая тем самым очень высокий уровень конденсации хромосомы и, как следствие, позволяет SMC участвовать в сепарации вновь реплицированных хромосом [21].

Важнейшими представителями НАБ 2–ой группы (белки, изгибающие ДНК) являются гистоноподобные белки HU и IHF (Integration Host Factor) [22], которые имеют сходные первичные и пространственные структуры, но отличаются распространённостью в бактериальном царстве и особенностями ДНК–связывания.

HU – это наиболее широко распространённый и высокопредставленный в делящейся клетке бактерий НАБ [23,24]. У большинства бактерий HU является гомодимером, с мономерами массой около 10 кДа, относимыми к α – или β –типу, в зависимости от сходства с α и β субъединицами HU белка *E. coli*, который является гетеродимером HU ($\alpha\beta$), как и все HU из энтеробактерий. Субъединицы гетеродимерных HU гомологичны на 70%.

Пространственные структуры HU исключительно консервативны [23]. В них можно выделить димеризационный домен, представляющий собой стабильное ядро из α –спиралей, переходящих в β –лист, и ДНК–связывающий домен, представляющий собой подвижные β –тяжи (руки), обхватывающие

двойную спираль ДНК, тогда как расположенные на концах «рук» остатки пролина интеркалирует в малую бороздку, что способствует изгибанию ДНК [22]. HU не имеет специфических сайтов связывания на ДНК, но имеет повышенное сродство к ДНК со структурными искажениями, такими как разрывы одной или двух цепей, а также репликативные вилки [7,23]. Профили специфичности к ДНК–структурам у разных HU белков заметно отличаются, другие различия связаны с длиной сайта связывания, углом изгиба ДНК и степенью кооперативности [23,25,26].

ИФ встречается только в энтеробактериях и является гомологом HU (30–40% идентичности) [23]. В отличие от HU, ИФ представляет собой облигатный гетеродимер, субъединицы которого гомологичны примерно на 25%, при этом α -субъединица имеет молекулярную массу около 11 кДа, а β -субъединица порядка 9,5 кДа. Как и HU, ИФ использует интеркаляцию двух консервативных остатков пролина в малую бороздку ДНК на расстоянии 9 п.о. друг от друга, индуцируя или стабилизируя изгиб ДНК [22]. В отличие от HU, ИФ специфически распознает последовательности из 13 п.о. с консенсусом 5'–(A/T)ATCAANNNTT(A/G)–3', где N – это любой нуклеотид [25].

Ко второй группе НАБ относится также семейство FIS (The Factor For Inversion Stimulation). Белки этого семейства представляют собой гомодимеры, в которых каждая субъединица состоит из 98 аминокислот. За связывание с ДНК отвечает С–концевая область белка [27]. *In vitro* в высоких концентрациях FIS связывается с ДНК неспецифически, однако *in vivo* белок выбирает определенные последовательности длиной в 15 п.о.: (G/T)NN(C/T)(A/G)NN(A/T)NN(C/T)(A/G)NN(C/A), где N любой из нуклеотидов [28,29]. Содержание этого белка в клетке достигает максимума в экспоненциальной фазе роста, а в стационарной фазе резко падает [30].

К третьей группе НАБ относится ДНК–связывающий белок из голодных клеток DPS (DNA–binding protein from starved cells). Он обеспечивает самый высокий уровень организации ДНК. Структура, которая при этом образуется, не только компактна, но и защищает дезоксирибонуклеиновую кислоту от

внешнего негативного воздействия, например от действия антибиотиков. [31–34]. Обнаружение кристаллических структур в живых клетках и связь этого феномена с бактериальной резистентностью к лекарственным препаратам вызвало огромный интерес к исследованию, как самого белка, так и его комплекса с ДНК [35–43].

Мономер DPS состоит из 167 аминокислотных остатков, имеет молекулярную массу 18,7 кДа и высоко–консервативную последовательность, состоящую из четырех α –спиралей [44]. В основном DPS представляет собой додекамер с молекулярной массой 224,4 кДа [44], но может также существовать в виде тримера, который, не образует с ДНК кристаллических форм [45]. Предполагается, что додекамер DPS взаимодействует с отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом ДНК за счет электростатических связей богатых лизином N–концевых доменов каждого мономера [24,30,31,46]. Однако, точный механизм, с помощью которого происходит связывание белка с ДНК, неизвестен [45].

Важно отметить, что разнообразие функций, контролируемых НАБ на разных этапах жизненного цикла клетки, приводит к изменению их экспрессии в разные периоды роста клеточной популяции [4,24]. При этом в каждой фазе роста присутствует, по крайней мере, один из белков НАБ, который экспрессируется максимально [9]. В соответствии с данными, приведенными в [24] для 5–ти архитектурных белков *E. coli* H–NS, HU, IHF, Fis и Dps, на ранней экспоненциальной стадии доминирует Fis, на экспоненциальной – HU, в стационарной – IHF и поздней стационарной фазе – Dps. Белок H–NS, присутствует всегда, но никогда не доминирует, и его экспрессия резко уменьшается в стационарной и поздней стационарной фазах. Существенно, что в любой фазе роста, в значительном количестве присутствуют белки, изгибающие ДНК (HU, IHF, Fis) и противодействующие действию мостиковых белков, таких как H–NS. Эти НАБ модулируют петлевую структуру нуклеоида, тем самым обеспечивая транскрипционно активную структуру во время фаз относительно быстрого роста. И только в поздней

стационарной фазе Dps образует кристаллы с ДНК и в результате трансформирует динамический нуклеоид в статическую, транскрипционно неактивную структуру, эффективно защищенную от внешних воздействий [24,47].

2.2 Гистоноподобный белок HU.

В 1975 году из штамма *E. coli* U13 был выделен небольшой положительно-заряженный ДНК-связывающий белок [48]. Сначала его называли фактором U по названию штамма U13. Однако, когда была выявлена способность фактора U изгибать ДНК, придающая ему сходство с эукариотическими гистонами, название трансформировалось в «HU», где H означало гистоноподобный (histone-like) [48,49]. Связывая ДНК, HU белок способствует её стабилизации и защищает от негативных воздействий факторов внешней и внутренней среды клетки, таких как температура, свободные радикалы, воздействие нуклеаз [50,51]. Он способен защищать ДНК от таких внутриклеточных нуклеаз, как экзонуклеаза III [7].

В литературных источниках нередко встречается ошибочная интерпретация названия «HU», как сокращение от «термально нестабильный» (heat unstable) [24]. Когда и почему возникла такая интерпретация уже сложно установить, так как температура плавления HU белков варьирует в широком диапазоне (от 27 до более 90°C) и зависит от источника белка. В этой связи нельзя не отметить, что этот маленький, относительно просто устроенный, широко-представленный и высоко-консервативный бактериальный белок оказался удачной моделью для изучения структурных основ термостабильности. Объектами таких исследований служили HU из белки из мезофильных и термофильных микроорганизмов с известными пространственными структурами, включая белки HUbs и HUtm [52], *E. coli* [53], *B. stearothermophilus* [54], *B. subtilis* [55,56] и *Thermus thermophilus* [56].

2.2.1 Общая характеристика HU белка.

Как уже было сказано, HU белок и его ближайший гомолог IHF являются гистоноподобными белками и относятся к НАБ, способным изгибать ДНК. Соответственно, основная физиологическая функция HU состоит в поддержании суперскрученности и компактизации геномной ДНК прокариотической клетки [1]. HUESolі способен вносить отрицательную суперскрученность в замкнутую кольцевую дцДНК в присутствии топоизомеразы I [30,57]. *In vivo*, когда HU предпочтительно связывает суперскрученную ДНК [58–60], существует связь между количеством HU в клетке и активностью топоизомеразы I [57]. Кроме того, совместно с ферментативным аппаратом бактерии, HU участвуют в процессах репликации [58], рекомбинации [61], репарации [51] транскрипции [62], что опосредованно регулирует адаптацию бактерий и вирулентность бактериальных патогенов [24,57]. Благодаря его плеiotропной роли, когда единственный белок влияет на многочисленные и разнообразные фенотипические признаки, HU белок можно назвать ключевым НАБ.

HU является неспецифическим регулятором транскрипции, контролируя уровень экспрессии 353 генов *E. coli* (8% генома), которые собраны в 229 оперонов [57] и включают гены, связанные с отрицательной индукцией суперспирализации [63], регуляцией выживания и скорости роста бактерий [64–67], уровнем вирулентности [64,65]. А также SOS-ответом [57,68]. Также была выдвинута теория о том, что, регулирующий суперспирализацию, HU белок действует как функциональный изолятор единиц транскрипции [69].

HU белок является одним из наиболее распространенных и консервативных НАБ бактерий [30], который присутствует во всех видах бактериях, геном которых известен [70,71], тогда как репертуар других НАБ варьирует между разными видами бактерий. Наибольшее содержание HU белка было обнаружено во время экспоненциальной фазы роста, когда оно достигает от 30000 до 55000 молекул на клетку в *E. coli* [72]. Удаление гена, кодирующего HU белок, из генома *E. coli* не летально до тех пор, пока другие

гистоноподобные белки, а точнее IHF и H-NS также не удалены [73]. При этом отсутствие HU белка летально для тех организмов, в которых он является единственным НАБ [74]. Кроме того, HU белок играет важную роль в вирулентности многих патогенных бактерий, включая *Mycobacterium tuberculosis* [75], *Francisella tularensis* [64], *Salmonella enterica* [65], *Porphyromonas gingivalis* [66] или *Streptococcus pneumoniae* [67].

2.2.2 Пространственная структура HU белка.

В *Enterobacteriaceae* HU белок существует в виде гетеродимера, что отличает его от многих других, где он представлен в виде гомодимера. Например, в *E.coli* белок HU образует гетеродимер, состоящий из двух субъединиц: HU α и HU β , кодируемых генами *hupA* и *hupB* [76]. Ориентируясь на более высокую степень гомологии с HU α или HU β субъединицами гетеродимерного HUEcoli, гомодимерные HU белки из других бактерий стали разделять на α - или β -типы. Так в *M. tuberculosis* HU белок описан как гомодимер, HU β [75]. В грамположительных бактериях рода *Clostridium*, наоборот, был идентифицирован только ген *hupA* [77]. Анализ, проведённый в рамках моей работы, показал, что такое разделение HU белков не совсем правомерно [78].

Устройство HU димера было детально изучено на основании пространственных структур, полученных двумя основными методами структурной биологии рентгеновской кристаллографией (РСА) и ЯМР спектроскопии. Анализ полученных структур показал, что HU белки имеют исключительно консервативную укладку. Каждый димер состоит из α -спирального димеризационного домена («тело»), устроенного по типу спираль-поворот-спираль (Helix-Turn-Helix) и β -складчатого ДНК-связывающего домена, включающего в себя стабильный седловидный β -лист, который вместе с α -спиралями участвует в формировании димерного интерфейса, и 2 вытянутые, гибкие и частично разупорядоченные β -нити («руки») (рис. 1) [52,79]. Во многих кристаллических структурах HU белков в свободной форме подвижные руки не просматриваются в электронной

плотности, в то же время в комплексе с ДНК позиция рук стабилизирована, за счёт того, что остатки пролина на кончиках петель интеркалируют в малую бороздку ДНК[80–83].

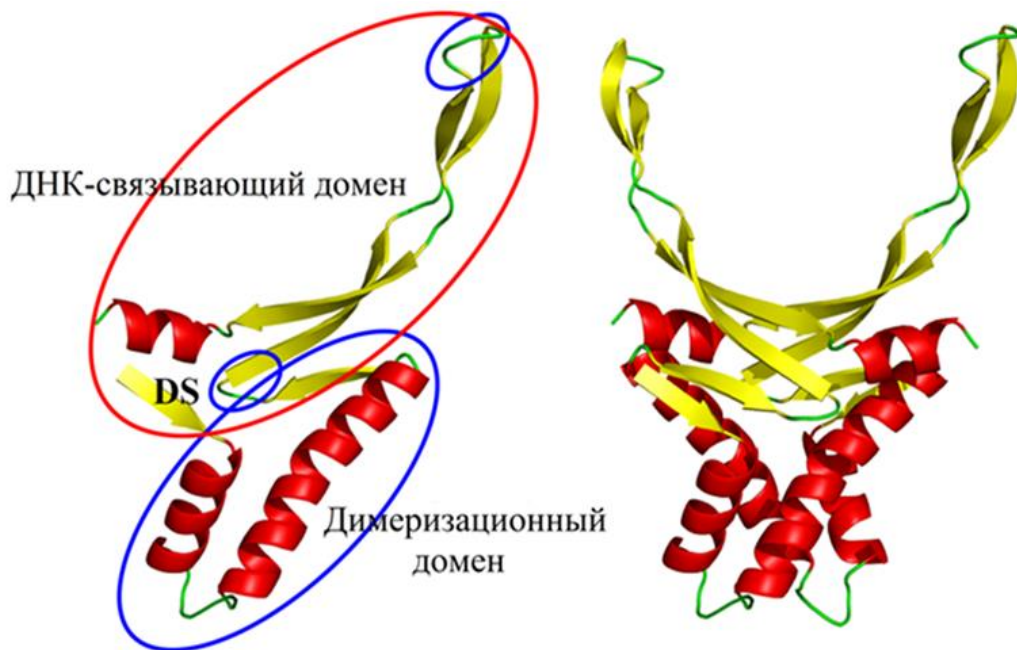


Рисунок 1. Мономер и димер HUS_{prt}. Цветовая схема показывает элементы вторичной структуры: красным – α -спирали, синим – β -слои.

Наиболее консервативными участками HU белков является интеркалирующий кончик β -петли (GRNP) и петля между β -цепями седловидного β -слоя, имеющая консенсусную последовательность GFGXF и названная сигналом димеризации (DS) (рис. 1), т.к. она играет важную роль в формировании и стабилизации HU димера [52]. Остатки фенилаланина из DS двух мономеров формируют центр ароматических стекинг взаимодействий [84].

Известно, что некоторые HU белки помимо консервативной коровой части, состоящей примерно из 90 аминокислот, содержат добавочные N- и C-концевые последовательности разной длины. Например, HU белок из *M. tuberculosis* имеет дополнительный C-концевой домен размером более 100 аминокислот, в результате чего получается белок, состоящий из 214 аминокислот, похожий по размеру на эукариотические гистоны [85]. В недавнем *in vivo* исследовании [86] продемонстрировали, что этот

«эукариотоподобный хвост» необходим для ассоциации HU белка с нуклеоидом. Большинство N– и C–концевых удлинений бактериальных HU белков богаты остатками лизина, также в них могут присутствовать повторяющиеся комбинации аминокислот, например «РАККА» в HU из *M. Tuberculosis* [23].

2.2.3 Взаимодействие HU белка *E. coli* с нуклеиновыми кислотами.

Основным объектом для изучения взаимодействия HU белков с ДНК служил HU белок из *E. coli*, который был способен связывать разные виды нуклеиновых кислот, включая: оцДНК, дцДНК, РНК, ДНК–РНК гибриды [59]. Длина нуклеиновой кислоты, необходимая для связывания димера HU с двухцепочечной ДНК, двухцепочечной РНК, а также с ДНК–РНК гибридами примерно одинакова, на один димер требуется 9–11 пар оснований. Связь HU с правильной дцДНК, РНК и ДНК–РНК гибридами считается неспецифичной, так как она зависит от количества соли в среде [87,88]. Константы диссоциации комплексов HU с суперскрученной дцДНК, релаксированной дцДНК и РНК равны, соответственно 450, 1300 и 2500 нМ [89]. Показано, что HU белок способен связывать оцДНК, длина, которой превосходит 24 нуклеотида [90,91].

Значительно прочнее белок связывается с различными ДНК структурами, такими как структура Холлидея, а также с ДНК, содержащий неспаренные основания и другие дефекты [91]. Известно, что HU специфически связывает многие структуры, образующиеся при репарации ДНК, такие как дцДНК с одноцепочечным разрывом и Y–образные структуры (вилки) [92–94].

Указанные структуры имеют одно общее свойство, а именно, обладают гибким регионом или петлей, между фрагментами ДНК, который является мотивом для прочного связывания HU. HU белок специфически связывается с любой структурой, содержащей такой мотив, например, с ДНК, имеющей неспаренный нуклеотид (мисматч), так как она содержит гибкий регионом

[89]. При этом мисматч содержащий 4–12 пар оснований связывается с HU белком лучше, чем мисматч, содержащий меньше неспаренных оснований, это указывает на то, что высокая гибкость является основным условием прочности связывания.

2.2.4 Механизмы взаимодействие гистоноподобных белков с ДНК.

Основная информация о способах связывания HU белков с ДНК была получена при изучении пространственных структур соответствующих комплексов методом рентгеноструктурного анализа. Такие комплексы были закристаллизованы для ряда HU белков (табл. 1). Как следует из таблицы, на сегодняшний день структуры комплексов с ДНК получены для HU белков из 4-х бактерий, а также для IHF из *E. coli*. Примеры структур данных комплексов представлены на рисунке 2.

Таблица 1. Пространственные структуры комплексов гистоноподобных белков с ДНК, полученные на настоящий момент.

PDB ID структуры, (разрешение)	Бактерия–хозяин (HU или IHF белок) Тип ДНК, длина и другие особенности	Дата депонирования структуры [ссылка] (Панель на рис. 2)
1IHF, 2.50 Å	<i>Escherichia coli</i> (IHF) дцДНК, 35 п.о., содержащая оц точечные разрывы	1996–08–21 [95] (а)
1OWG, 2.10 Å 1OWF, 1.95 Å	<i>Escherichia coli</i> (IHF) дцДНК 35 п.о., содержащая оц точечные разрывы (IHF с мутацией в β–субъединице E44A) дцДНК, 35 п.о. содержащая оц точечные разрывы	2003–03–28 [96] (б)
1OUZ, 2.41 Å	(IHF с мутацией β–E44A)	

	дцДНК, 35 п.о., содержащая оц точечные разрывы и с замеуой T44A	
1P51 (2,50 Å) 1P71 (1,90 Å) 1P78 (2,25 Å)	Anabaena sp. (HUA) дцДНК, 21 п.о., содержащая оц точечные разрывы	2003–04–24 [79] (в)
2HT0, 2.00 Å	<i>Escherichia coli</i> (INF) дцДНК, 22 п.о., содержащая оц точечные разрывы	2006–07–24 [80] (г)
2ПЕ, 2.41 Å 2ПФ, 2.72 Å	<i>Escherichia coli</i> (INF и INF с мутацией K45E) дцДНК, 35 п.о., содержащая оц точечные разрывы	2007–09–28 [97] (д)
2NP2, 3,02 Å	<i>Borrelia burgdorferi</i> (HU) дцДНК, 36 п.о.	2006–10–26 [71] (е)
4QJU, 2,16 Å	<i>Staphylococcus aureus</i> (HU) дцДНК, 21 п.о., содержащая оц точечные разрывы	2014–06–04 [98] (ж)
4YF0, 2,79 Å 4YFH, 3.49 Å	<i>Escherichia coli</i> (EcHUα2) дцДНК, 19 п.о. (видно 11 п.о.) дцДНК, 20 п.о. (видно 11 п.о.)	2015–02–24 [99] (з)

6O6K, 3,60 Å	<i>Escherichia coli</i> (EcHU α 2) дцДНК, 19 п.о. (видно 10 п.о.)	2019-03-06 [100]
6O8Q, 3,22 Å	дцДНК 19п.о.	(и)
6OAJ, 4,09 Å	дцДНК 19 п.о.	

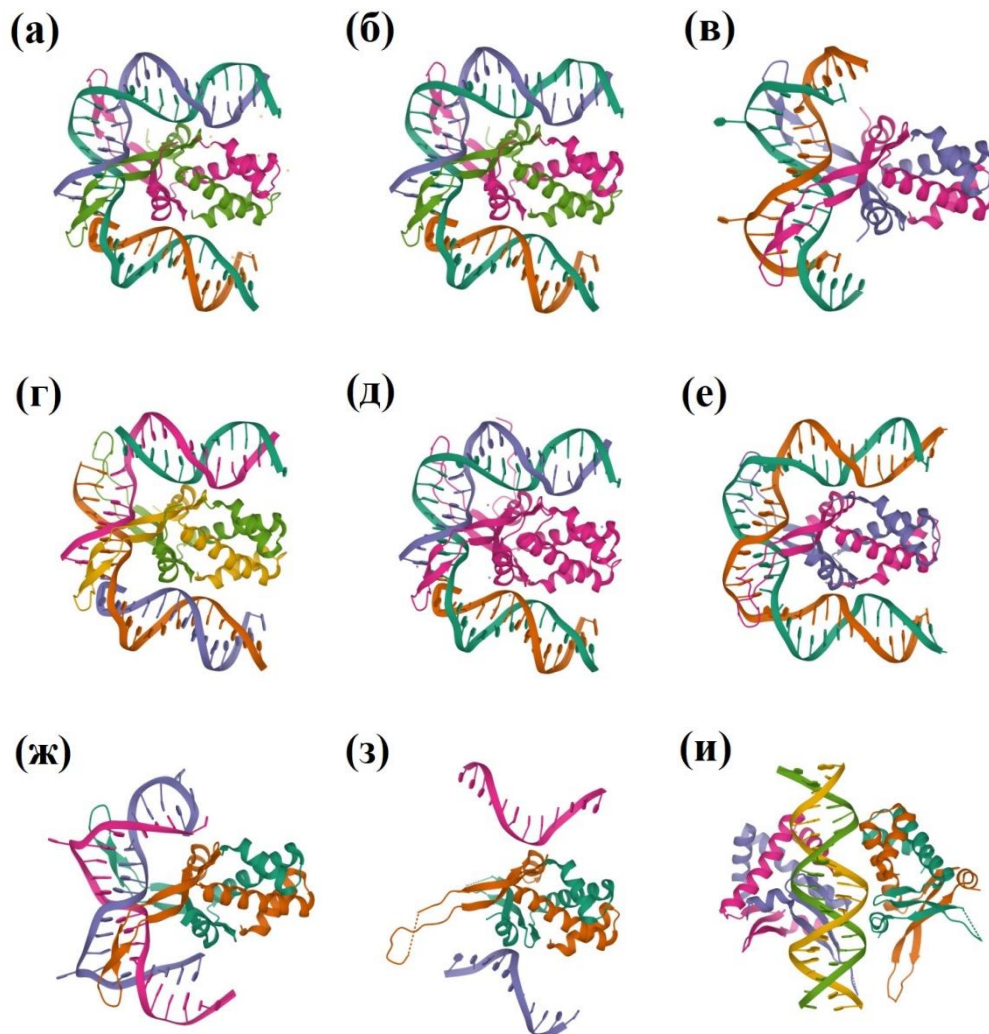


Рисунок 2. Кристаллические структуры комплексов HU и IHF белков с модельными ДНК (смотри таблицу).

На основании анализа вышеперечисленных пространственных структур были предложены 2 разных механизма взаимодействия HU белков с ДНК.

Первоначально были получены и описаны структуры ДНК–белковых комплексов, полученных для белка IHF из *E. coli* с модельными дцДНК, содержащими разрывы в одной цепи (оц–разрывы) [95–97].

Позднее, аналогичные ДНК–белковые комплексы были получены для HU белков из *Anabaena*, *B. burgdorferi*, *S. aureus* [71,79,80,98]. При этом использовались, как дцДНК длиной 21, содержащие оц–разрывы, так и 36 п.о.

Однако, в 2015 году и в последующие годы, были закристаллизованы комплексы абсолютно другого типа [99,100]. Новые комплексы были получены исключительно для HU белка *E.coli* и правильной дцДНК разной длины от 10 до 36 п.о.

Как видно на рисунке 3 и 4, в комплексах первого типа ДНК дуплекс связывается преимущественно с ДНК–связывающим доменом гистоноподобного белка, при этом подвижные участки ДНК-связывающего домена обхватывают двойную цепь ДНК так, что находящиеся на концах петель остатки пролина интеркалируют в малую бороздку ДНК. Сама ДНК при этом изгибается, принимая подковообразную форму (рис.3), которая (в случае достаточной длины ДНК) удерживается благодаря дополнительным контактам с положительно–заряженными остатками α –спирального домена (рис 4).

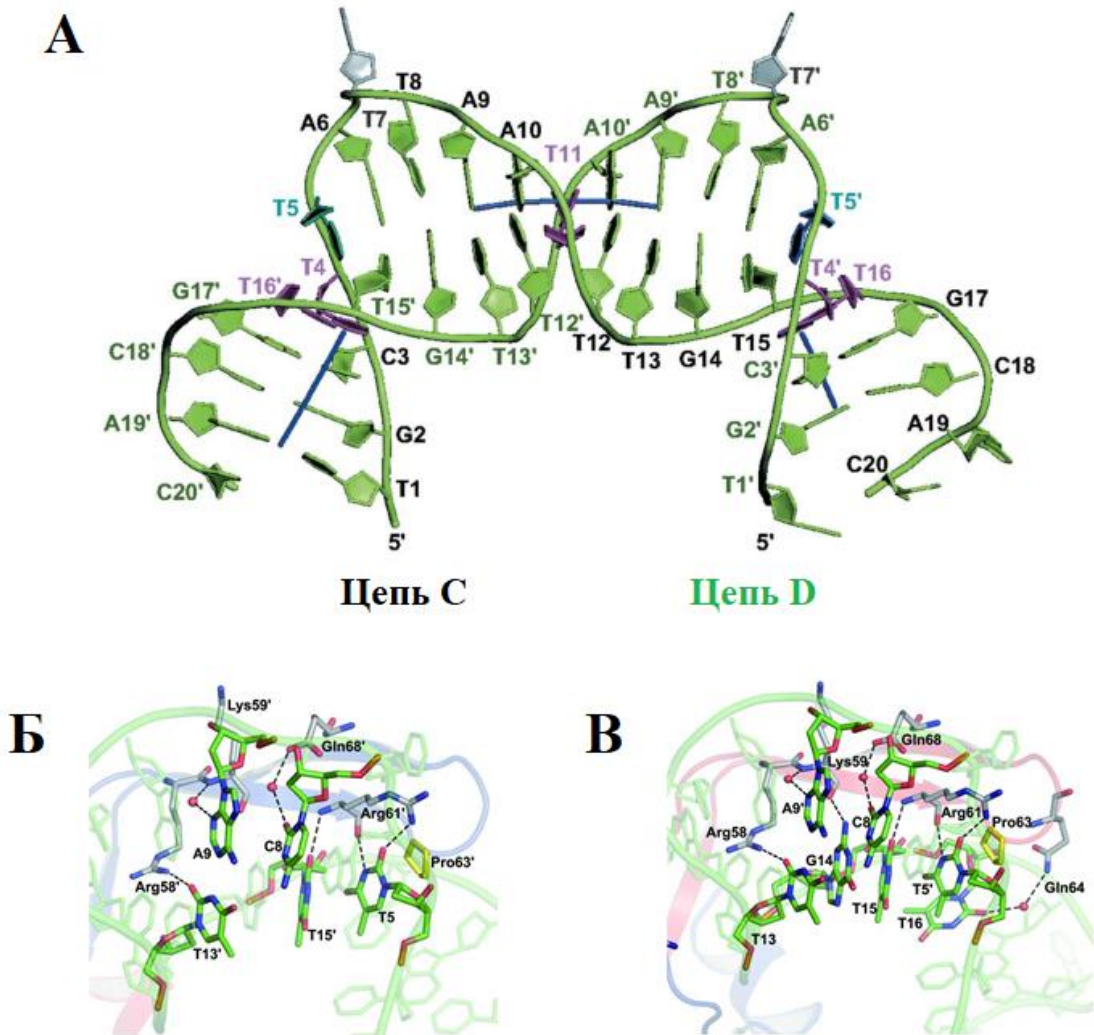


Рисунок 3. Взаимодействие β -ленточных областей ДНК-связывающего домена SHU с ДНК. А. Изображение модельной ДНК в комплексе SHU-ДНК. Нуклеотиды комплементарных цепей ДНК показаны черным и зеленым цветом. Б и В. Полярные контакты в комплексе ДНК-SHU. Аминокислотные остатки и нуклеотиды ДНК, образующие водородные связи, показаны в виде палочек, окрашенных по типу атомов: зелёный – углерод, красный – кислород, синий – азот, желтый – сера.

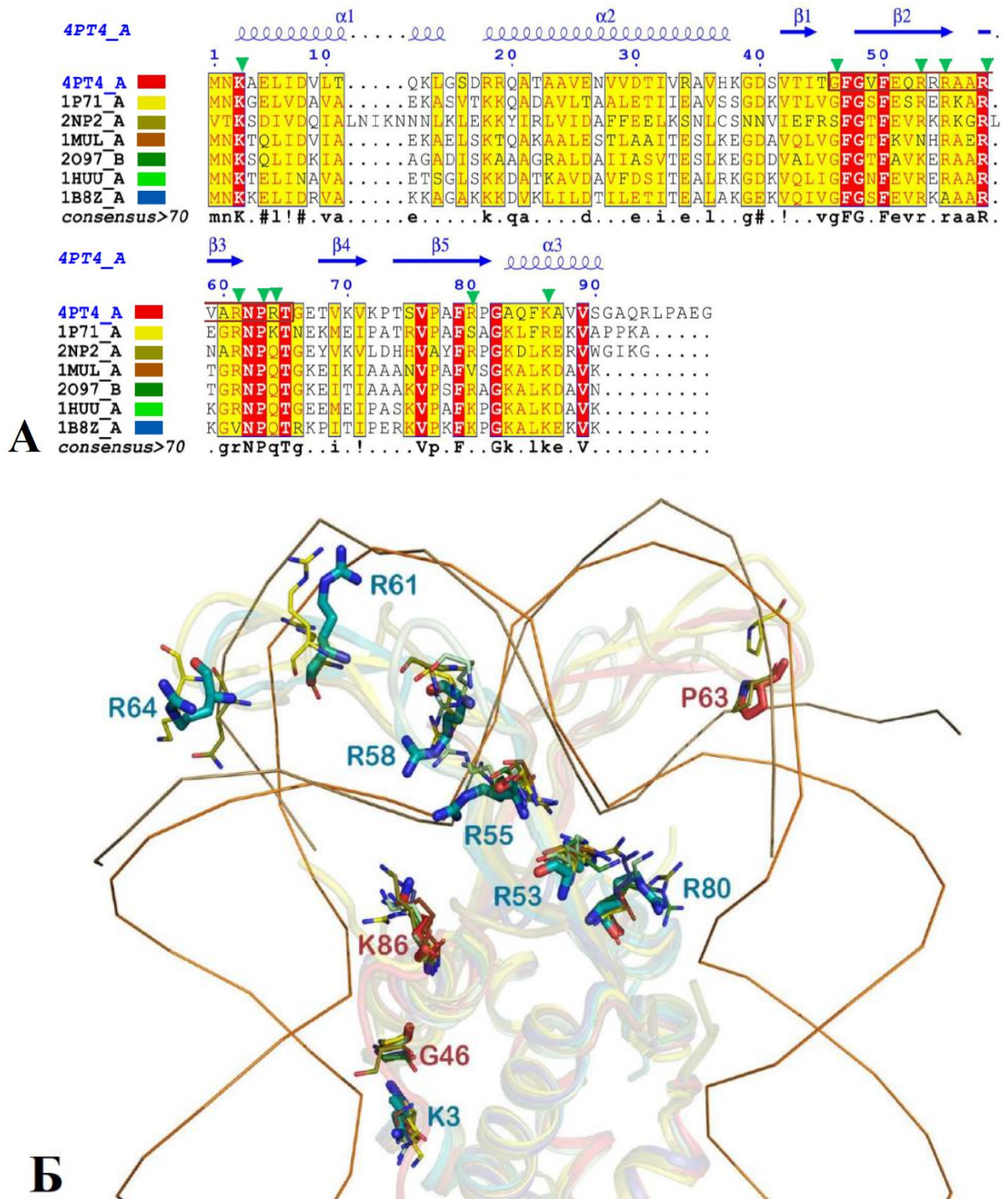


Рисунок 4. Классический способ связывания ДНК НУ белками

А. Выравнивание аминокислотных последовательностей НУ белков: MtbHU (4PT4), НУ из *Anabena* (АНУ, 1P71), НУ белок из *B. Burgdorferi* (Нbb, 2NP2), ЕсНУ α (1MUL), ЕсНУ β (2097_B), НУbs (1HUU) и НУtm (1B8Z). Зелеными стрелочками указаны остатки, которые образуют контакты с ДНК. Б. Наложение пространственных структур вышеописанных НУ белков и/или их комплексов с ДНК. Цвета соответствуют А. Палочками показаны остатки, которые образуют контакты с ДНК дцДНК длиной 20 и 36 пар оснований взяты из структур с PDB ID 1P71 и 2NP2, соответственно.

Сравнительный анализ и подробное описание особенностей классических комплексов первого типа представлены в работе [98], посвящённой структурным исследованиям HU белка из *Staphylococcus aureus* (SHU) в свободном виде и в комплексе с дцДНК длиной 21 п.о. (SHU–ДНК) (смотри рис. 3А и 4). Как видно из рисунков, аминокислотные остатки подвижных β -ленточных рук SHU образуют контакты с ДНК. Модельная дцДНК имеет длину 21 п.о. (рис. 4А) и образует 31 контакт с 16 остатками SHU, расположенными в основном в области β -рук (Рис. 4Б и В). Прямые полярные контакты с основаниями ДНК в малой бороздке образуют остатки Arg53, Arg58, Lys59 и Arg61. Остатки Arg53, Ala56 и Ala57 образует гидрофобные контакты с областью малой бороздки. При этом Arg58 и Arg61, которые играют решающую роль в связывании ДНК, высококонсервативны в гомологичных HU белках из разных бактерий (рис. 4). Изгибанию ДНК способствует наличие неспаренного нуклеотида T5 в каждой комплементарной цепи ДНК (рис. 3). Эти нуклеотиды находятся на расстоянии 9 п.о. друг от друга и вступают в контакт с высококонсервативным мотивом ДНК–белкового взаимодействия (GRNP–петлём), включающим в себя остатки Arg61 и Pro63. Последний остаток интеркалирует в малую бороздку ДНК, образуя контакты с дезоксирибозным кольцом нуклеотида T16.

В структурах комплексов Hbb–ДНК и АНУ–ДНК наблюдаются аналогичные контакты между белком и дцДНК (рис. 4Б) [79,95].

На основании сравнения кристаллических структур HU/ИHF белков в свободном и ДНК–связанном состоянии, а так–же данных ЯМР спектроскопии, было сделано предположение, что в свободном состоянии β -ленточные руки димера HU находятся в состоянии динамического перехода между разными конформациями, тогда как связывание ДНК фиксирует конформацию, способствующую формированию наиболее прочного комплекса (рис. 5).

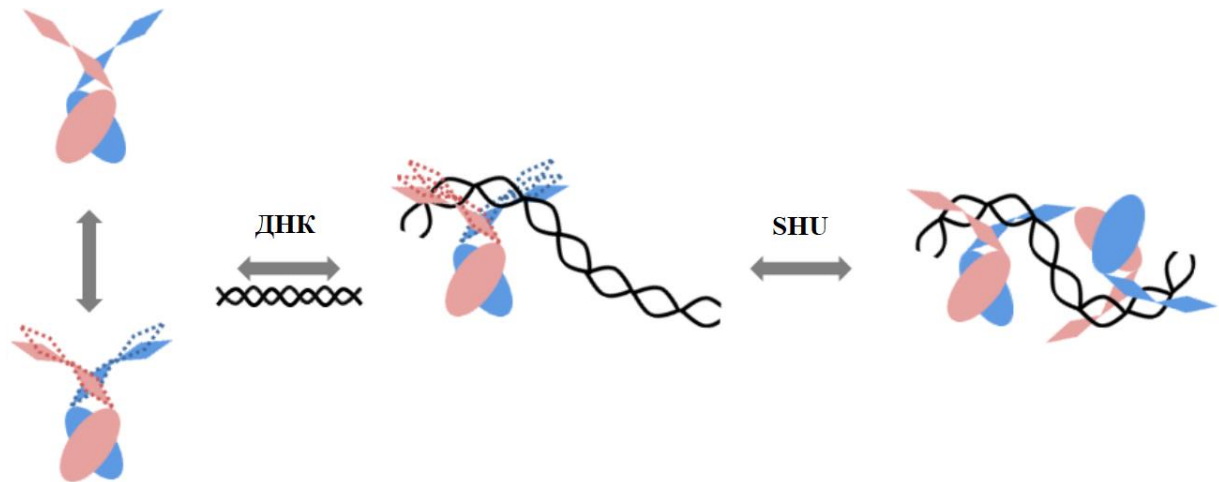


Рисунок 5. Предлагаемый механизм связывания ДНК SHU.

Как было сказано выше, в 2016 году был предложен альтернативный способ формирования комплекса НУ–ДНК [99]. Для получения и кристаллизации ДНК–белковых комплексов в работе использовали белки из *E. coli* НУ $\alpha\alpha$, НУ $\alpha\beta$, а также мутантный вариант НУ α 38 α 38, несущий мутации E38K и V42L. Для подбора оптимальных условий кристаллизации, использовался метод малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (МУРР), которым также было подтверждено, что новый тип ДНК–белкового комплекса, наблюдаемый в кристаллах (рис. 6), действительно существует в растворе.

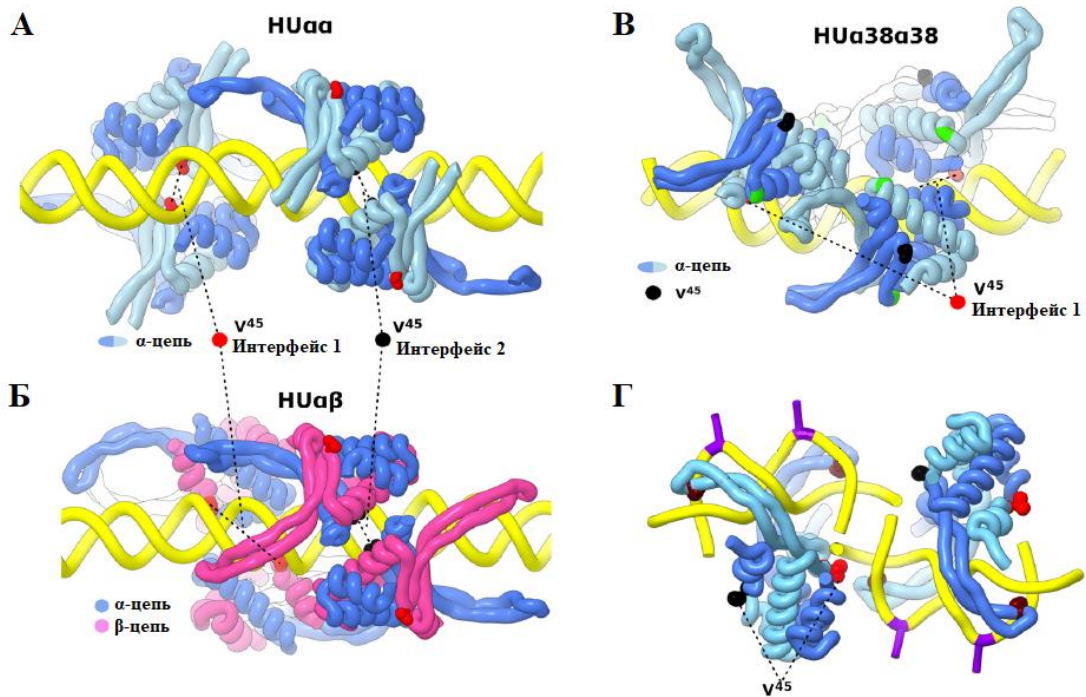


Рисунок 6. Сравнительный анализ двух типов комплексов HU с ДНК. А–В. ДНК–белковые комплексы, наблюдаемые в кристаллических структурах HU $\alpha\alpha$, HU $\alpha\beta$, и HU $\alpha38\alpha38$. В каждом случае четыре димера расположены вдоль практически не изогнутой ДНК. Отмеченный остаток V45 входит в малую бороздку, как показано в интерфейсе 1 и 2. Место мутации E38K в структуре комплекса HU $\alpha38\alpha38$ –ДНК отмечено зеленым. Г. Два димера *Anabaena* HU $\alpha\alpha$, изгибающие ДНК при связывании.

Как видно на рисунке, в структурах комплексов HU $\alpha\alpha$ и HU $\alpha\beta$ с дцДНК длиной 19–20 п.о. наблюдается другой механизм связывания, когда практически линейная ДНК, примыкает к α -спиральному «телу» HU (рис 6, А). Для сравнения рядом показан классический комплекс, в котором изогнутая ДНК расположена между и обхвачена β -«руками» [80]. В новом типе связывания HU димеры связывают ДНК посредством “запирания” остатков фосфорной кислоты между аминокислотными остатками G46 и K83 и интеркаляции остатка V45 в малую бороздку. То, что G46 и G82–K83 играют важную роль в “запирающем” механизме, коррелирует с их высокой консервативностью в HU белках. В отличие от взаимодействия HU с изгибающейся ДНК (рис. 6г), новый тип взаимодействия с ДНК не стабилизирует вытянутые руки, о чём свидетельствует слабая электронная

плотность в данных областях кристалла. В результате, сохраняющаяся функциональная гибкость рук позволяет им принимать участие в дополнительных взаимодействиях с независимыми ДНК, что запускает мультимеризацию HU, которая способствует выпрямлению оси ДНК.

Следует также отметить разницу в связывании ДНК различными HU димерами HU $\alpha\alpha$, HU $\alpha\beta$, а также HU $\alpha 38\alpha 38$. Два димера HU $\alpha\alpha$ располагаются на ДНК в противоположных ориентациях и удерживаются водородными связями (рис. 6). При этом разница в наклоне разных димеров HU $\alpha\alpha$ –HU $\alpha\alpha$, относительно оси ДНК, составляет $\sim 30^\circ$ (рис. 7). Предполагается, что V45, интеркалирует в малую бороздку, выступает в качестве опоры шарнира, который позволяет димеру изменять наклон относительно оси ДНК. В некоторых HU белках остаток V45 заменен на остаток R, который также участвует во взаимодействии с ДНК, что можно наблюдать в структуре комплекса Hbb с дцДНК длиной 36 п.о. и комплексов ДНК–INF [71,95].

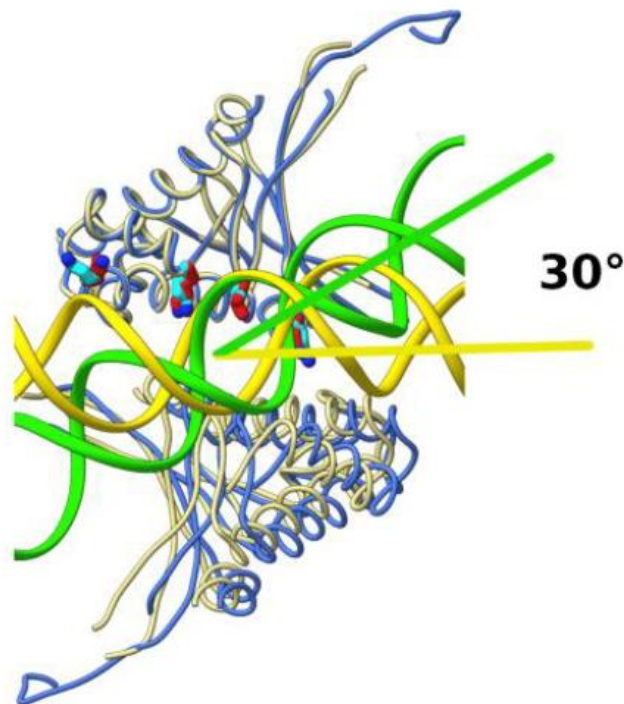


Рисунок 7. Наложение двух комплексов HU $\alpha\alpha$ –ДНК. Видно, что границы межмолекулярного контакта (интерфейсы) отличаются. ДНК и белок окрашены в желтый цвет для интерфейса 1 или зеленый и синий для интерфейса 2. Белковая часть одного

гомодимера NU $\alpha\alpha$ –NU $\alpha\alpha$ была выбрана центром для того, чтобы показать разные углы наклона ДНК относительно оси димера. Цветами выделены боковые цепи лизинов 3, 18, 83 и валина 45 (красный цвет – остатки интерфейса 1 и голубой – интерфейса 2).

В 2021 и 2023 годах те же авторы исследовали роль разных способов связывания ДНК NU белками более подробно [101]. Было высказано предположение что, неспецифическое связывание в основном отвечает за архитектурную роль NU белка в организации хромосом (рис. 8), продемонстрированную недавними исследованиями [102,103]. Предполагается, что режим неспецифического связывания более широко распространен в нуклеоиде и служит для базовой укладки геномной ДНК в нуклеоид. Слабое неспецифическое связывание позволяет быстро реорганизоваться реплицированному геному в процессе его постепенного деления. В это же время структурно–специфическое (классическое) связывание более ограничено и по большей части происходит в определённых участках хромосомы, вовлечённых в данный момент в процессы репликации, транскрипции и репарации (рис. 8) [26,57,104,105].

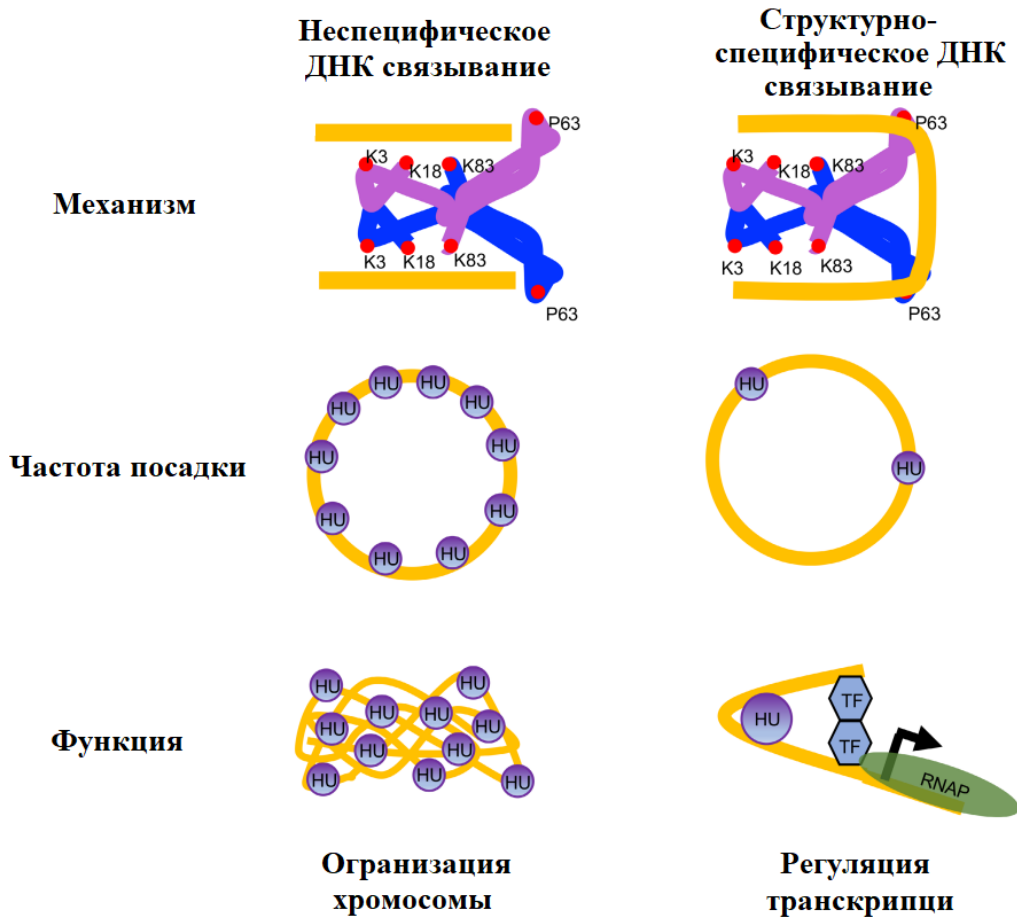


Рисунок 8. Предлагаемая модель биологической значимости неспецифических и структурно–специфических способов связывания ДНК HU белками. Две HU субъединицы обозначены синим и фиолетовым цветом, ДНК–связывающие аминокислотные остатки показаны красными кружками. ДНК изображена желтым цветом. Связанная ДНК выпрямляется при неспецифическом способе связывания и сильно изгибается при структурно–специфическом.

2.2.5 Внеклеточные функции HU белка и его связь с патогенезом бактерий.

Было установлено, что HU белок взаимодействует с бактериальными липополисахаридами (ЛПС), находится в тесном взаимодействии с внешней мембраной грамотрицательных бактерий и может высвобождаться во внеклеточное пространство [106]. У грамположительных бактерий во взаимодействие HU белка с ЛПС основную роль играет отрицательно заряженная молекулы липотейхоевой кислоты [106]. Известно, что внеклеточная ДНК (вкДНК) тоже присутствует в комплексах HU белков с

бактериальными ЛПС, поэтому было высказано предположение, что HU действует как молекулярный клей между ЛПС и вкДНК [106]. Было показано, что белок MDP1, гомолог HU у *M. tuberculosis*, присутствует во внеклеточном пространстве и играет роль в развитии микобактериальной инфекции [107], обеспечивая взаимодействие бактериальных клеток с полисахаридами (гиалуроновой кислотой) на поверхности клеток хозяина. Также было установлено, что при инфекции, вызванной *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, HU белок взаимодействует с интерлейкином-1 β , выделяемым клетками организма-хозяина. Предполагается, что таким образом HU белок может модулировать воспалительный ответ во время инфекции [108]. Данное предположение было подтверждено в экспериментах, когда антисыворотка против HU белка, эффективно снижала количество бактерий и способствовала лечению инфекции, связанной с периимплантитом [109].

Маленький размер, положительный заряд и сильные ДНК-связывающие свойства HU белка, позволяют предположить, что после секреции из бактериальной клетки белок может проникать в ядра клеток организма-хозяина и даже модулировать экспрессию генов. В частности, было обнаружено, что в вольбахии из рода грамотрицательных плеоморфных бактерий которая обладает функциональной бактериальной системой секреции IV типа (T4SS), обеспечивающей секрецию белков и ДНК во внеклеточное пространство [110], секретируют HU белок из бактериальной клетки, после чего секретируемый белок попадает в ядро клетки-хозяина [111]. Подобный механизм секреции HU белка через T4SS был также описан для *Haemophilus influenzae* [112].

HU белок является одним из белков, который *Helicobacter pylori* секретирует в супернатант культуры, что позволяет предположить его влияние на развитие воспаления желудка [113]. HU белок был обнаружен в культуральном фильтрате [114] и внеклеточных везикулах [115], продуцируемых *F. tularensis*. HU белок *Streptococcus Vibrio cholerae* также

секретируется в среду [116]. Кроме того, HU белок *V. cholerae* необходим для репликации фага CTXf, ответственного за вирулентность *V. cholerae* [117,118]. Гистоноподобный белок *Strp. intermedius* (Si-HLP), гомолог HU белка, также высвобождается из бактерии в культуральную среду, что подтверждается электронной микроскопией [119]. Более того, рекомбинантный Si-HLP стимулирует иммунную систему хозяина и активирует секрецию провоспалительных цитокинов IL-8 и IL-1 β , а также фактора некроза опухоли (TNF) [119,120]. Гистоноподобный белок, выделенный из стрептококков группы A, белок HrpA, обладает высокой аффинностью связывания с гликозаминогликанами, такими как гепарин [121,122], а его внеклеточные формы образуют комплексы с липотейхоевой кислотой *in vitro* [123]. HrpA *Streptococcus pyogenes* экспонируется на поверхности бактерии [124] и секретируется в среду [125]. Кроме того, HrpA *Streptococcus mitis* индуцирует провоспалительную реакцию в макрофагах и, таким образом, способствует развитию постстрептококкового гломерулонефрита [126].

Список бактерий, для которых была показана секреция HU белка, приведен в таблице 2.

Таблица 2. Внеклеточная локализация HU белка.

Бактерии	Локализация HU белка вне бактериальной клетки	Ссылки
<i>Escherichia coli</i>	вкДНК; ЛПС; биопленка	[106,127]
<i>Francisella tularensis</i>	Культуральный супернатант; везикулы	[114,115]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Внеклеточные комплексы с полисахаридами хозяина	[107]
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Биопленки, комплекс с цитокином IL-1 β	[108,109]
<i>Wolbachia</i>	Клетка-хозяина	[111]
<i>Helicobacter pylori</i>	Супернатант культуры	[113]

<i>Vibrio cholera</i>	Супернатант культуры	[116]
<i>Streptococcus intermedius</i>	Супернатант культуры	[119]
<i>group A streptococci</i>	Внеклеточные комплексы с гепарином и липотейхоевой кислотой	[121–123]
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Открытые поверхности, супернатант культуры	[124,125]
<i>Haemophilus influenzae</i>	Биопленки	[112,128]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Биопленки	[129,130]
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Биопленки	[131]
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Биопленки	[132]
<i>Streptococcus gordonii</i>	Биопленки	[132]

Механизмы секреции HU белка пока полностью не описаны. Одним из возможных способов переноса HU белка через бактериальную мембрану является использование системы секреции T4SS, как описано у *Haemophilus influenzae*, где белок секретируется из клетки вместе с ДНК на ранних стадиях прикрепления к поверхности и становится частью бактериальной биопленки [112]. HU белок может высвобождаться и с помощью других механизмов, например, при лизисе клеток [133]. Очевидно, что данный вопрос нуждается в более тщательном изучении.

2.2.5.1 Роль гистоноподобных белков в формировании биопленок.

Биопленка, которая образуется многими патогенными бактериями, способствует развитию хронических инфекционных заболеваний и состоит из природных полимеров, которые называются внеклеточными полимерными веществами (ВПВ). ВПВ включают в себя внеклеточную ДНК (вкДНК), ДНК–связывающие белки и полисахариды, а также бактериальные жгутики и внешние мембранные везикулы (ВМВ) [134]. Формирование биоплёнок

препятствует внешнему воздействию на патогенные бактерии и ослабляет действие антибиотиков [134]. HU белок и его ближайший гомолог IHF, которые относятся к 2-ому классу ДНК-связывающих белков (DNABII), являются типичными компонентами биоплёнок (табл. 2). Например, HU белок был обнаружен в бактериальной биопленке уропатогенной *E. coli* (UPEC), где он играл важную роль в поддержании её структурной целостности [127].

Роль гистоноподобных белков в поддержании целостности биоплёнок была установлена в экспериментах с человеческими бактериальными патогенами *P. aeruginosa* и *H. influenzae*, для борьбы с которыми использовали моноклональные антитела против IHF, способствующие разрушению биопленок [128,130]. Более того, использование моноклональных антител к IHF приводило к эрадикации биопленки *Haemophilus* и *Pseudomonas in vivo* [130]. Также в случае оральной инфекции, вызванной *A. actinomycetemcomitans*, эффективным лечением была гипериммунная антисыворотка против DNABII белков [109], а лечение анти-IHF сывороткой было эффективным против вторичных хронических инфекций у больных муковисцидозом, вызванных *Burkholderia cenocepacia* и *Pseudomonas aeruginosa* [129,131]. HU белок также является компонентом биоплёнок, формируемыми многими бактериальными патогенами человека, включая бактерии *Porphyromonas gingivalis* и *Streptococcus gordonii*, биопленки которых могут быть разрушены соответствующими антисыворотками [132] (табл. 2).

2.2.6 HU белок – потенциальная фармакологическая мишень.

Описанная выше связь HU белка с вирулентностью бактерий, а также его отсутствие в млекопитающих указывает на то, что данный белок может рассматриваться как потенциальная фармакологическая мишень для создания таргентных антибактериальных препаратов. Как упоминалось выше, антитела к гистоноподобным белкам DNABII (HU и IHF) являются эффективными средствами для разрушения биопленок [109,128–132], однако наблюдаемое при использовании антисывороток замедление роста бактерий несопоставимо

с эффектом классических антибиотиков [134]. Очевидно, что данные антисыворотки действуют только на внеклеточные белки. Кроме того, было продемонстрировано, что только антитела против ДНК–связывающей области ИФ приводили к разрушению биопленки *H. influenzae*, тогда как антитела к α –спиральной области белка оказались неэффективны [135]. Поэтому более перспективными являются ингибиторы, способные воздействовать на активный HU белок внутри бактериальной клетки. В работе [136] было показано, что отрицательно–заряженный белок Gr46 бактериофага SPO1 *Bacillus subtilis* действует как ингибитор HU белка, который связывает HU белок, имитируя комплекс с олигонуклеотидом, что приводит к общему снижению жизнеспособности таких бактерий, как *B. subtilis*, *M. tuberculosis*, *Acinetobacter baumannii* и *Plasmodium falciparum*.

В то же время наиболее перспективным является поиск низкомолекулярных ингибиторов HU среди природных или синтетических органических соединений. Методами моделирования было показано, что эффективное противомикробное средство, галлат эпигаллокатехина (EGCG), может связывать HU белок *H. pylori* и предположительно ингибировать его функцию [137]. EGCG является компонентом зеленого чая, и его противомикробное действие уже давно было доказано [138–144]. Негативное влияние EGCG на вирулентность *F. tularensis* было показано как *in vitro*, так и *in vivo* [24,64].

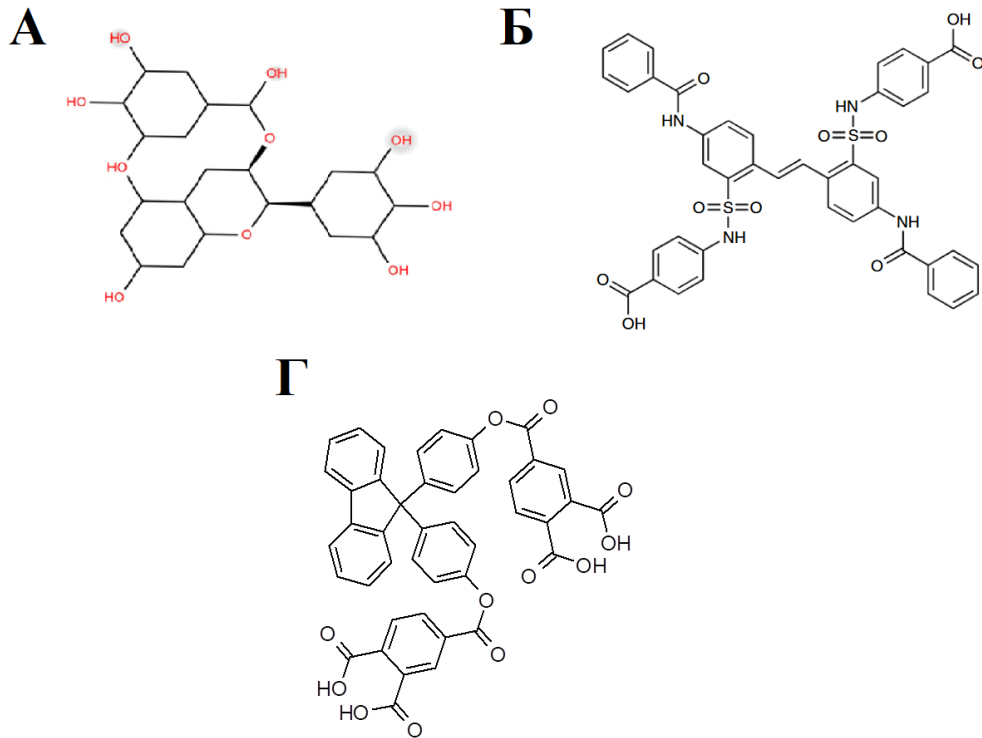


Рисунок 9. Низкомолекулярные ингибиторы NU белка среди природных или синтетических органических соединений. **А.** Галлат эпигаллокатехина (EGCG) (PubChem CID: 65064). **Б.** Производное трансстильбена (PubChem CID: 5821513). **В.** Бисфенольное производное флуорена [145].

В 2014 г. с помощью скрининга химических библиотек были найдены производные стильбена (рис. 9Б), которые ингибировали ДНК–связывающую функцию NU белка *M. tuberculosis*, а также рост бактерии в культуре [75]. Эти же соединения были активны в отношении гомолога NU из вируса африканской чумы свиней и приводили к снижению способности вируса к репликации в макрофагах [146]. Как уже было написано выше, конкретной мишенью ингибиторов на поверхности белка была центральная часть ДНК–связывающего домена, и в первую очередь положительно–заряженные остатки, участвующие в образовании ДНК–белкового комплекса.

В рамках данной работы с помощью виртуального скрининга были найдены бисфенольные производные флуорена (БПФ), которые ингибировали ДНК–связывающую способность NU белков в микоплазм *S. melliferum*, *M.*

gallisepticum и энтеробактерии *E. Coli*, а также подавляли рост микоплазмы в культуре [147–151].

Виртуальный скрининг без экспериментального подтверждения, проведённый группой [152], предсказал, что помимо эпигаллокатехина целый ряд природных соединений, среди которых мальтотетраоза, валрубацин, йодиксанол, эналкарен, индинавир, карфилзомиб, окситетрациклин, хинализарин, и др., может оказывать ингибирующее действие на HU белок микобактерий.

3 Материалы и методы.

3.1 Материалы.

Реактивы, использованные в работе, были «Molecular Biology Grade», или лучше, в том числе: акриламид, тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД) и персульфат аммония (Bio-Rad, США); N,N'-метиленабисакриламид, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) и мочеви́на (ЛКВ, Швеция); трис(гидроксиметил)аминометан (Merck, Германия); ацетат аммония, этидий бромид и борная кислота (Sigma, США), додецилсульфат натрия (ДСН) (Merck Германия), Хепес (ДИАЭМ, Россия), диметилсульфоксид (ДМСО) (Sigma, США), маркер молекулярных масс PageRuler Unstained Low Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Очистку воды проводили на установке MilliQ фирмы «Millipore» (США). Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном и полиакриламидном геле (ПААГ), и электрофорез белков в денатурирующем ПААГ проводили с использованием оборудования и реактивов фирмы BioRad (США) в соответствии с рекомендациями производителя.

В работе использовали эндонуклеазы рестрикции, (NdeI, NcoI, EcoRI). Остальные ферменты и наборы, используемые для молекулярно-биологических работ были произведены компанией Евроген (Россия).

Олигонуклеотиды, используемые в работе, были синтезированы в компании «Литех» на приборе ASM 800 DNAsynthesizer (BiossetLtd) или в

компании Евроген (Москва, Россия). Последовательности олигонуклеотидов приведены в таблицах 3–5.

Определение нуклеотидных последовательностей проводили в компании Евроген (Москва, Россия) на приборе Illumina: NovaSeq 6000 и MiSeq.

Таблица 3. Олигонуклеотиды, используемые для получения различных ДНК-структур, используемых в экспериментах по торможению ДНК в геле*.

	Последовательность, 5'–3'
D48_5 HEX	AGTCTAGAGTGCAGTTGAGTCCTTGCTACGACGGATCCCT TAGGTCAG
J48	CTGACCTAAGGGATCCGTCGTAGCAAGGACTCAACTGCAC TCTAGACT
J24.rgt	ACTCAACTGCACTCTAGACT
J24.lft	CTGACCTAAGGGATCCGTCGTAGCAAGG
A1	CTGACCTAAGGGATCCGTCGTAGCAAGAGACTCAACTGCA CTCTAGACT
A3	CTGACCTAAGGGATCCGTCGTAGCAAGAAAGACTCAACT GCACTCTAGACT
A7	CTGACCTAAGGGATCCGTCGTAGCAAGAAAAAAGACTC AACTGCACTCTAGACT
Bj	CTGACCTAAGGGATCCGTCGTAGCAAGGGGCTGATACCG GAAGCTTCT
Hj	AGAAGCTTCCGGTATCAGCCTGAGCGGTGGTTGAATTCCT
Rj	AGGAATTCAACCACCGCTCAACTCAACTGCACTCTAGACT
D21	AGTCTAGAGTGCAGTTGAGTC
D23	AGTCTAGAGTGCAGTTGAGTCCT
D25	AGTCTAGAGTGCAGTTGAGTCCTTG
D27	AGTCTAGAGTGCAGTTGAGTCCTTGCT
D29	AGTCTAGAGTGCAGTTGAGTCCTTGCTAC

D31	GTCTAGAGTGCAGTTGAGTCCTTGCTACGA
D33	AGTCTAGAGTGCAGTTGAGTCCTTGCTACGACG
D36	AGTCTAGAGTGCAGTTGAGTCCTTGCTACGACGGAT

* Для получения дуплексов по 3–12 мкМ каждого олигонуклеотида в паре инкубировали в 50 мкл буфера, содержащего 20 мМ Трис–HCl (pH 8.0) и 200 мМ NaCl, при 90°C в течение 3 мин, затем жидкость медленно охлаждали в лабораторном помещении в течение 4 часов.

Таблица 4. Олигонуклеотиды, используемые для клонирования генов HU белков.

Название	Последовательность, 5'–3'*
HUEcoli.F	GATAA <u>CATATGA</u> ACAAGACTCAACTGATTG
HUEcoli.R	GATCCTCTAGA <u>AATTTACTT</u> AACTGCGTCTTTC
HUMgal.F	TATTTCC <u>CCATGG</u> CAAAAATCAAATC
HUMgal.R	ATCTT <u>GAAATTC</u> CTATTTGTGCGA
HUSpm.F	GGTGTAC <u>CATATGT</u> CAAAAAAAGAACTAGC
HUSpm.R	CTTTCG <u>GAAATTC</u> TTAATTATTGTTTAAATCAG
HuNG.F	GAGAA <u>CATATGA</u> ACAAGTCTGAATTGATCG
HuNG.R	CTAT <u>GAAATTC</u> TTACAGTGCCTTTCAATGC

*Подчёркнуты сайты эндонуклеаз рестрикции, используемые для клонирования

Таблица 5 Список синтетических олигонуклеотидных праймеров, предназначенных для замены аминокислот, и контрольные праймеры для отбора мутантных клонов.

Название	Последовательность, 5'–3'	T _M *, °C
R57A.F	AACCGAAAGAGCAGCAGCCGATGGAAAAGCAG GT Check57A.R: ACCTGCTTTTCCATCGGC	46
K80A.R	ATGATCGAAAACAGCATTGTAATTTCTTCTGC Check80A.F: GCAGAAGAAATTACAAATGC	44
K88A.R	AAAGCAGGTAAACAATTAGCCACTGATTTAAAC AATAA Check88A.R: ATTATTGTTTAAATCAGTGGC	45

F14A.F	GCCGAAAAAGCTACTGATGTCTTATCAA Check14.R: TTGATAAGACATCAGTAGC	40
F29A.R	ATGATCGAAAACAGCATTTGTAATTTCTTCTGC Check29.F: GCAGAAGAAATTACAAATGC	44
V17T.F	GAAAAATTTACTGATACCTTATCAAAAACACAT GC Check17.R: GCATGTGTTTTTGATAAGGT	42
F31L.F	ACAAATTTTGTTCCTCGATCATATTA AAAAAGC Check31.R: GCTTTTTTAATATGATCGAG	40
K35T.F	GATCATATTACCAAAGCTTTAGTTGCTGG Check35.R: CCAGCAACTAAAGCTTTGG	47
N92K.F	AACTGATTTAAAGAATAATTAAGAATTCGAGC Check92.R: CTCGAATTCTTAATTATTC	46

*Тм – рассчитана с поправкой на содержание соли (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) и использована в качестве температуры отжига при мутагенезе на основе ПЦР.

В работе использовали растворы, приготовленные в соответствии с таблицей 6. Стоковые растворы для приготовления полиакриламидных гелей готовили в соответствии с таблицами 7–8.

Таблица 6. Растворы, используемые для приготовления компетентных клеток *E. coli* [153].

RF1, pH 5,8		
Компоненты	Сток	Количество на 1л
RbCl	Сухой	0,6 г
CH ₃ COOH	1М, pH 7,5	1,5 мл
CaCl ₂ ×2H ₂ O	Сухой	0,075 г
MnCl ₂ ×2H ₂ O	Сухой	0,5 г
Глицерин	100%	7,5 г
RF2, pH 6,8:		
Компоненты	Сток	Количество на 1л
RbCl	Сухой	0,012 г

CaCl ₂ ×2H ₂ O	Сухой	0,11 г
Глицерин	100%	1,5 г

Таблица 7. Растворы, используемые для приготовления не денатурирующего полиакриамидного геля для анализа ДНК.

Компоненты стока	Количество на 10 мл
Акриламид–бисакриламид 40%	2.0 мл
ТВ буфер 5X (500 мМ Трис, 500мМ борная кислота)	1.0 мл
Персульфат аммония	100 мкл
ТЕМЕД 100%	10 мкл
H ₂ O	6,9 мл

Таблица 8. Растворы, используемые для приготовления денатурирующего полиакриамидного геля для анализа белков.

Компоненты стока	Количество на 10 мл
Разделяющий гель (15%)	
H ₂ O	2,4 мл
Трис–HCl 1,5 М рН 8,8	2,5 мл
Акриламид–бисакриламид 40%	5 мл
ДСН 10%	100 мкл
Персульфат аммония 10%	100 мкл
ТЕМЕД	10 мкл
Концентрирующий гель (8%)	
H ₂ O	6,1 мл
Трис–HCl 1,5 М рН 6,8	2,5 мкл
Акриламид–бисакриламид 40%	1,3 мл
ДСН 10%	100 мкл

Персульфат аммония 10%	100 мкл
ТЕМЕД	10 мкл

3.2 Методы.

3.2.1 Клонирование генов HU белков и получение плазмидных конструкций.

Клонирование генов проводили с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР), проводимой на матрице геномной ДНК, выделенной из биомассы соответствующей бактерии СТАВ–методом [154], с использованием олигонуклеотидов из таблицы 3 и Encyclo–полимеразы (Евроген, Москва). Постановка и условия проведения ПЦР подбирали в соответствии с рекомендациями производителя Encyclo–полимеразы. На 5’–концы олигонуклеотидов были введены сайты эндонуклеаз рестрикции для встраивания в экспрессирующие вектора. После рестрикции и выделения продукта из агарозного геля, ПЦР–фрагменты были встроены (лигированы) в векторные плазмиды, обработанные соответствующими рестриктазами.

Лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* штамм Match1 (Stratagene, La Jolla, USA). Выделенную из выросших клонов плазмидную ДНК проверяли на отсутствие мутаций, возникших при клонировании, при помощи автоматического секвенирования.

3.2.2 Приготовление и трансформация химически–компетентных клеток *E.coli* и трансформация плазмидной ДНК.

Ночную культуру, выращенную на среде LB, разводили в 100 раз и растили клетки до OD₆₀₀=0,4–0,5 при 37°C на орбитальной качалке (180 об/мин). Клетки переносили в лёд и осаждали на центрифуге Centrifuge 5804R (Eppendorf, Германия) при 4000 об/мин в течение 5 мин. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в холодном растворе RF1 (3,5 мл на 10 мл культуры) и инкубировали во льду в течение 15 мин. Клетки открывали на центрифуге Minispin (Eppendorf, Германия) при 4000 об/мин в течение 5 мин

при 4°C, супернатант удаляли. Осадок ресуспендировали в холодном растворе RF2 (0,8 мл на 10 мл культуры), готовили аликвоты клеток объёмом 100 мкл и замораживали в жидком азоте. Аликвоты клеток хранили при –70°C.

Для проведения трансформации к размороженным во льду компетентным клеткам BL21(DE3)RIPL (Stratagene, La Jolla, USA) добавляли 100 нг экспрессионной плазмиды и инкубировали смесь в течение 60 мин во льду. Затем клетки подвергали тепловому шоку при 42°C в течение 2 мин и инкубировали во льду в течение 2 мин. Далее добавляли 500 мкл среды LB, инкубировали при 37°C в течение 60 мин и высевали трансформанты на чашки Петри с твердой средой LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 50 мкг/мл хлорамфеникола.

3.2.3 Нарботка рекомбинантных белков.

Штаммы–продуценты рекомбинантных белков 6His–TEV–HU получали путем трансформации клеток *E. coli* штамма BL21(DE3)RIPL (Stratagene, USA) рекомбинантной плазмидой pET22–HisTev–HU. Трансформанты высевали на LB–агар, содержащий 34 мкг/мл хлорамфеникола и 100 мкг/мл ампициллина и инкубировали при 37°C. Для индукции экспрессии рекомбинантного белка, одиночную колонию выращивали в жидкой среде до OD₆₀₀ 0,7, затем добавляли IPTG до конечной концентрации 0,2 мМ и инкубировали при 25°C в течение 20 часов.

3.2.4 Выделение и очистка рекомбинантных HU белков.

Полученную из 1 л бактериальной культуры замороженную биомассу (10 г), лизировали в 25 мл охлаждённого буферного раствора А (400 мМ NaCl, 50 мМ ХЕПЕС рН7.5, 5 мМ имидазол), содержащего также 0.1% Тритон X–100, 5% глицерол и ингибиторы протеаз, и обрабатывали ультразвуком с помощью ультразвукового дезинтегратора “Ultrasonic Processor” (ColeParmer) в течение 5×30 сек, охлаждая во льду. Нерастворимые компоненты лизата осаждали центрифугированием при 20000 об/мин, 20 мин, 4°C. Надосадочную жидкость собирали и помещали на колонку с металлоафинной смолой Ni–NTA

Superflow (Quigen), предварительно уравновешенную буфером А. Металлохелатную аффинную хроматографию проводили с использованием хроматографической системы АКТА Prime (GE Healthcare). Удаление неспецифически связавшихся со смолой белков, а также связавшихся с выделяемым белком фрагментов геномной ДНК, проводили путём промывания колонки буферным раствором А, содержащим 1 М NaCl и 20 мМ имидазол. Элюцию целевого белка проводили буферным раствором А, содержащим 500 мМ имидазол. Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и инкубировали с высокоспецифичной цистеиновой протеазой вируса гравировки табака (TEV-протеаза) (Invitrogen) при комнатной температуре в течение 2 часов с последующим диализом против трёх литров буферного раствора А в течение 16 часов при 4°C. Для освобождения от шести-гистидинового тага и TEV-протеазы проводили повторную металлохелатную хроматографию. Фракцию целевого белка, не связавшуюся со смолой, концентрировали на центрифужных концентраторах AmiconUltra 3 или 5кДа (Millipore) и доочищали с помощью гель-фильтрационной хроматографии, проводимой на колонке Superdex G-75 (GE Healthcare), уравновешенной буферным раствором (200 мМ NaCl, 20 мМ Трис-HCl pH8.0, 5% глицерол). Стоковые растворы белка хранили на -70°C в растворе, содержащем 20мМ Трис pH 8.0, 200mМ NaCl и 5% глицерин.

3.2.5 Электрофорез белков в денатурирующем полиакриламидном геле.

Электрофорез белков по методу Лэммли проводили на Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, США). Электрофорез проводили при постоянном напряжении 120 на источнике тока PowerPac Basic (Bio-Rad, США). Затем отделенный от стекол гель фиксировали в смеси 20% этилового спирта и 10% уксусной кислоты и окрашивали с помощью Кумасси R250. Далее гель обрабатывали 10% уксусной кислотой для удаления фона.

3.2.6 Метод анализа изменения электрофоретической подвижности ДНК.

С помощью метода торможения в геле детектировали связывание НУ белков с ДНК. Белок, связываясь с олигонуклеотидом, замедляет его миграцию в ПААГ в процессе электрофореза в нативных условиях. Контролем является препарат олигонуклеотида без добавления рекомбинантного белка (белкового экстракта). Различные количества рекомбинантного НУ белка были инкубированы с 5'-HEX-меченным олигонуклеотидным дуплексом (12,5 нМ) в течение 15 мин в 8 мкл связывающего буфера, содержащего 25 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 9% глицерина и различные концентрации NaCl (преимущественно 150 мМ). Образцы были внесены в лунку 8% ПААГ (200x180x1,5 мм), в качестве буфера использовали 100мМ Трис-борат (рН 8,3), после чего проводили электрофорез при 125В и 4⁰С в течение 1,5 ч. Гели сканировали при помощи лазерного флуоресцентного анализатора Pharos FX MolecularImager (Bio-RadLaboratories), оцифровку изображений проводили в программе QuantityOne – 4.6.9 (Basic) (Bio-RadLaboratories).

3.2.7 Расчет констант диссоциации ДНК-белковых комплексов.

Константы диссоциации были рассчитаны с использованием тестового образца, содержащего ДНК-связывающий белок и ДНК-субстрат, который может формировать только один тип ДНК-белкового комплекса. P₀ (общая концентрация белка) была известна заранее, также как и S₀ (концентрация добавленной ДНК). При разделении свободной и связавшейся с белком флуоресцентно меченой ДНК (5'-HEX) в ПААГ были измерены величины соответствующих флуоресцентных сигналов, которые затем использовали для расчета абсолютного количества связанной и свободной ДНК. Отношение флуоресцентных сигналов связанной и свободной ДНК было принято за r (r = [связанная ДНК]/[свободная ДНК]). Тогда концентрацию свободной ДНК (S_f) можно вычислить по формуле

$$S_f = S_0 / (1 + r),$$

а связанной –

$$S_b = S_0 / (1 + r).$$

По определению, константа диссоциации это:

$$K_d = P_f * S_f / S_b$$

Где P_f – это концентрация свободного белка. Если белок формирует только специфический 1:1 комплекс с ДНК, то

$$P_0 = P_f + S_b$$

Комбинируя приведенные выше уравнения, получаем:

$$S_b = P_0 - K_d * r$$

Далее

$$K_d = P_0 / r - S_0 / (1 + r) = P_0 * [\text{свободная ДНК}] / [\text{связанная ДНК}] - S_0 * [\text{свободная ДНК}] / ([\text{связанная ДНК}] + [\text{свободная ДНК}]),$$

где коэффициент r – получен для каждого ДНК–субстрата в отдельном эксперименте по торможению ДНК. Данные соотношения верны даже в случае, если $S_0 > K_d$, наиболее важным является точность измерения соотношения: $[\text{свободная ДНК}] / [\text{связанная ДНК}]$.

3.2.8 Определение концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀).

Для определения IC₅₀ к предварительно сформированным комплексам ДНК–белок добавляли 1 мкл серийных разведений тестируемых соединений или ДМСО. После пятиминутной инкубации анализ проводили, как описано выше в 2.2.6. Построение кривых ингибирования и определение концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀), производили при помощи программы Graph Pad Prism (Graph Pad Software, Inc.).

3.2.9 Дифференциальная сканирующая калориметрия.

Исследование процесса тепловой денатурации проводили методом дифференциально сканирующей калориметрии (ДСК). Измерение проводили на дифференциальном адиабатическом микрокалориметре ДАСМ–4М с капиллярными ячейками объёмом 467 мкл, при давлении в ячейках 2,2

атмосферы и скорости нагрева 1 К/мин. Для эксперимента использовался белок в концентрациях 1,0 и 4.5 мг/мл, находящийся в буфере, содержащем 10 мМ Na_2PO_4 (рН 7.4) и 0.2 М NaCl (или 1.0 М NaCl для проверки влияния концентрации соли на процесс тепловой денатурации белка).

3.2.10 Сайт–направленный мутагенез.

Сайт–направленный мутагенез методом quick change с одним праймером проводили, как описано в [155]. Синтетические олигонуклеотидные праймеры, предназначенные для замены аминокислот (по одному праймеру для каждого мутанта), и праймеры, предназначенные для отбора мутантных клонов, перечислены в таблице 5. Было проведено 18 циклов ПЦР на матрице HUSpm–экспрессирующей плазмиды с использованием набора Tersus Plus PCR (Евроген, Москва, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Продукты ПЦР обрабатывали эндонуклеазой DpnI (Thermo Fisher Scientific, Массачусетс, США), расщепляющей ДНК–матрицу, а затем трансформировали в компетентные клетки *E. coli* Match1. Мутантные клоны были отобраны с помощью ПЦР, проведенной непосредственно на колониях с использованием ДНК–полимеразы Taq (Евроген, Москва, Россия) с контрольными праймерами (табл. 5) и подходящим универсальным праймером T7. Плазмидные ДНК, выделенные из мутантных клонов, были проверены сиквенсом, чтобы гарантировать отсутствие случайных мутаций, связанных с ПЦР. Экспрессию и очистку мутантных белков проводили так же, как описано для HUSpM дикого типа. Чистоту мутантов оценивали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с окрашиванием Кумасси, а концентрации белков измеряли с использованием набора для анализа концентрации белков с бицинхониновой кислотой (Sigma–Aldrich, Сент–Луис, США).

3.2.11 Изотермическая титрационная калориметрия.

Исследование влияния мутаций на связывание БПФ1 с HUSpm проверяли методом изотермической титрационной калориметрии (ИТК).

Эксперименты ИТС проводили с использованием устройства MicroCal iTC200 (GE Healthcare, Германия) при 30 °С. Образцы белка и соединение растворяли в 50 мМ фосфатном буфере рН 7,5, содержащем 1% (по объему) ДМСО. В ячейку заливали 198 мкл раствора белка с концентрацией 0,5 мМ. После чего, каждые 2–4 минуты добавляли ититрант в объеме 2,6 мкл так, чтобы молярные соотношения белок:титрант попадали в диапазон от 0,1–0,2 до 2–3. Инъекцию раствора соединения в указанном выше буфере использовали в качестве контроля. Для построения кривой аппроксимации и расчета константы ассоциации комплекса (K_a), энтальпии связывания (ΔH) и энтропии связывания (ΔS) использовали программное обеспечение MicroCal Origin.

4 Результаты и обсуждения.

4.1 Биоинформатический анализ аминокислотных последовательностей гистоноподобных белков бактерий.

Поиск аминокислотных последовательностей гистоноподобных белков HU и IHF, представленных в базе данных InterPro, был проведён с использованием идентификатора (ID) IPR000119. Полученное выравнивание было соотнесено с таксономической классификацией [NCBI Taxonomy. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>], в результате чего была собрана выборка аннотированных последовательностей HU/IHF белков из более 2000 видов, относящихся к 25 типам бактерий.

С целью визуализации результатов множественного выравнивания и кластеризации был использован метод главных компонент (PCA). PCA — это мощный метод анализа больших наборов данных (см. [156]) и ссылки внутри), который использует векторное представление каждой белковой последовательности в виде точки в трехмерном пространстве, расстояния между точками зависят от степени идентичности белков. Для анализа использовали только последовательности консервативной (коровой) части HU/IHF белков размером 90 аминокислотных остатков. На рисунке 10 приведены результаты PCA, демонстрирующие разделение гистоноподобных

белков на 3 основные группы (HU белки, IHF_A или IHF_B) и дальнейшую кластеризацию HU белков. Разделение гистоноподобных белков на 3 группы: совпало с результатами работы [157] в которой в примерно тоже время был проведён сравнительный эволюционный анализ HU и IHF белков.

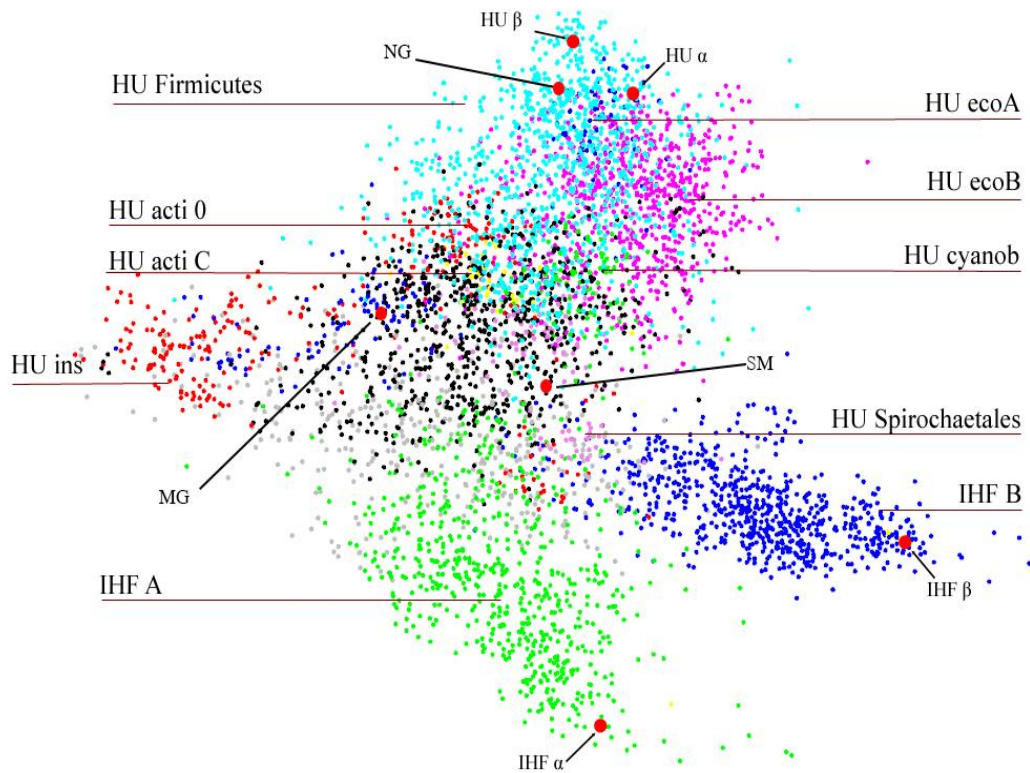


Рисунок 10. Разделение аминокислотных последовательностей белков HU и IHF на три основные группы: HU, IHF_A (зелёный) и IHF_B (синий), а также результаты дальнейшего разделения последовательностей HU на группы. Наиболее распространенные группы HU: HU_Firmicutes (в основном содержат HU из *Firmicutes*) и клайды HU_ecoA и HU_ecoB (в основном содержат HU из протеобактерий) показаны пурпурным, синим и голубым цветами, соответственно. Другие цвета показывают клайды HU: IHU_ins, HU_cyanobacteria, HU_Sporochaetales, HU_actinomycetota C, HU_actinomycetota 0. HU_ins населен α -, β - и γ -протеобактериями, в основном, *Rhizobiales*, *Burkholderiales* и *Xanthomonadales*. Эта группа наиболее удалена от всех остальных HU белков. Крупными красными точками показаны положения HU и IHF белков *E. coli*, а также положения HUNg, HUMgal и HUSpm.

Из рисунка 10 видно, что белки IHF хорошо разделяются на две группы, IHF_A и IHF_B, а также обособлены от HU белков, у которых отсутствует явное разделение на 2 группы. Этот результат следует отметить особо, так как

в современной литературе белки из семейства HU/ИНФ классифицируются как HU_A, HU_B, ИНФ_A и ИНФ_B или как ДНК–связывающие белки, если последовательность не относится ни к одной из четырех групп. В качестве альтернативы используется аналогичная система классификации – hup1, hup2, ИНФ_A, ИНФ_B. Как было уже отмечено в литературном обзоре, разделение HU белков на группы hup1 and hup2 (или HU_A и HU_B) возникло исторически. В нём в качестве основы были взяты гены HU белков *E. coli*, продукты которых обычно формируют гетеродимер HU $\alpha\beta$. Однако проведённый анализ показал, что последовательности мономеров HU α and HU β *E. coli* очень близки друг к другу (62 аминокислоты из 90 совпадают), тогда как ИНФ α and ИНФ β далеки друг от друга (совпадает 24 аминокислоты из 90). Поэтому, аннотацию гомодимерных HU на HU_A HU_B или hup1/hup2 можно считать нецелесообразной.

При проведении биоинформатического анализа было замечено, что аннотации в базах данных не всегда аккуратны: 2% последовательностей HU белков ошибочно были идентифицированы как ИНФ, и 1% в ИНФ_A или ИНФ_B ошибочно были идентифицированы как HU белки. При этом, где-то треть белков HU/ИНФ просто аннотируется как «ДНК–связывающий белок»; без дальнейшего отнесения белков к HU, ИНФ_A или ИНФ_B.

В качестве объектов исследования были выбраны как похожие и таксономически близкие HU белки HUEcoli и HUNg из *E. coli* и *N. gonorrhoeae*, так и удалённые от них HU белки микоплазм HUSpm из *S. melliferum* и HUMgal из *M. gallisepticum*. Хорошо изученный HU– α белок *E. coli* был взят в качестве контроля.

4.2 Получение рекомбинантных HU белков HUEcoli, HUNg, HUMgal, HUSpm и изучение их ДНК–связывающих способностей.

4.2.1 Получение белковых препаратов.

Гены отобранных белков были получены с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) на матрице геномной ДНК, выделенной из

соответствующих бактерий, и заклонированы в плазмидные вектора системы рЕТ для индуцибельной экспрессии в клетках *E. coli*. Помимо целевого белка плазмидные конструкции содержали нуклеиновые последовательности, кодирующие N-концевые шести-гистидинов (6xHis) таги и сайты TEV-протеазы. Плазмидные конструкции были трансформированы в экспрессирующий штамм *E. coli* BL21(DE3)RIPL. После наработки биомассы, индукции экспрессии и осаждения клеток, выделение и очистку рекомбинантных белков клеток проводили с помощью двухстадийной афинной хроматографии. Между двумя стадиями хроматографии белковый препарат подвергался гидролизу TEV протеазой (рис. 11А). Финальную очистку проводили методом гель-фильтрационной хроматографии (рис. 11Б). Выходы рекомбинантных белков составляли 5–10 мг с литра бактериальной культуры.

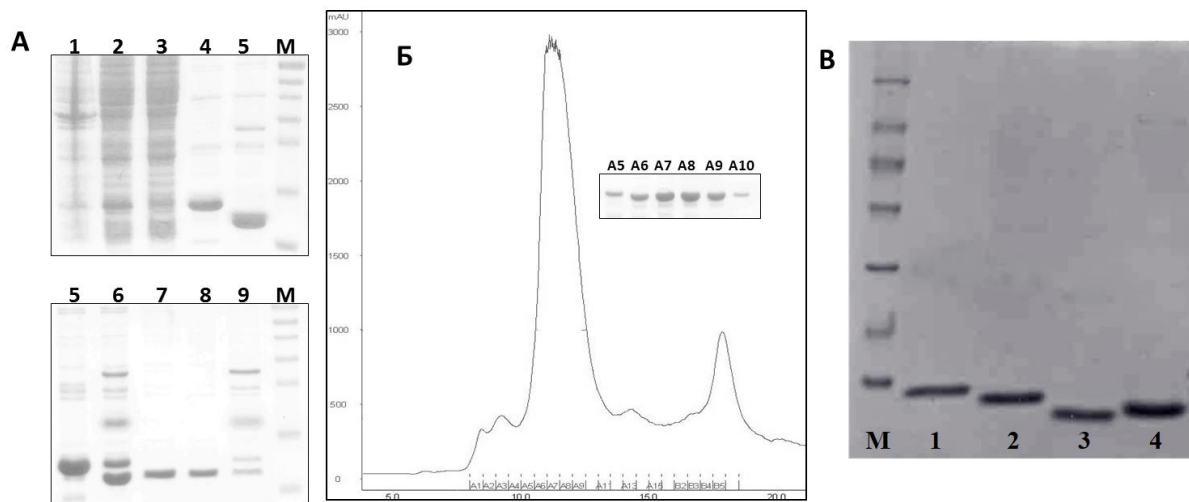


Рисунок 11. Результаты хроматографической очистки рекомбинантного HU белка из микоплазмы *S. meliferum*: А. Электрофореграммы белковых фракций, полученных при проведении первой (верхняя панель) и второй (нижняя панель) стадии металлохелатной хроматографии: 1– тотальный белок, 2– осветлённый лизат, 3– осадок, 4– промывка колонки, 5– элюция адсорбированного белка, 6– протеолиз белка, 7– проскок первая фракция, 8–проскок вторая фракция, 9– элюция после протеолиза, М–маркер молекулярных масс (PageRuler Unstained Low Range Protein Ladder). Б. Хроматограмма результатов гель-фильтрационной хроматографии на колонке Superdex G–75 (GE Healthcare). На врезке

электрофоретический анализ собранных белковых фракций. В. Финальные препараты: 1– HUMgal, 2– HUSpm, 3– HUNg, 4– HUEcoli.

4.2.2 Сравнительный анализ особенностей ДНК–связывания исследуемых гистоноподобных белков.

Для исследования ДНК–связывающих способностей выделенных HU белков использовали различные ДНК–дуплексы (смотри табл. 3), полученные из синтетических олигонуклеотидов разной длины, один из которых содержал флуоресцентную метку на 5’–конце. **Дуплексы, используемые в разных экспериментах описаны в соответствующих главах.** Формирование комплексов контролировали по торможению ДНК в геле при проведении электрофореза в нативных условиях (EMSA). Использование данного метода позволяло сравнивать полученные результаты с исследованием комплексов HU *E. coli*, представленными в литературе.

Были проведены два типа экспериментов: изучение высоко-аффинного (специфического) связывания HU белков с различными ДНК структурами с расчётами констант диссоциации комплексов и качественный анализ особенностей связывания HU белков с правильной дцДНК разной длины.

Для изучения прочного специфического связывания HU белков с различными ДНК–структурами, эксперименты проводили при «физиологической» концентрации соли, 150 мМ NaCl. В эксперименте были задействованы различные ДНК–структуры, приведённые на рисунке 12.

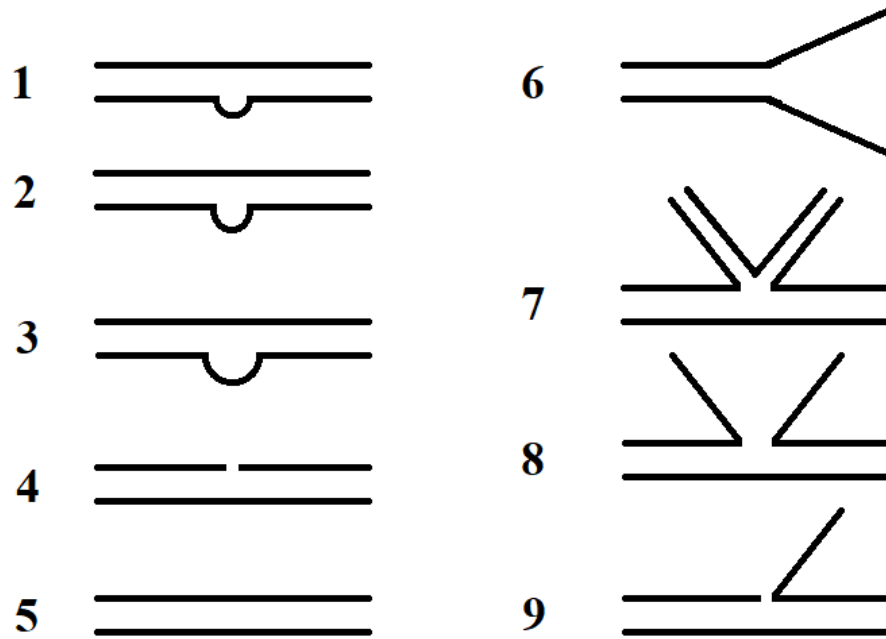
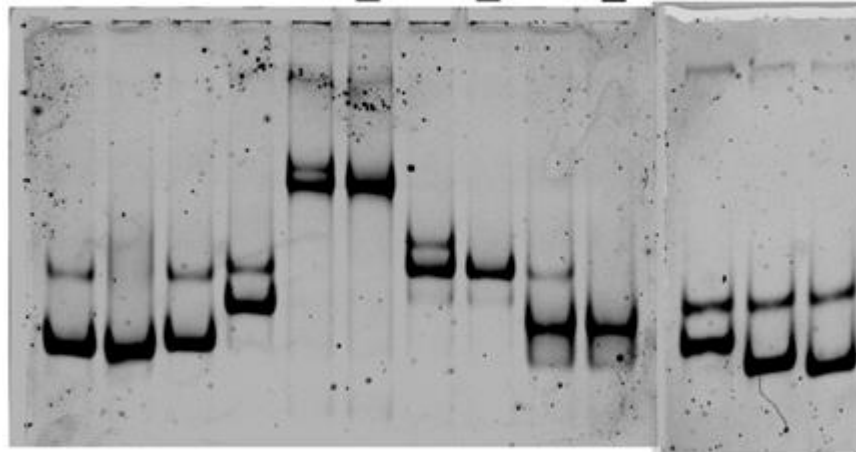
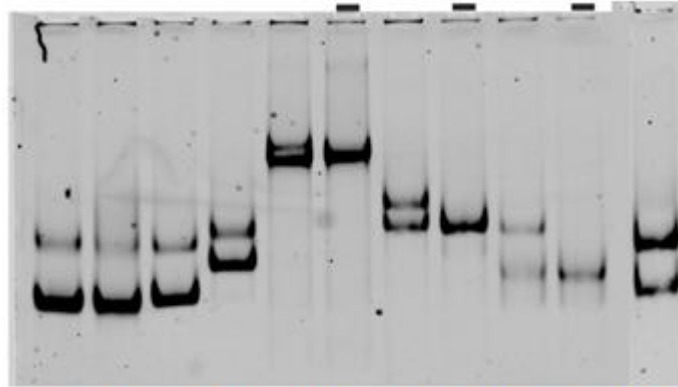


Рисунок 12. Схематическое изображение олигонуклеотидных дуплексов и триплексов, имитирующих различные репликационные и репарационные ДНК–структуры: 1. Линейная дцДНК с одно–нуклеотидной вставкой в одной из цепей (A1); 2. Линейная дцДНК с три–нуклеотидной вставкой в одной из цепей (A3); 3. Линейная дцДНК с семи–нуклеотидной вставкой в одной из цепей (A7); 4. дцДНК с разрывом (Nick, N) 5. дцДНК (дц); 6. Y–образная ДНК (вилка, Fork); 7. X–образная ДНК (структура Холлидея, J); 8. T–образная ДНК (iJ); 9. Проникающая ДНК (inv).

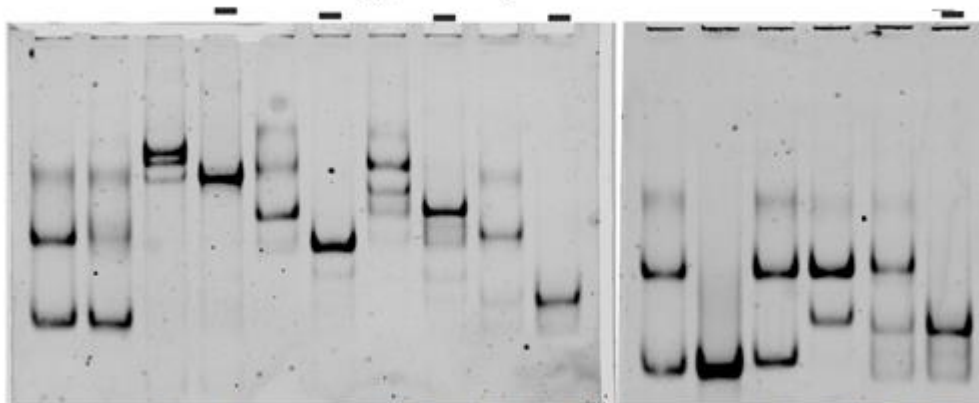
Результаты эксперимента приведены на рисунке 13. После проведения EMSA, гели сканировали, оцифровывали и, на основании количественной оценки свободной и связанной ДНК, определяли константы диссоциации (K_d) (табл. 9) и константы ассоциации (K_a) комплексов. Профили аффинности НУ белков к разным ДНК–структурам представлены рисунке 14.

E. coli

п дц A1 A7 J J inv inv fork fork A7 A3 A1

S. melliferum

п дц A1 A7 J J iJ iJ fork fork A3

M. gallisepticum

п дц J J inv inv iJ iJ fork fork п дц A1 A7 fork fork

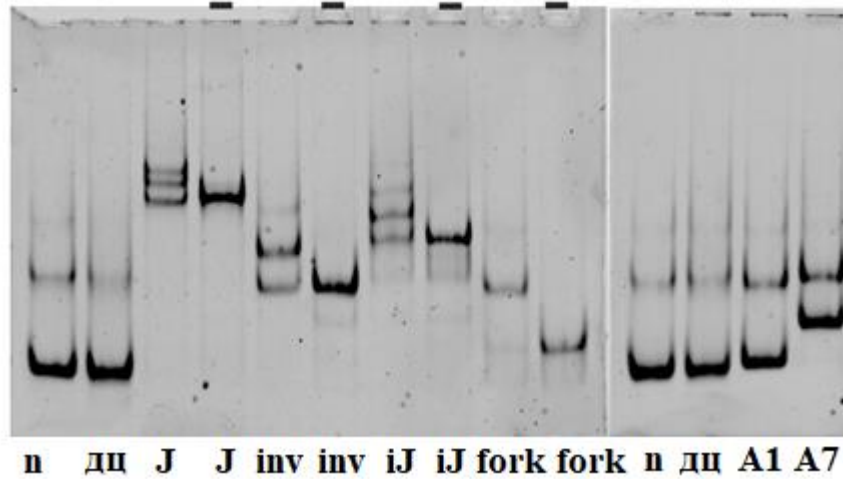
N. gonorrhoea

Рисунок 13. Связывание HU с различными структурами ДНК. Представлены результаты анализа подвижности ДНК и ДНК–белковых комплексов в полиакриламидном геле. Название организмов указаны сверху. Структуры ДНК (смотри рис. 13) подписаны снизу.

Таблица 9. Константы диссоциации (K_d , нМ) комплексов HU-белков с различными ДНК-структурами.

HU белки/ ДНК-структуры	HUEcoli	HUNG	HUSpm	HUMgal
A1	88	440	35	132
A3	88	440	35	132
A7	44	220	12	44
Nick	88	440	35	264
дц	293	1 100	117	440
J	44	110	35	26
inv	44	88	18	13
iJ	-	110	-	26
Fork	88	73	18	13

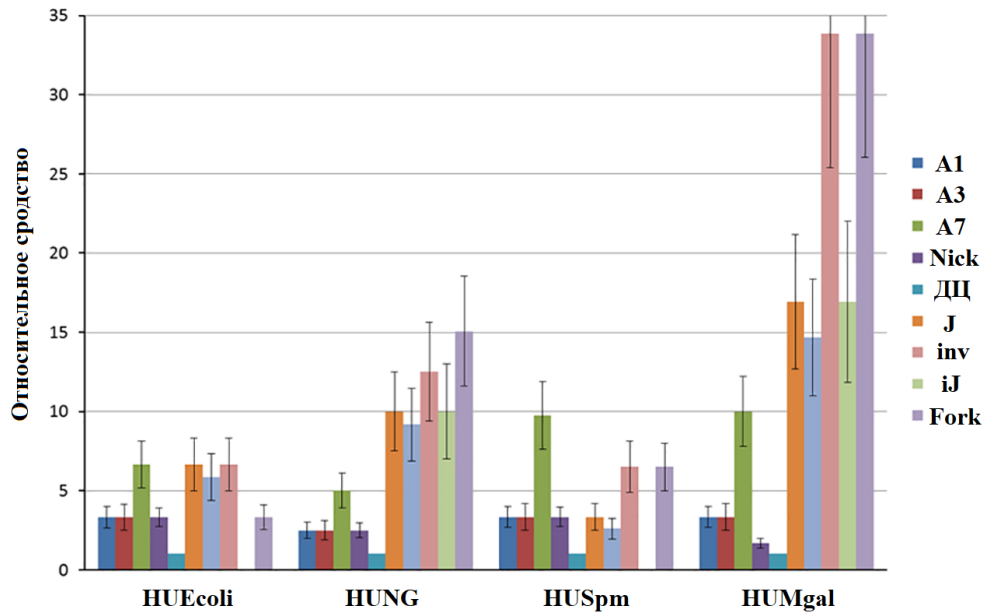


Рисунок 14. Профили аффинности HU белков к различным ДНК–структурам. В каждом столбце представлена константа ассоциации комплекса HU с одной структурой ДНК, нормированная на константу ассоциации комплекса того же белка с дцДНК. Описание структур ДНК смотри в условных обозначениях к рисунку 13.

На рисунке 13 видно, что Nick ДНК образует комплекс с HU *E. coli*, который мигрирует в геле в виде четкой полосы. Напротив, неспецифические комплексы, образованные с правильной дцДНК, приводят к появлению мазка, поскольку комплексы частично диссоциируют при их миграции в полиакриламидном геле (рис. 14). HUEcoli связывается с Nick ДНК, A1 и A3, ДНК, а также с Fork ДНК, в 4 раза сильнее чем с дцДНК. А у A7, J и inv ДНК константа ассоциации увеличивается в 6-7 раз. Полученные данные в целом соответствуют результатам, представленным в литературных источниках.

HUMgal связывает ДНК–структуры похожим образом, однако связывание самых сложных конструкций (J, Fork и inv) проходит в 2.5–5 раз лучше, чем у HUEcoli. Четкие полосы комплекса видны даже в условиях, когда связывание с дцДНК невозможно детектировать (рис. 14). Но в отличие от HUEcoli и HUSpm связывание с Nick ДНК аномально слабое (рис. 15).

Комплексы HUNg обладают самыми низкими константами ассоциации для A1, A7 и Nick ДНК. Но при этом для J, inv, iJ и Fork ДНК они примерно в 1.5–3 раза выше, чем у HUEcoli и HUSpm.

Профиль аффинности у HUSpm сравним с профилем HUEcoli. Но можно отметить увеличение специфичности к A7 и Fork ДНК в 1.5 раза, и такое же снижение к J ДНК.

Таким образом, сравнение ДНК–связывающих свойств четырех представителей HU белков, близко или отдаленно родственных друг другу, показывает, что каждый HU белок имеет свой индивидуальный профиль аффинности к различным ДНК–структурам с повышенной специфичностью к более сложным структурам.

Изначально (до появления кристаллических структур комплексов), эксперименты по изучению связывания HU *E. coli* с канонической правильной дцДНК разной длины использовали для определения размера сайта связывания, который оценивали, следующим образом: насколько должна увеличиться длина ДНК–дуплекса, чтобы к ДНК–белковому комплексу мог присоединиться следующий белок.

В данной работе мы решили повторить такие эксперименты для 4-х HU белков. Для эксперимента использовали набор ДНК-дуплексов длиной от 21 до 36 п.о. Связывание белков HU с канонической правильной дцДНК считается слабым (неспецифическим), такие комплексы легко распадаются при высокой ионной силе. Поэтому электрофоретический анализ ДНК–белковых комплексов проводили при низкой концентрации соли (40 mM NaCl в 50 mM трис–боратном буфере). Результаты экспериментов показаны на рисунке 15.

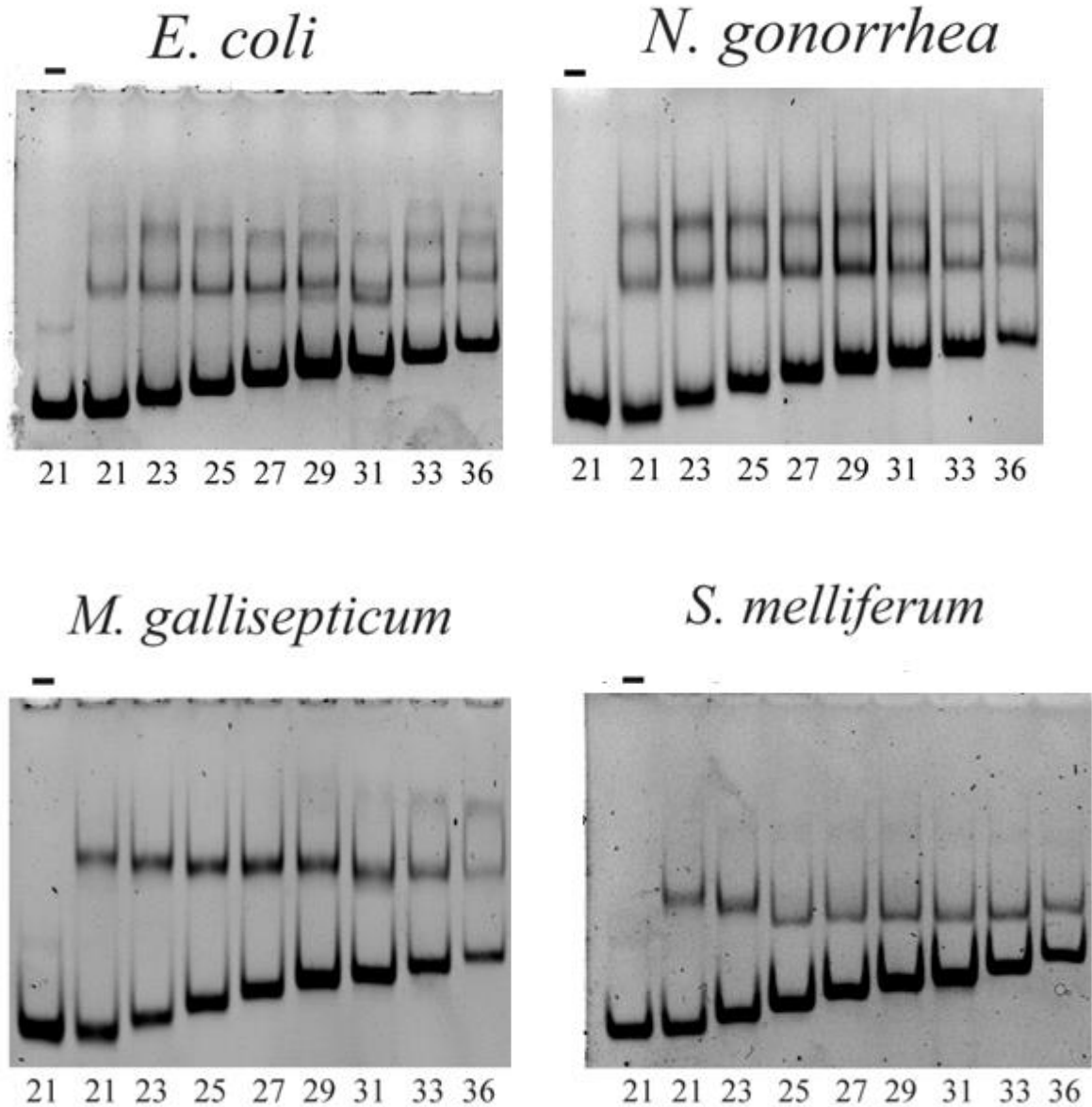


Рисунок 15. Электрофореграммы, демонстрирующие связывания HU белков с дцДНК различной длины. Использовали дцДНК, длина которых варьировалась от 21 до 36 п.о. (подписи снизу). Происхождение и концентрация HU белков указаны сверху.

На рисунке видно, что в случае HUEcoli и HUNg, с ДНК длиной 21 п.о. связывается 2 димера, а третий димер связывается, когда ДНК увеличивается до 29 п.о., т.е. для посадки одного димера требуется длина ДНК 9-10 п.о., что хорошо укладывается в модель связывания, предложенную в работах [99–103]. В то же время, при таком же молярном соотношении белок-ДНК, в случае миколазменных HU белков наблюдается абсолютно другая картина. Для HUSpm связывание даже второго белка практически отсутствовало на всём

диапазоне длин ДНК от 21 до 36 п.о. Для HUNgal очень слабое связывание второго димера наблюдалось в диапазоне длин ДНК 31-36 п.о. Такой результат, скорее всего, указывает на то, что в условиях эксперимента, микоплазменные HU белки связывают ДНК по классическому механизму.

4.3 Пространственная структура HUSpm, полученная методом рентгеноструктурного анализа.

Для структурных исследований был выбран микоплазменный белок HUSpm, так как он содержал явные нарушения классической (консенсусной) последовательности HU белков, характерной для HUEcoli и HUNg (смотри главу 3.3.1). Кристаллизационные эксперименты проводили на базе лаборатории Белковая фабрика НИЦ “Курчатовский институт”, дифракционные данные с полученных кристаллов собирали на станции Белок синхротронного источника «КИСИ–Курчатов». В результате была получена пространственная структура с разрешением 1.36 Å. Структура была депонирована в Protein Data Bank (PDB ID 5L8Z).

Полученная пространственная структура представлена на рисунке 16. HUSpm — это гомодимер, каждый мономер которого состоит из 100 аминокислотных остатков, включая 6 остатков N-концевого гистидинового тага. В мономере можно выделить 2 домена димеризационный домен и ДНК–связывающий домен, ответственный за связывание ДНК.

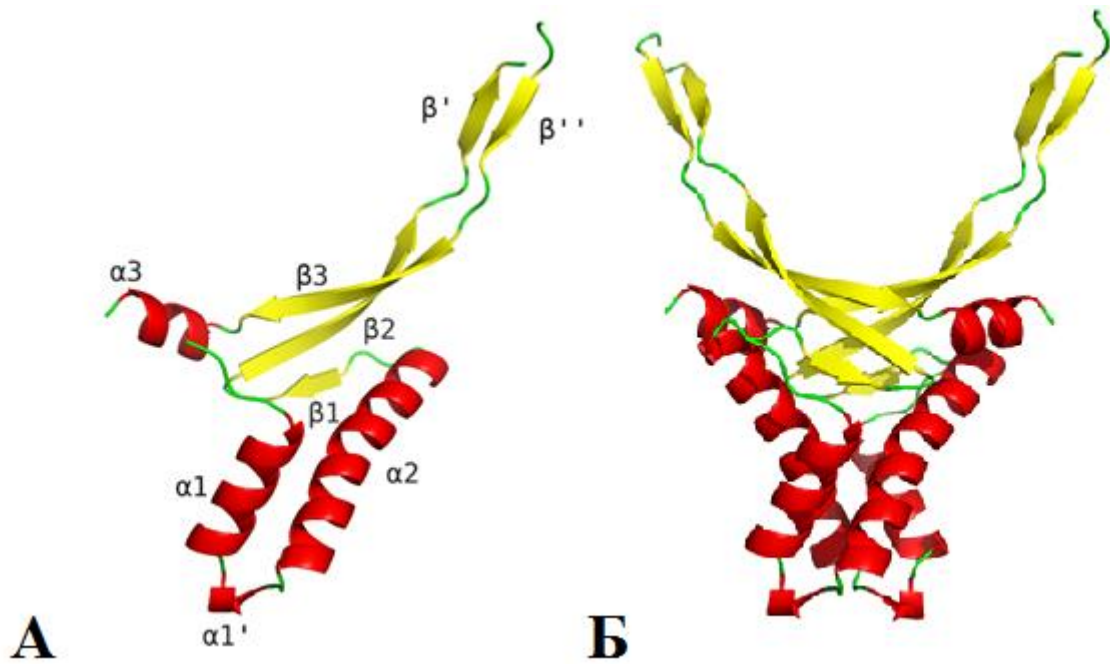


Рисунок 16. Мономер и димер HUSpm. Цветовая схема соответствует элементам вторичной структуры: красным показаны α -спирали, синим – β -слои.

Димеризационный домен HUSpm состоит из двух α -спиралей: $\alpha 1$ (остатки 3–13) и $\alpha 2$ (остатки 20–40), соединенных гибкой петлей (остатки 14–19), содержащей небольшую дополнительную спираль – $\alpha 1'$ (остатки 15–17). ДНК-связывающий домен состоит из трех антипараллельных β -слоев: $\beta 1$ (остатки 44–46), $\beta 2$ (остатки 50–58) и $\beta 3$ (остатки 76–83), формирующих центральную платформу и протяженной «руки», содержащей два антипараллельных β -слоя: β' (остатки 60–63) и β'' (остатки 70–73), а также С-концевой $\alpha 3$ -спирали (85–92).

Несмотря на то, что структура мономера HUSpm характеризуется канонической укладкой полипептидной цепи, свойственной белкам этого класса, в его структуре есть ряд отличий. Обычно димеризационный домен состоит всего из двух α -спиралей ($\alpha 1$ и $\alpha 2$), соединенных гибкой петлей из нескольких аминокислотных остатков. В случае HUSpm в этом домене за счет вставки из двух аминокислотных остатков появляется дополнительная спираль – $\alpha 1'$. Наличие этой спирали способствует выпячиванию петли, на которой она расположена, и формированию дополнительного гидрофобного контакта между мономерами. В формировании этого контакта участвуют

неконсервативные остатки Phe14 и Val17, а также остаток Leu18 каждого из мономеров.

4.3.1 Особенности границы между мономерами в димере HUSpm.

Так как функциональной единицей любого HU белка является димер, мы проанализировали интерфейс между мономерами в димере HUSpm и сравнили его с интерфейсами других HU белков, обладающие разной термостабильностью (табл. 10). Анализ площади димерного интерфейса показывает, что в случае HUSpm абсолютное значение данного показателя самое высокое, однако в процентном соотношении эти значения для всех белков примерно одинаковы. Количество аминокислотных остатков в интерфейсе (в том числе гидрофобных) для всех белков также сравнимы друг с другом. В то же время, прочность гидрофобных взаимодействий, оцениваемая по выигрышу в энергии сольватации при формировании димера, у HUSpm выше, чем у остальных HU белков. Из этого следует, что различие в прочности гидрофобных взаимодействий димеров HU белков определяется не количеством гидрофобных остатков, а их размером и взаимным расположением, что демонстрирует рисунок 17, на котором показано выравнивание аминокислотных последовательностей HUSpm и других представителей HU белков с известными кристаллическими структурами и отмечены аминокислоты, участвующие в формировании контактов между мономерами в димере. Кроме того, в димерном интерфейсе HUSpm отсутствуют солевые мостики, и присутствует увеличенное количество водородных связей (табл. 10 и рис. 17).

Таблица 10. Сравнение димерных контактов в HUSpm и в HU белках из мезофильных и термофильных бактерий, для которых известна пространственная структура.

		Площадь димерного контакта Å ² (%)	Водородные связи (3.5Å)	Солевые мостики и (4.0Å)	Число остатков в димерном контакте (гидрофобные)	ΔG, ккал/моль (учитываются гидрофобные)

						контакты)
1	<i>S. melliferum</i>	2267.0 (30.2)	14	0	52 (35)	-44,3
2	<i>E. coli</i> ¹	1773.3 (32.7)	5	6	46 (38)	-35,2
3	<i>T. maritima</i>	1868.9 (33.4)	7	5	47 (32)	-40.1
4	<i>B. stearothermo philus</i>	1778.4 (27.8)	6	4	44 (33)	-41.4

¹Для НУ белка из *E. coli* показаны данные для гетеродимера. Количество водородных связей, солевых мостиков и гидрофобных остатков в димерном интерфейсе посчитано вручную. Красным показаны названия термофильных организмов-источников НУ белков, синим – мезофильных.

Анализ аминокислотной последовательности показал, что HUSpm имеет 6 остатков фенилаланина, в то время как остальные HU белки – от трех до четырех. При этом все остатки фенилаланина у HU белков принимают участие в формировании гидрофобного кора димерного интерфейса. HUSpm имеет два неконсервативных остатка фенилаланина – Phe14, о котором было написано ранее, и Phe29. У структурно охарактеризованных HU белков в этих положениях находятся остатки с короткой боковой группой (не всегда гидрофобные). При этом для HUBs показано, что Ala27, находящийся в положении, аналогичном Phe29 у HUSpm, играет важную роль в повышении термостабильности белка за счет более плотной упаковки гидрофобного кора димерного интерфейса, а замена этого остатка на серин снижает термостабильность белка на 5 градусов [54]. В случае HUSpm оба остатка фенилаланина расположены в районе гидрофобного ядра димерного интерфейса (рис. 18). Более того остаток Phe14 из одного мономера расположен рядом с остатком Phe29 другого мономера (рис. 18), что способствуют упрочнению гидрофобного контакта, за счёт образования ароматического кластера стекнинг взаимодействий.

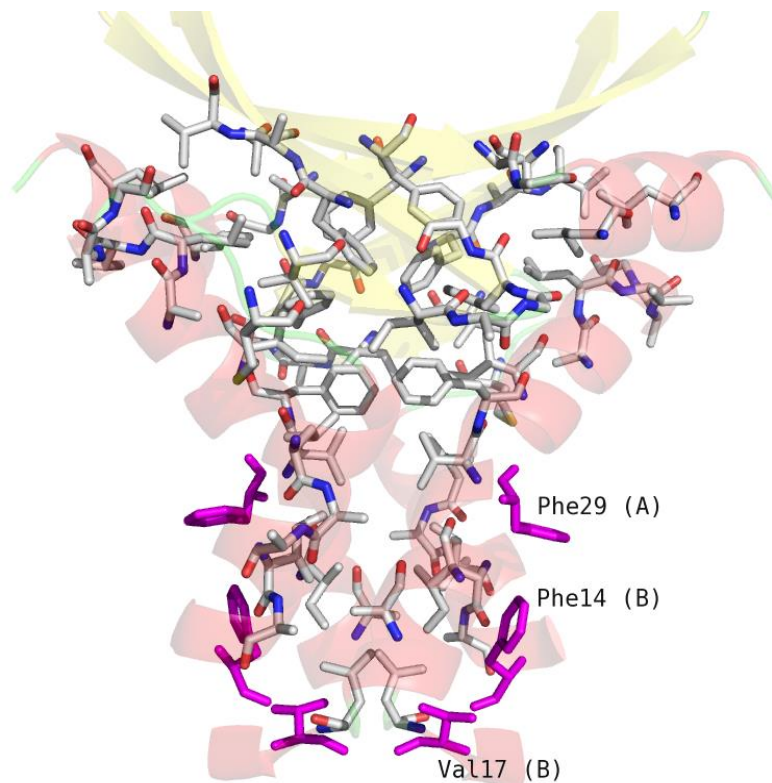


Рисунок 18. Ароматический кластер в димерном интерфейсе HUSpm. Серыми палочками показаны остатки, формирующие гидрофобный кор у димера HUSpm. Неконсервативные остатки Phe14, Phe29 и Val17 из обоих мономеров показаны розовым.

Интересной особенностью димеров ряда HU белков является внутренняя полость размером порядка 100\AA^3 , расположенная в гидрофобном ядре границы между мономерами. Так, подобная полость обнаружена в димерах HU белков из цианобактерии *Anabaena* PCC7120 и *T. maritima*, но отсутствует в HUbs (рис. 19). В случае HUSpm данная полость также отсутствует, что связано с аминокислотной заменой в положении 31. У HUSpm, как и у HUbs в этом положении находится остаток фенилаланина, в то время как у HU из *Anabaena* PCC7120 и *T. maritima* в этом положении находится лейцин (рис. 18), боковая группа которого имеет меньший размер. Интересно отметить, что в структуре Hbb также имеется остаток фенилаланина в положении аналогичном положению Phe31 у HUSpm. Однако в случае Hbb боковая цепь этого остатка смещена из центра димера на 2.8\AA (расстояние между CZ атомами) относительно положений фенилаланина в структурах *S. melliferum* и *B. stearothermophilus*, что приводит к наличию полости у Hbb. Роль этой полости неясна. Однако ее отсутствие в димерном интерфейсе может способствовать упрочнения гидрофобного интерфейса у HUSpm за счет более тесного контакта мономеров в димере.

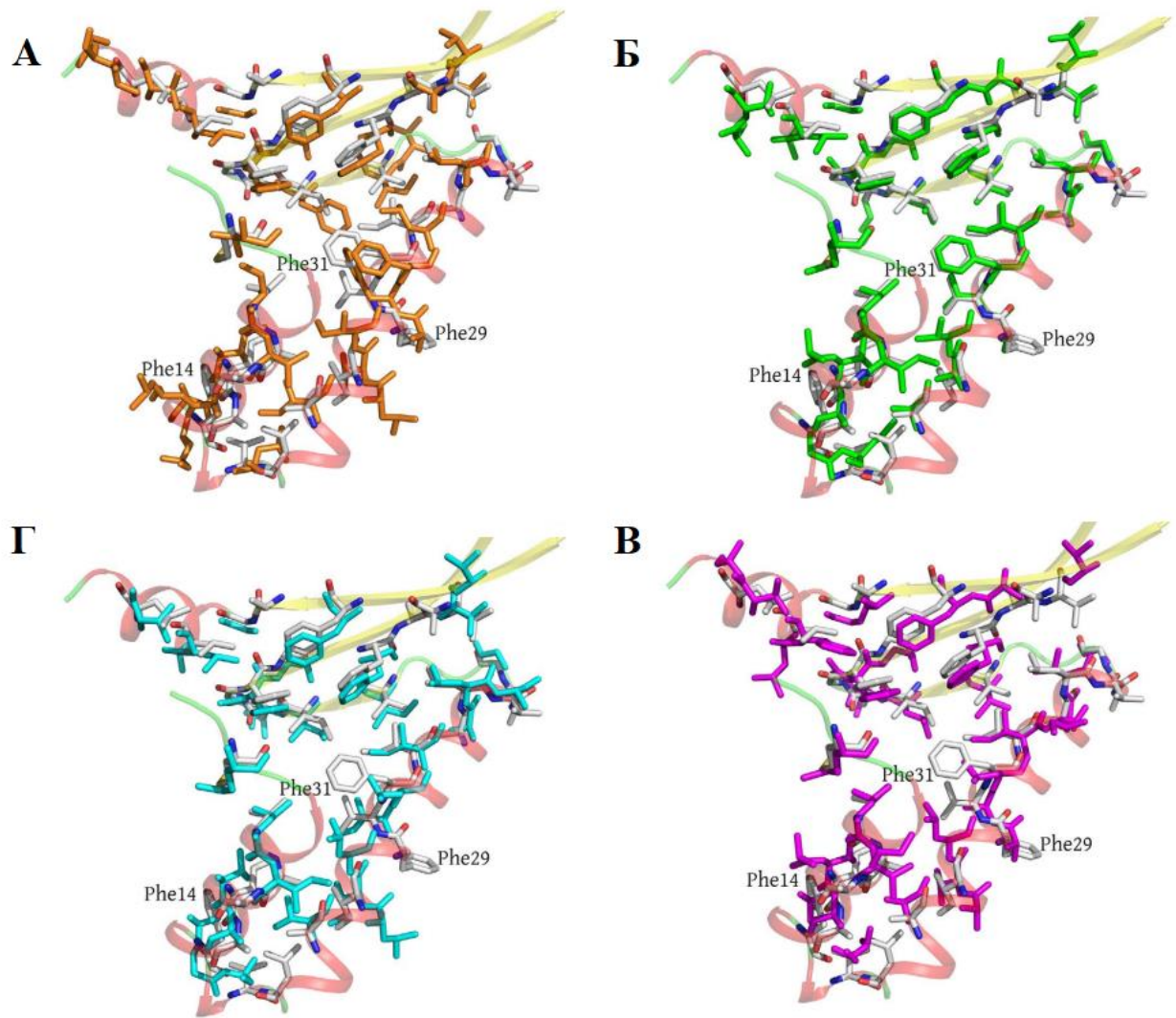


Рисунок 19. Наличие или отсутствие полости в димерном интерфейсе HU белков. Представлено наложение структур. Показаны гидрофобные остатки, формирующие гидрофобный кор интерфейса между мономерами в димере HUSpm (серый) и Hbb (показан оранжевым (А)), HUbs (показан зеленым (Б)), HUtm (показан голубым (В)) и HUA (показан розовым (Г)). Элементы вторичной структуры HUSpm показаны полупрозрачно. Ориентация мономеров и цветовая схема аналогична рисунку 18.

Таким образом, граница между мономерами в димере HUSpm обладает следующими особенностями: неконсервативный ароматический кластер, включающий неконсервативные остатки фенилаланина и остаток валина из дополнительной α -спирали, полуконсервативный остаток фенилаланина, заполняющий внутреннюю полость в димерном интерфейсе, а также дополнительные водородные связи между мономерами, отсутствующие у гомологичных HU белков.

4.3.2 Структурные детерминанты термостабильности HUSpm.

Как уже было сказано, HU белки являются классическим объектом изучения структурных детерминант термостабильности. Ранее было показано, что именно солевые мостики между двумя мономерами в димере отвечают за повышенную термостабильность HUBs и HUtm [52,54]; в то же время во всех работах по изучению термальной денатурации HU белков отмечалось, что гидрофобные взаимодействия играют важную роль в стабилизации димеров. Поэтому было решено проверить, какое влияние оказывает необычная граница между мономерами в димере HUSpm на термостабильность белка. (рис. 20).

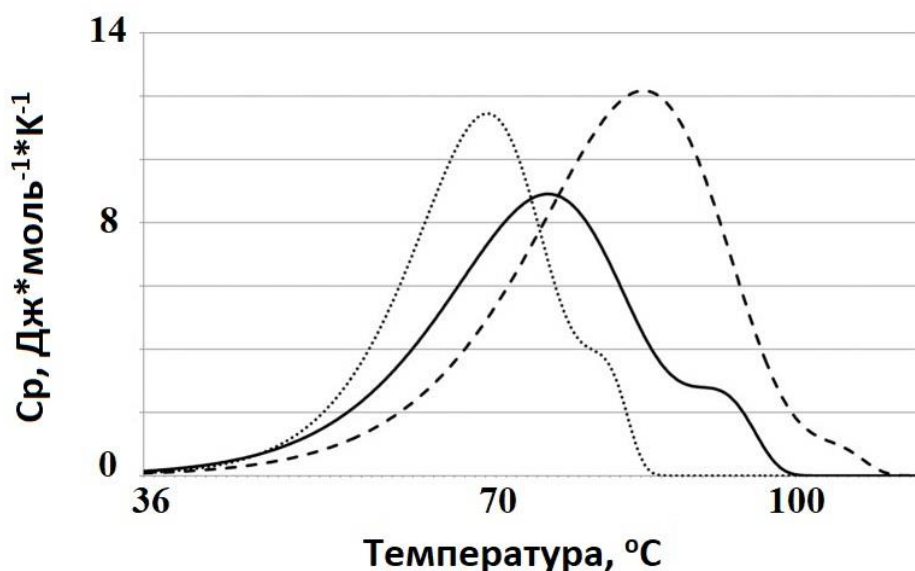


Рисунок 20. Зависимость избыточной теплоемкости денатурации от температуры, измеренная методом ДСК для HUSpm. Графики представлены сплошной линией для белка в концентрации 4,5 мг/мл в 0,2 М NaCl, пунктирной линией для белка в концентрации 4,5 мг/мл в 1 М NaCl и точечной линией для белка в концентрации 1 мг/мл в 0,2 М NaCl.

Термальная денатурация HUSpm была исследована с помощью ДСК для белковых препаратов с разной концентрацией белка и в условиях разной ионной силы. Анализ кривой плавления показал наличие двух тепловых переходов, имеющих максимумы ($T_{\text{плавл}}$) при 74,5 и 87,3°C (концентрация белка 4,5 мг/мл в 0,2 М NaCl), что свидетельствовало о высокой термостабильности.

Исследование влияния концентрации соли на процесс денатурации показало, что увеличение концентрации NaCl до 1М сдвигает пики денатурации в область более высоких температур – 84.8 и 103.3°C (рис. 20), что согласуется с данными, полученными ранее для других белков данного класса, и свидетельствует о вкладе гидрофобных взаимодействия в термальную стабильность димера.

Основываясь на анализе границы раздела между мономерами в димере HUSpm, описанном выше, было предположено, что структурными детерминантами, отвечающим за высокую термостабильность HUSpm, могли быть дополнительные гидрофобные контакты, связанные с неконсервативными остатками фенилаланина в интерфейсе, а также дополнительные водородные связи между мономерами, отсутствующие у гомологичных HU белков.

Чтобы оценить влияние вышеуказанных остатков на термостабильность HUSpm, был получен и протестирован ряд точечных мутантов (табл. 11). Все мутанты образовывали стабильные димеры, что было подтверждено методом гель-фильтрации.

Таблица 11. Влияние мутаций на температуру плавления HUSpm, измеренную с помощью ДСК, в следующих экспериментальных условиях: 2,0 мг/мл белка и 0,2 М NaCl.

Мутация	HUSpm	F14A	F29A	V17T	F31L	K35T	N92K	F14A – F29A
T _{плав} , °C	74.5, 87.3	63.0	45.2, 59.2	74.2	64.2	49.7, 77.1	70.7	47.0

Тепловую денатурацию HUSpm и всех мутантов изучали с помощью ДСК при концентрации белка 2,0 мг/мл в 10 mM натрий-фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 0,2 М NaCl. Результаты ДСК для всех шести мутантов и HUSpm (контроль) показаны в таблице 11 и на рисунке 21.

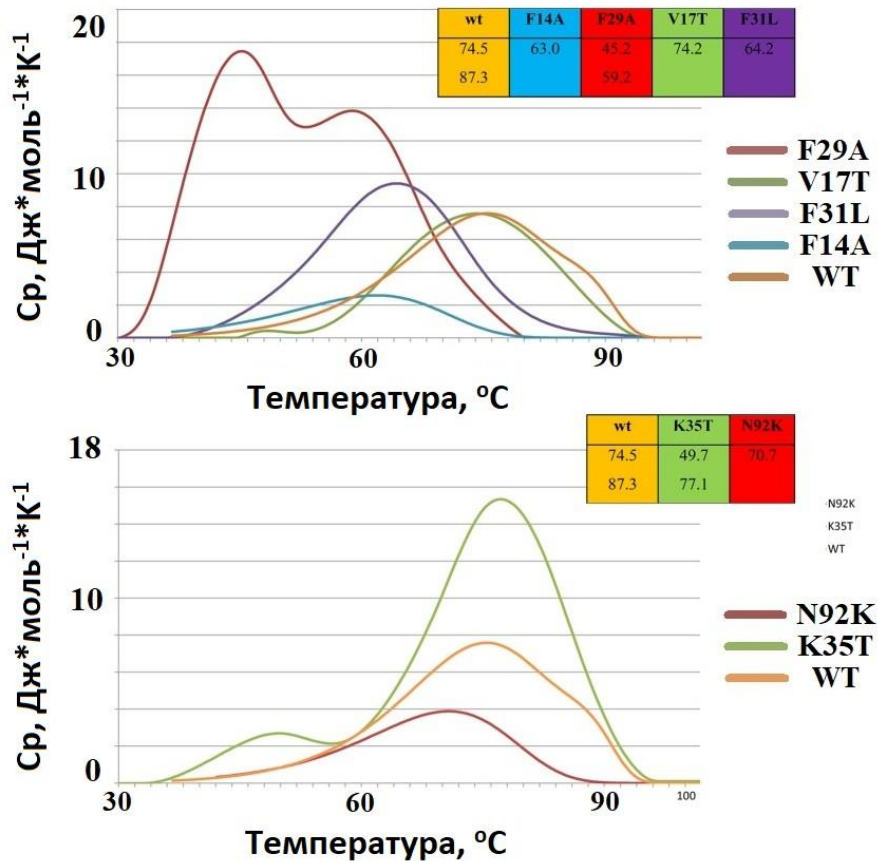


Рисунок 21. Температурная зависимость избыточной теплоемкости денатурации, измеренная с помощью ДСК для HUSpm дикого типа и его точечных мутантов. Во всех случаях концентрация белка составляет 2,0 мг / мл, а концентрация NaCl составляет 0,2 М. Температуры пиков плавления показаны в соответствующих вставках. А. Влияние мутаций неконсервативных или полуконсервативных ароматических и гидрофобных остатков димерного интерфейса. Б. Влияние мутаций неконсервативных остатков, участвующих в водородных связях.

Как следует из таблицы 10, мутации приводили к таким изменениям, как сдвиги пиков денатурации на кривых плавления и, в некоторых случаях, к исчезновению одного из них. Это исчезновение можно объяснить тем, что два близко расположенных пика наложались друг на друга.

Аланиновые замены неконсервативных и полуконсервативных остатков фенилаланина (Phe14, Phe29 и Phe31) вызвали снижение температуры плавления, максимальный эффект имела мутация F29A, при которой сдвиг $T_{\text{плав}}$ составлял 29 и 27°C для низко- и высокотемпературного пиков соответственно. В случае мутации F14A на кривой денатурации наблюдался

только один пик плавления с понижением $T_{\text{плав}}$ на 11°C . Аналогичный эффект наблюдался при мутации F31A. Мутация V17T оказала лишь небольшое влияние на термостабильность белка (рис. 21, табл. 11).

Мутации двух неконсервативных остатков, Asn92 и Lys35, которые участвуют в образовании уникальных водородных связей Lys35–Gly48 и Asn92–Lys77 между мономерами HUSpm, также вызывали снижение температуры плавления. Мутация K35T вызывала сдвиги температуры плавления примерно на 24°C и 10°C . На кривой денатурации для мутанта D92K один пик наблюдался при температуре примерно на 4°C ниже, чем первый пик на кривой денатурации HUSpm дикого типа (рис. 21, табл. 11).

Таким образом, структурный анализ белка в сочетании с мутагенезом и ДСК выявил ключевые структурные детерминанты, ответственные за высокую термостабильность HUSpm, к которым можно отнести неконсервативные остатки Phe14 и Phe29, которые способствуют усилению гидрофобного ядра димерного интерфейса, полуконсервативный Phe31, который отвечает за отсутствие внутренней полости на границе между мономерами в димере, и остаток Lys35, который участвует в образовании уникальной водородной связи между мономерами. В HU белках из термофильных бактерий термостабильность определяется другими детерминантами [158], что указывает на то, что HU белки могут иметь различные механизмы повышения термостабильности.

4.4 Бисфенольные производные флуорена ингибируют ДНК–связывающую способность HU белков и рост микоплазмы в культуре.

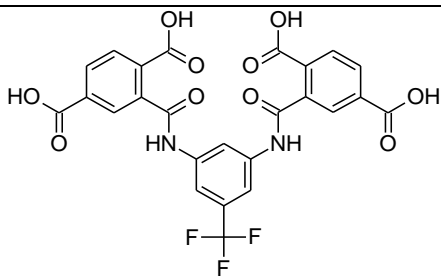
4.4.1 Поиск низкомолекулярных ингибиторов HU белков.

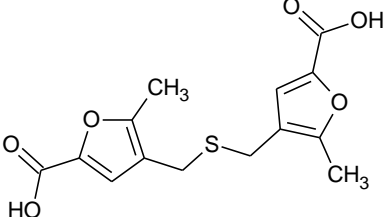
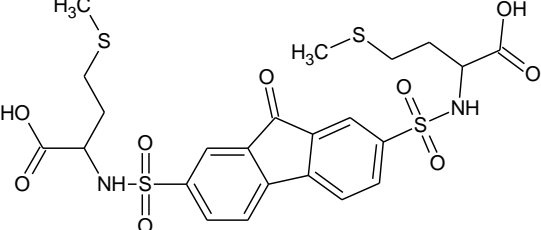
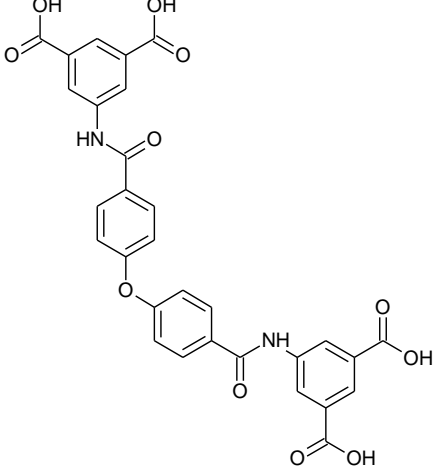
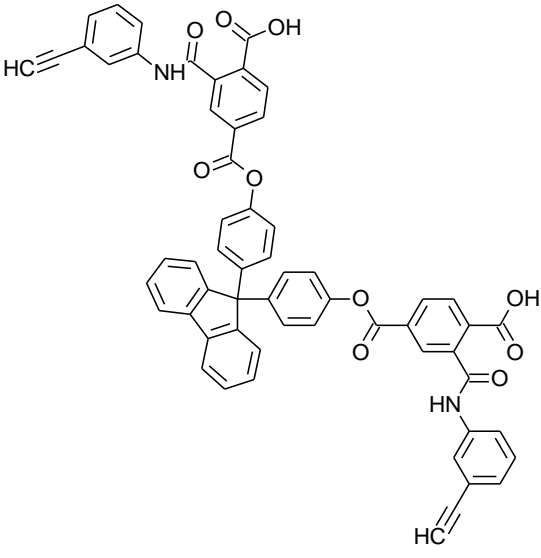
Был проведен виртуальный скрининг химической библиотеки Vitas–M laboratories (<http://www.vitasmlab.com/>) с целью поиска низкомолекулярных ингибиторов HU белков. В качестве мишени для проведения скрининга использовали полученную кристаллическую структуру HUSpm. В качестве

потенциального сайта связывания сначала была выбрана центральная часть ДНК–связывающего домена. На последующих этапах проводили дополнительные молекулярные докинги и молекулярно–динамические исследования (МД) потенциальных комплексов, а также докинг отобранных соединений со всей поверхности белка. Процедуры скрининга библиотеки и молекулярного докинга проводили в коллаборации с ООО "Молтех" используя разработанные в компании программные продукты. Молекулярный докинг проводили с помощью программы Lead Finder [159], используя упомянутую ранее библиотеку Vitas–M laboratories. Структурную фильтрацию результатов проводили с помощью программы dock_filter [160], а визуализацию результатов моделирования – в программе VMD [161].

Отобранные по результатам первого этапа скрининга, потенциальные ингибиторы были получены от компании Vitas M laboratories и проверены на способность ингибировать ДНК–связывающие свойства HUSpm. Эксперимент проводили методом EMSA с использованием HUSpm и олигонуклеотидных дуплексов длиной 24 или 48 п.о. Первоначально использовали соединения в концентрации 100 мкМ (рис.22), затем, для активных соединений определяли IC₅₀ (табл.12).

Таблица 12. Список потенциальных ингибиторов, идентифицированных в химической библиотеке лаборатории «Vitas–M» (<https://vitasmlab.biz/>) методом виртуального скрининга.

	Молекулярная структура	Молекулярная формула Пользовательский идентификатор	IC ₅₀ ¹
1		C ₂₅ H ₁₅ F ₃ N ₂ O ₁₀ STK367007	Нет ингибирования до 100 мкМ

2		$C_{14}H_{14}O_6S$ STK733528	Нет ингибирования до 100 мкМ
3		$C_{23}H_{26}N_2O_9S_4$ STL059355	Нет ингибирования до 100 мкМ
4		$C_{30}H_{20}N_2O_{11}$ STK156645	Нет ингибирования до 100 мкМ
5		$C_{59}H_{36}N_2O_{10}$ STK296333	6.5 ± 0.9 мкМ

¹полумаксимальная ингибирующая концентрация образования комплекса HUSpm–ДНК, определенная с помощью EMSA, проведенного с ДНК–дуплексами дц24 (среднее значение ± стандартное отклонение, n=3).

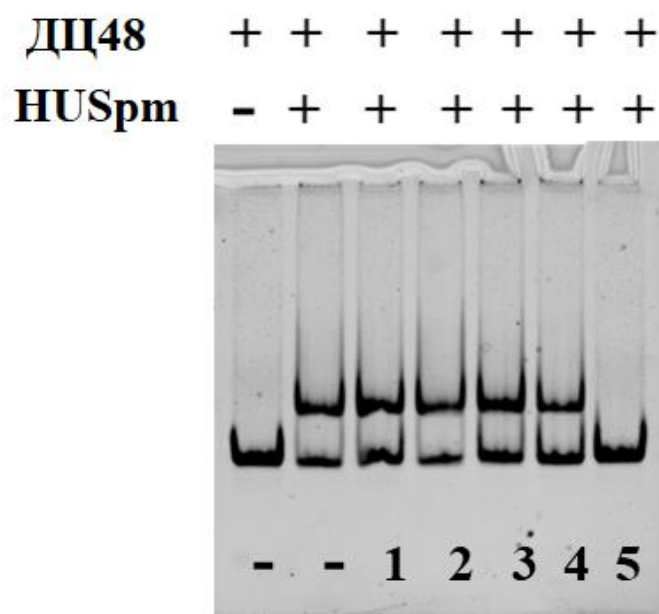


Рисунок 22. Влияние соединений 1–5 на образование комплекса HUSpm–ДНК. В присутствии соединения 5 комплекс не образуется. Номера соединений соответствуют таблице 12.

Наилучшие результаты были получены с соединением, относящимся к классу бисфенольных производных флуорена (БПФ) (табл.12), поэтому было решено дополнительно получить и исследовать 2 аналога исходно–найденного соединения (табл. 13).

Таблица 13. Описание исследуемых бисфенольных производных флуорена.

Название	Молекулярная структура	Молекулярная формула (молекулярная масса)
БПФ1		$C_{43}H_{26}O_{12}$ (734)

БПФ2		$C_{57}H_{40}N_2O_{10}$ (912)
БПФ3		$C_{41}H_{26}O_8$ (646)

4.4.2 Влияние БФП на ДНК–связывающие свойства НУ белков и рост микоплазмы в культуре.

Соединения, представленные в таблице 13, были проверены на способность ингибировать ДНК–связывающие свойства трёх НУ белков: НУSpn, НУMgal, НУEcoli.

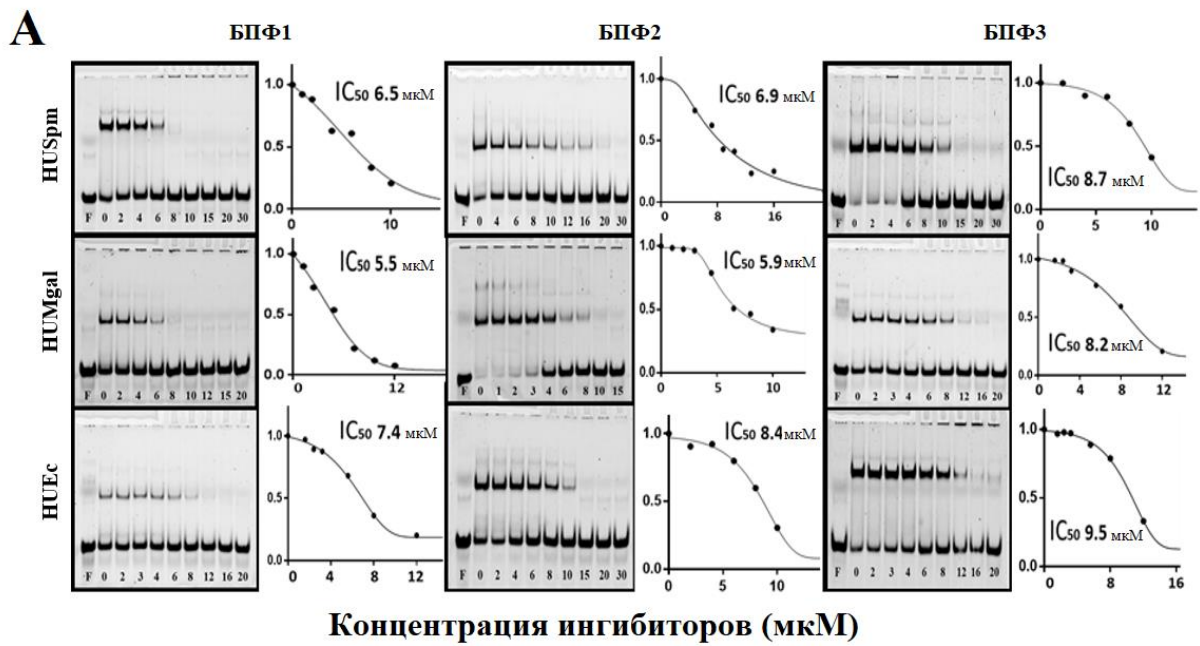
Анализ активности соединений проводили с помощью метода изменения подвижности ДНК в геле с использованием флуоресцентно–меченной дцДНК длиной 24 п.о. Чтобы оценить влияние трех БПФ на ДНК–связывающие способности НУ–белков, возрастающие концентрации ингибиторов добавляли к предварительно полученным комплексам ДНК–белок, потом проводили электрофорез и рассчитывали IC_{50} – концентрацию полумаксимального ингибирования.

Все соединения проявили ингибирующую активность в отношении всех белков–мишеней со значениями IC_{50} в микромолярных диапазонах (<10 мкМ) (табл. 14, рис. 23А). Во всех случаях наблюдаемый порядок соединений по эффективности ингибирования был постоянным: БПФ1 > БПФ2 > БПФ3.

Разница между БПФ1 и БПФ2 не была значительной, в то время как БПФ3 показал несколько более высокие значения IC_{50} .

Таблица 14. Концентрация полумаксимального ингибирования комплекса НУ белок–ДНК с бисфенольными производными флуорена.

Соединения	БПФ1	БПФ2	БПФ3
НУ белок	IC_{50} , мкМ (среднее значение \pm стандартное отклонение, n = 3)		
HUSpm	5.6 ± 0.8	6.3 ± 0.7	8.2 ± 1.1
HUMgal	5.0 ± 0.6	5.9 ± 0.8	8.1 ± 1.0
HUEcoli	7.5 ± 1.0	7.5 ± 0.9	10 ± 1.3



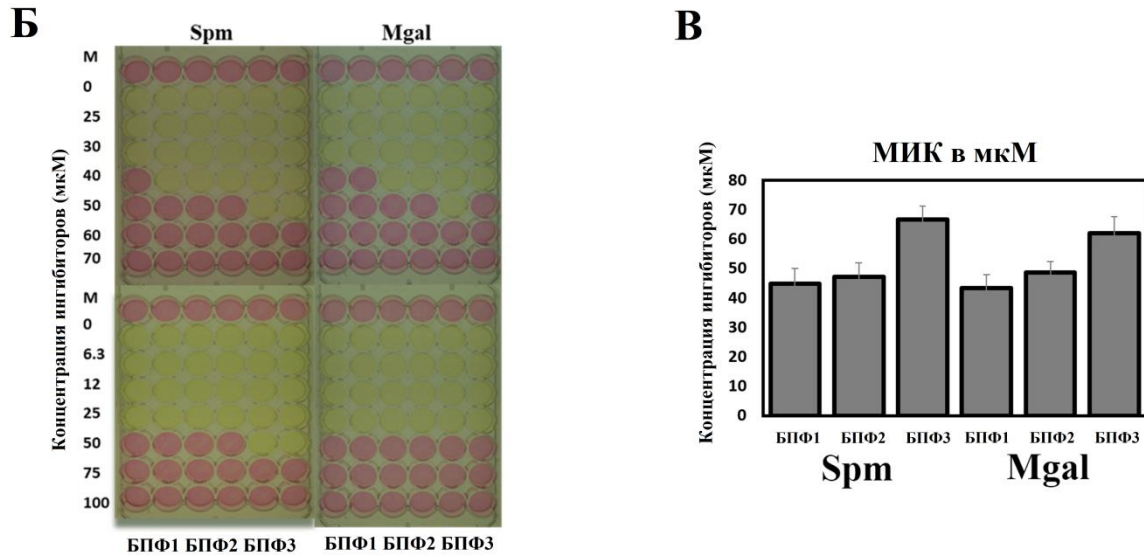


Рисунок 23. Влияние трёх БФП на ДНК связывающие способности HU белков и на рост микоплазмы в культуре. **А.** Ингибирование ДНК связывания HUSpm, HUMgal и HUEcoli, определенное методом EMSA с использованием дуплекса ДЦ24. **Б.** Влияние БФП1, БФП2 и БФП3 на рост клеток *M. gallisepticum* и *S. melliferum* в культуре, определённое методом минимальной ингибирующей концентрации (МИК). Желтый цвет указывает на рост бактерий, розовый — на отсутствие роста. **В.** Графическое представление объединенных результатов трех независимых определений МИК.

Поскольку известно, что HU белки необходимы для жизнеспособности клеток микоплазмы [162,163], было решено оценить влияние ингибиторов на рост *M. gallisepticum* и *S. melliferum* в культуре. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) БФП1, БФП2 и БФП3 для соответствующих микоплазм определяли в тесте микроразведений в бульоне [164]. Рост метаболизирующих организмов вызывает изменение рН среды, что приводит к видимому изменению цвета из-за присутствия в среде фенолового красного. При подавлении роста бактерий изменения окраски не наблюдается. МИК представляет собой наименьшую концентрацию ингибитора, которая предотвращает изменение цвета, в то время как в контрольных (необработанных) образцах происходит изменение цвета. Было обнаружено, что МИК находится в диапазоне от 40 до 70 мкМ (рис. 23Б). БФП3 имел

наихудшую МИК по сравнению с БФП1 или БФП2, чьи МИК существенно не отличались друг от друга (рис. 23В).

Таким образом, было установлено, что БПФ ингибируют ДНК–связывающую способность HU белков с IC_{50} в диапазоне 5–10 мкМ, а также рост микоплазмы в культуре. При этом влияние на рост клеток *E. coli* обнаружено не было, что можно объяснить компенсаторной ролью других NAR у данной бактерии.

4.4.3 Уточнение сайта связывания БПФ методом сайт–специфического мутагенеза.

Как говорилось ранее, для отбора низкомолекулярных ингибиторов проводили молекулярные докинги и молекулярно–динамические исследования потенциальных комплексов. При этом мы использовали предположение, что ингибитор связывается с белком в центральной части ДНК–связывающего домена. Наиболее энергетически выгодные варианты связывания ингибитора БПФ1 с HUSpm представлены на рисунке 24. Наиболее интересный вариант связывания представлен на рисунке 24Б. Мы видим, что флуореновое кольцо ингибитора располагается между боковыми цепями остатков K82 и K80 одного мономера, образуя пи–катионные взаимодействия, а две карбоксильные группы образуют многочисленные полярные контакты с боковыми цепями основных и полярных остатков двух ДНК–связывающих доменов: R57, R60, S78 и K88.

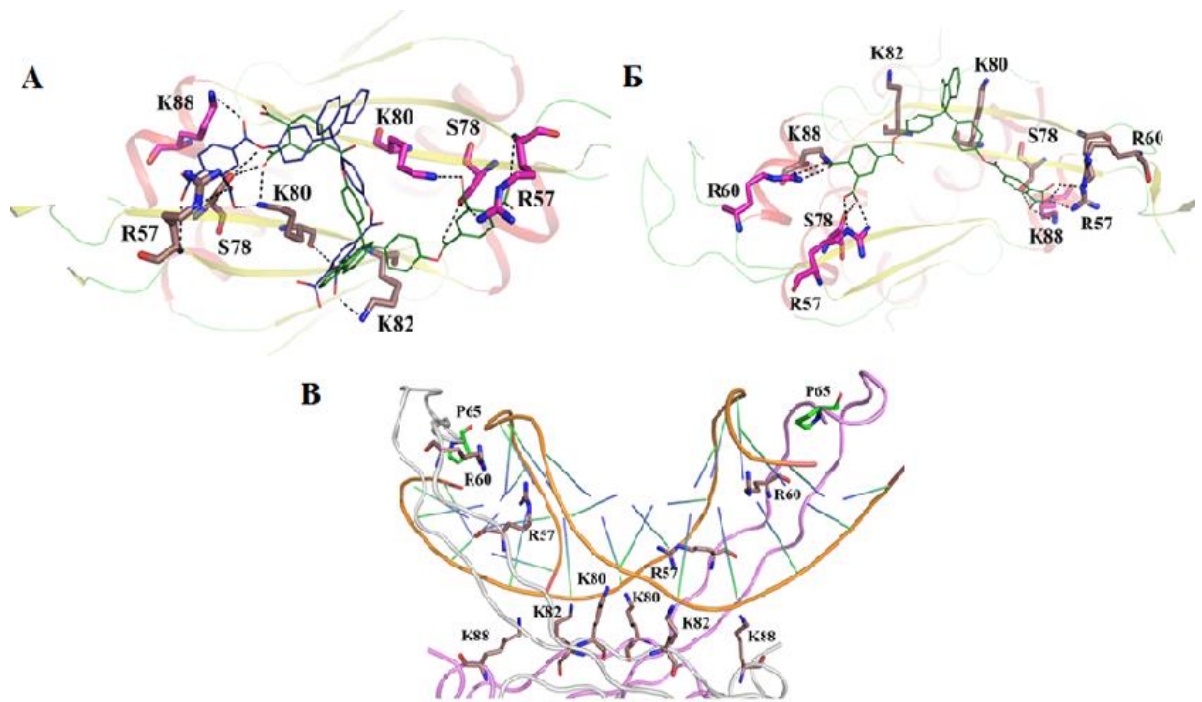


Рисунок 24. А и Б. Модели связывания БПФ1 с центральной частью ДНК–связывающего домена HUSpm и полярные взаимодействия с белком в потенциальных сайтах связывания. Остатки различных мономеров имеют пурпурный и бежевый цвета соответственно. В. Модель взаимодействия HUSpm с дуплексом дц14, полученная с помощью МД симуляции (продолжительностью 1000 нс) соответствующего комплекса, полученного моделированием по гомологии, показана для сравнения. Два мономера показаны серыми и пурпурными линиями. Положительно–заряженные остатки обоих мономеров, боковые цепи которых взаимодействуют с ДНК, показаны бежевыми палочками; Pro65, интеркалирующий в малую бороздку ДНК, отмечен зеленым цветом.

Чтобы подтвердить найденный докинг-ом сайт связывания БПФ в центральной части ДНК–связывающего домена, были получены мутантные производные HUSpm, содержащие аланиновые замены положительно–заряженных остатков R57A, K80A, R88A. По данным моделирования эти остатки принимали участие, как в связывании ДНК, так и в связывании ингибитора (рис. 24). Был выполнен сайт–направленный мутагенез, получены рекомбинантные белки и методом торможения ДНК в геле проверены их ДНК–связывающие способности (рис. 25, табл. 15).

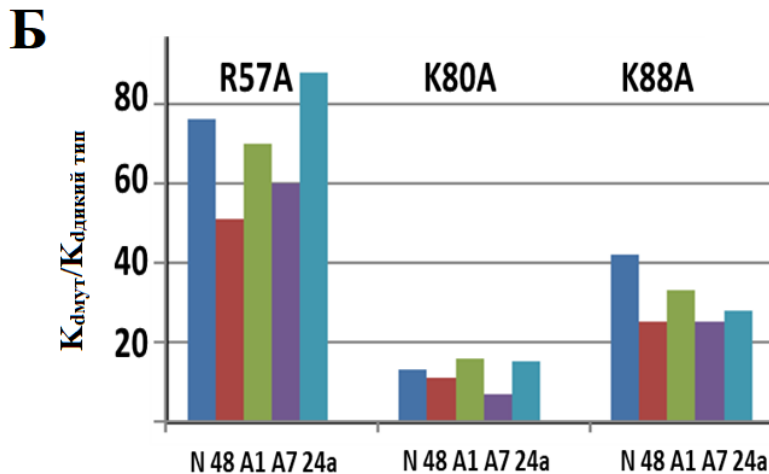
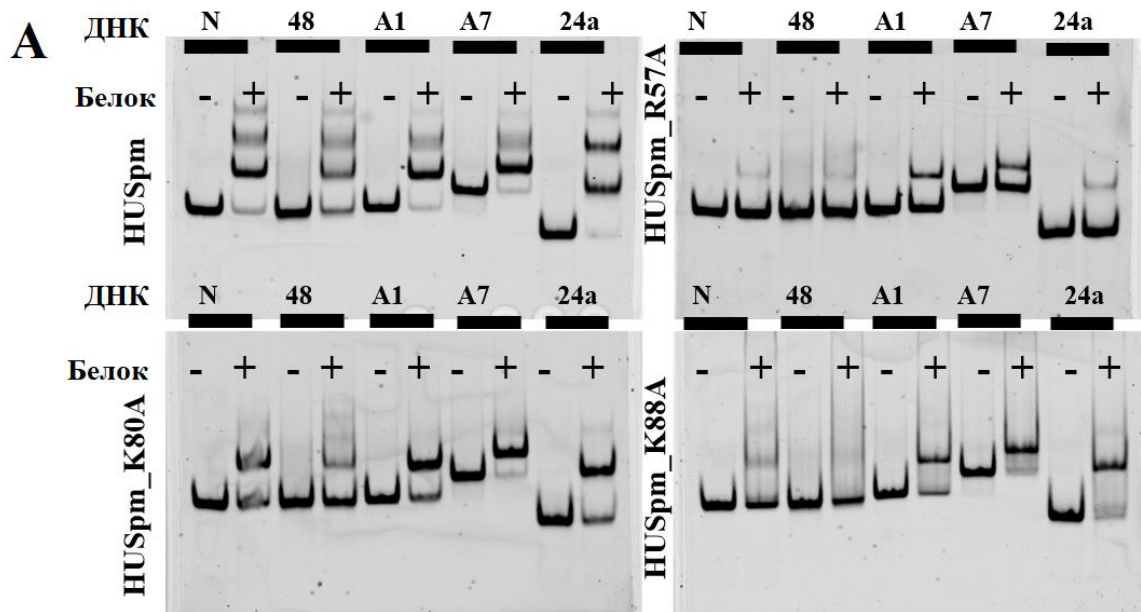


Рисунок 25. Влияние аланиновых замен положительно-заряженных остатков в сайте ДНК связывания на ДНК-связывающие свойства HUSpm A. Результаты EMSA. Используемые ДНК-дуплексы обозначены в верхней части геля: N – ДНК с разрывом; 48 – дц48; A1, дц24a и A7 – дуплексы разной длины, содержащие один или семь неспаренных остатков аденина в одной цепи. **Б.** Константы диссоциации соответствующих комплексов, нормализованные к константам диссоциации комплексов, образованных HUSpm дикого типа.

Таблица 15. Константы диссоциации (K_d) в нМ (среднее значение \pm стандартное отклонение, $n = 2$) для комплексов HUSpm дикого типа и его мутантов с различными ДНК, рассчитанные из экспериментов EMSA.

ДНК	HUSpm	HUSpm_R57A	HUSpm_K80A	HUSpm_K88A
Nick (N)	5.2 \pm 1.1	398 \pm 45	69 \pm 20	220 \pm 40

дц48 (48)	74.4±4.8	2364±100	652±27	1560±55
A1 ДНК (A1)	2.5±0.6	175±25	41±8	83±15
A7 ДНК(A7)	2.0±0.5	121±15	13±3	51±8
дц24а (24а)	2.6±0.6	230±30	40±10	84±20

Мутантные белки использовали в концентрациях 100 нМ для HUSpm_K80A и HUSpm_K88A, и 200 мМ для HUSpm_R57A. HUSpm (50 нМ) и его мутантные варианты в указанных выше концентрациях смешивали с 5'-меченой ДНК в буфере, содержащем 150 мМ NaCl; комплексы разделяли в полиакриламидном геле в не денатурирующих условиях

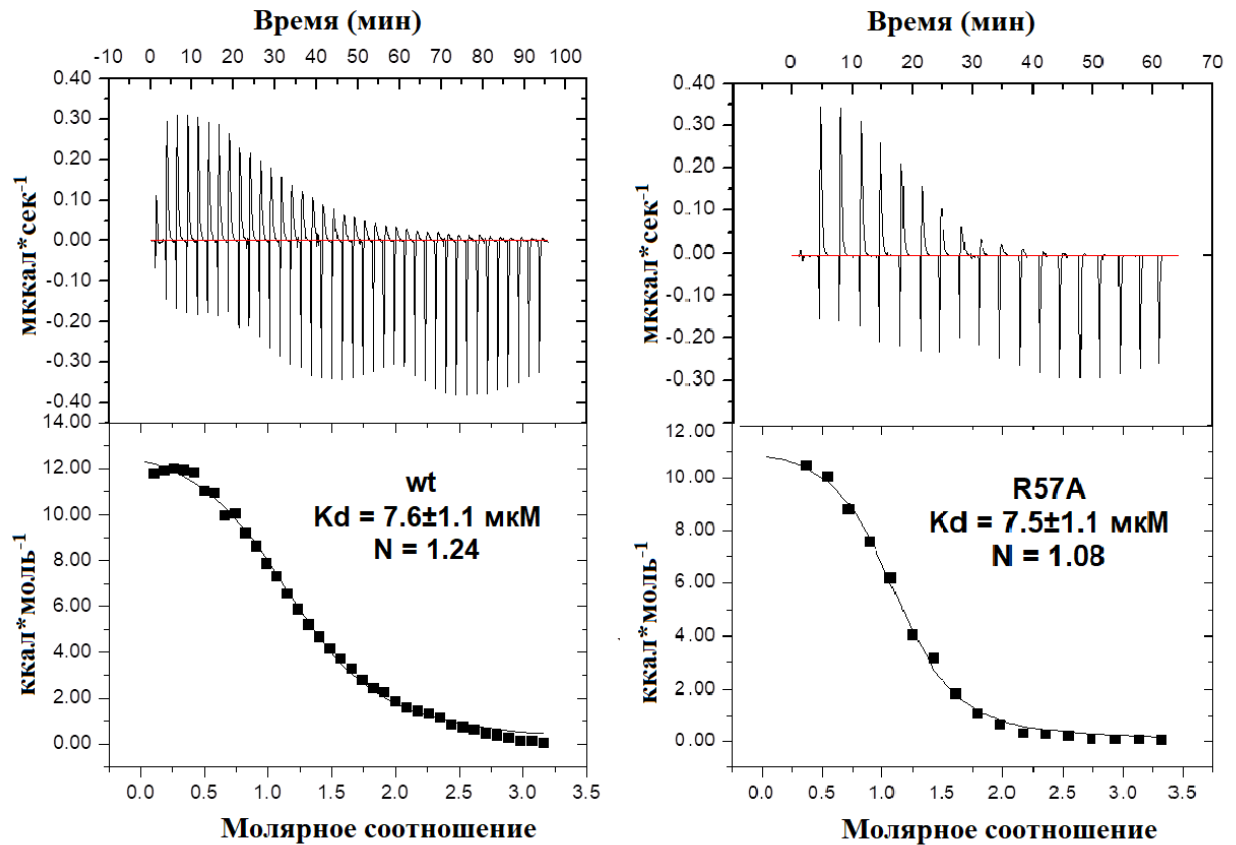
Результаты экспериментов, приведенные на рисунке 25 и в таблице 15, показывают, что данные замены существенно нарушают связывание HUSpm со всеми видами ДНК дуплексов.

Влияние мутаций на связывание БПФ1 с HUSpm проверяли методом изотермической титрационной калориметрии (ИТС). Было использовано наиболее активное и хорошо растворимое соединение БПФ1. Разведение белка и ингибитора проводили буфером, содержащим 1% ДМСО. Эксперимент показал, что константы диссоциации комплексов HUSpm и его вышеописанных мутантов с БПФ1 отличаются незначительно (табл. 16, рис. 26).

Параллельно с проведением мутагенеза, комплекс HUSpm с ДНК в присутствии и отсутствии БПФ1 изучали методом гетероядерной ЯМР спектроскопии высокого разрешения. Результаты ЯМР спектроскопии, указывали на то, что ингибитор взаимодействует с ДНК за пределами центральной части ДНК-связывающего домена.

Было решено проверить влияние БПФ1 на полученный ранее мутант HUSpmK35T, с заменой поверхностного остатка K35 участвующего в формировании контактов между мономерами в димере. Остаток K35 находился на стыке димеризационного и ДНК-связывающего доменов на боковой поверхности белка и участвовал в образовании водородной связи с сигналом

димеризации противоположного мономера, нарушение которой приводило к снижению термостабильности димера HUSpm (табл. 10). Проведённые эксперименты (EMSA и ИТС) показали, что данная мутация приводит к снижению как константы диссоциации комплекса белок-ингибитор (табл. 16), так и к увеличению ингибирования (снижению IC_{50} с 5.6 мкМ до 1.9 мкМ) в отношении образования ДНК-белкового комплекса (рис.27).



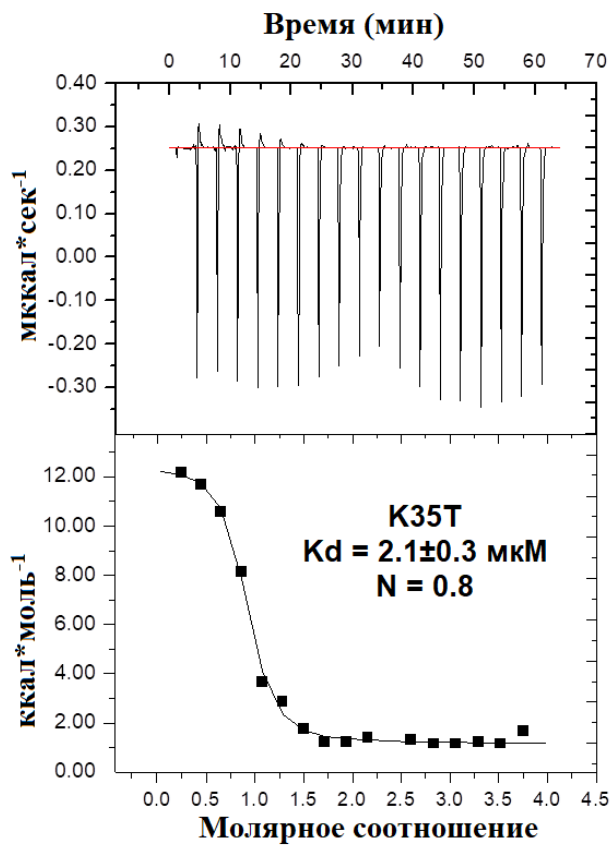
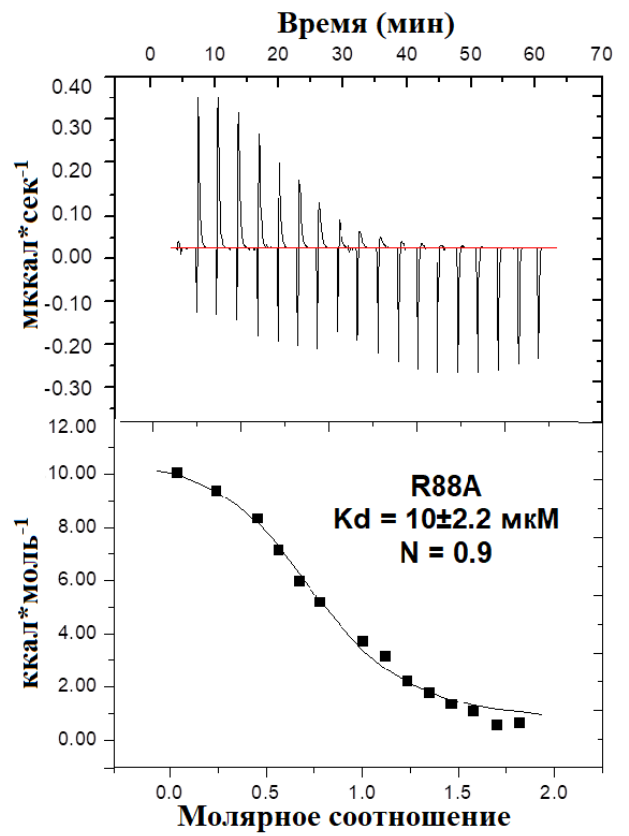
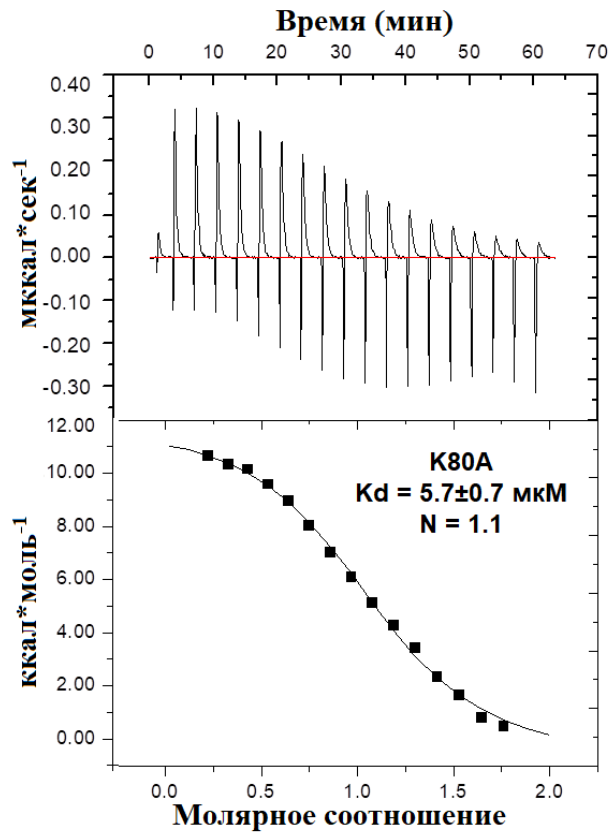


Рисунок 26. Изучение специфичности связывания БПФ1 с HUSpm и его мутантными производными, несущими аланиновые замены положительно-заряженных остатков в центральной части ДНК-связывающего домена, и мутантом HUSpmK35T методом изотермической титрационной калориметрии.

Таблица 16. Изучение связывания БПФ1 с HUSpm и его мутантными производными методом изотермической титрационной калориметрии для.

Параметры связывания БПФ1 с HUSpm и его мутантными производными, полученные для модели одно-сайтового связывания.				
	K_d (мкМ)	N	ΔH (ккал/моль)	ΔS (кал/(моль*К))
HUSpm	7.6±1.1	1.2	13.5	68.7
HUSpm_R57A	7.5±1.1	1.08	11.4	61.3
HUSpm_K80A	5.7±0.7	1.1	12	64.8
HUSpm_R88A	10±2.2	0.9	6.4	43.2
HUSpm_K35T	2.1±0.3	0.8	0.7	28.2

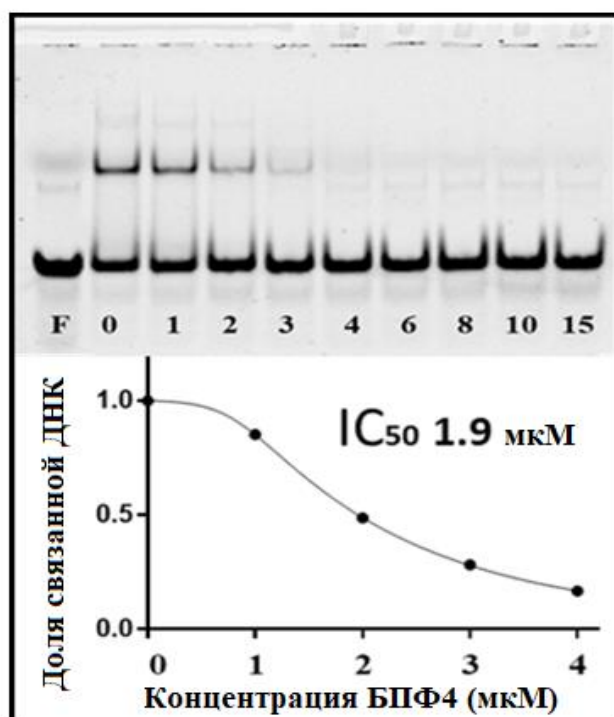


Рисунок 27. Ингибирование ДНК-связывающей способности мутантного белка HUSpm_K35T с помощью БПФ1, определенное в EMSA, соответствующая кривая ингибирования и значение IC₅₀.

Повышенная специфичность и эффективность БПФ1 по отношению к мутанту HUSpmK35T с ослабленным интерфейсом между мономерами в димере и отсутствие подобного эффекта в случае аланиновых замен ключевых ДНК-связывающих остатков, в совокупности с данными ЯМР спектроскопии, указывали на то, что БПФ1 не конкурирует с ДНК за сайт связывания.

Заключение и выводы.

В результате проведённой работы:

- Показано, что каждый представитель семейства белков HU/ИФ (InterPro ID IPR000119) может быть однозначно отнесен к одной из трех групп: HU, ИФ_A или ИФ_B.
- Впервые получены и функционально охарактеризованы новые HU белки из организмов *Neisseria gonorrhoeae*, *Spiroplasma melliferum*, *Mycoplasma gallisepticum*. Показано, что каждый из исследуемых HU белков имеет свой индивидуальный профиль аффинности к различным ДНК-структурам.
- Получена и охарактеризована пространственная структура HU белка из микоплазмы *Spiroplasma melliferum*. Выявлены ключевые структурные детерминанты, ответственные за высокую термостабильность белка.
- Впервые найдено, что бисфенольные производные флуорена (БПФ) ингибируют ДНК-связывающую способность HU белков с IC₅₀ в диапазоне 5-10 мкМ. Показано, что БПФ проявляют антимикробную активность в отношении микоплазм.
- Показано, что в ключевую роль в связывании БПФ и короткой дцДНК играют разные аминокислотные остатки, что позволяет предположить, что ингибирующее действие БПФ не связано с конкуренцией с ДНК за сайт связывания, а имеет аллостерическую природу.

Список литературы

1. Dame R.T. The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin // *Mol Microbiol.* 2005. Vol. 56, № 4. P. 858–870.
2. Johnson R. et al. Major Nucleoid Proteins in the Structure and Function of the *Escherichia coli* Chromosome. 2014. P. 65–132.
3. Travers A., Muskhelishvili G. Bacterial chromatin // *Curr Opin Genet Dev.* 2005. Vol. 15, № 5. P. 507–514.
4. Dillon S.C., Dorman C.J. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression // *Nat Rev Microbiol.* 2010. Vol. 8, № 3. P. 185–195.
5. Wold S., Crooke E., Skarstad K. The *Escherichia coli* Fis protein prevents initiation of DNA replication from *oriC* in vitro // *Nucleic Acids Res.* 1996. Vol. 24, № 18. P. 3527–3532.
6. Atlung T., Ingmer H. H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression // *Mol Microbiol.* 1997. Vol. 24, № 1. P. 7–17.
7. Kamashev D., Rouviere-Yaniv J. The histone-like protein HU binds specifically to DNA recombination and repair intermediates // *EMBO J.* 2000. Vol. 19, № 23. P. 6527–6535.
8. Shahul Hameed U.F. et al. H-NS uses an autoinhibitory conformational switch for environment-controlled gene silencing // *Nucleic Acids Res.* 2019. Vol. 47, № 5. P. 2666–2680.
9. Luijsterburg M.S. et al. The architectural role of nucleoid-associated proteins in the organization of bacterial chromatin: a molecular perspective // *J Struct Biol.* 2006. Vol. 156, № 2. P. 262–272.
10. Wang W. et al. Chromosome organization by a nucleoid-associated protein in live bacteria // *Science.* 2011. Vol. 333, № 6048. P. 1445–1449.
11. Hommais F. et al. Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS // *Mol Microbiol.* 2001. Vol. 40, № 1. P. 20–36.

12. Tendeng C., Bertin P.N. H-NS in Gram-negative bacteria: a family of multifaceted proteins // *Trends Microbiol.* 2003. Vol. 11, № 11. P. 511–518.
13. Dorman C.J., Hinton J.C., Free A. Domain organization and oligomerization among H-NS-like nucleoid-associated proteins in bacteria // *Trends Microbiol.* 1999. Vol. 7, № 3. P. 124–128.
14. Thanbichler M., Wang S.C., Shapiro L. The bacterial nucleoid: a highly organized and dynamic structure // *J Cell Biochem.* 2005. Vol. 96, № 3. P. 506–521.
15. Leonard P.M. et al. Crystal structure of the Lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus* // *EMBO J.* 2001. Vol. 20, № 5. P. 990–997.
16. Beloin C. et al. Contribution of DNA conformation and topology in right-handed DNA wrapping by the *Bacillus subtilis* LrpC protein // *J Biol Chem.* 2003. Vol. 278, № 7. P. 5333–5342.
17. Calvo J.M., Matthews R.G. The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli* // *Microbiol Rev.* 1994. Vol. 58, № 3. P. 466–490.
18. Brinkman A.B. et al. The Lrp family of transcriptional regulators // *Mol Microbiol.* 2003. Vol. 48, № 2. P. 287–294.
19. Losada A., Hirano T. Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins // *Genes Dev.* 2005. Vol. 19, № 11. P. 1269–1287.
20. Nasmyth K., Haering C.H. The structure and function of SMC and kleisin complexes // *Annu Rev Biochem.* 2005. Vol. 74. P. 595–648.
21. Strunnikov A.V. SMC complexes in bacterial chromosome condensation and segregation // *Plasmid.* 2006. Vol. 55, № 2. P. 135–144.
22. Swinger K.K., Rice P.A. IHF and HU: flexible architects of bent DNA // *Curr Opin Struct Biol.* 2004. Vol. 14, № 1. P. 28–35.
23. Kamashev D. et al. Comparison of histone-like HU protein DNA-binding properties and HU/IHF protein sequence alignment // *PLoS One.* 2017. Vol. 12, № 11. P. e0188037.

24. Stojkova P., Spidlova P., Stulik J. Nucleoid-Associated Protein HU: A Lilliputian in Gene Regulation of Bacterial Virulence // *Front Cell Infect Microbiol.* 2019. Vol. 9. P. 159.
25. Hales L.M., Gumport R.I., Gardner J.F. Determining the DNA sequence elements required for binding integration host factor to two different target sites // *J Bacteriol.* 1994. Vol. 176, № 10. P. 2999–3006.
26. Prieto A.I. et al. Genomic analysis of DNA binding and gene regulation by homologous nucleoid-associated proteins IHF and HU in *Escherichia coli* K12 // *Nucleic Acids Res.* 2012. Vol. 40, № 8. P. 3524–3537.
27. Kostrewa D. et al. Three-dimensional structure of the *E. coli* DNA-binding protein FIS // *Nature.* 1991. Vol. 349, № 6305. P. 178–180.
28. Pan C.Q. et al. Variable structures of Fis-DNA complexes determined by flanking DNA-protein contacts // *J Mol Biol.* 1996. Vol. 264, № 4. P. 675–695.
29. Shao Y., Feldman-Cohen L.S., Osuna R. Biochemical identification of base and phosphate contacts between Fis and a high-affinity DNA binding site // *J Mol Biol.* 2008. Vol. 380, № 2. P. 327–339.
30. Azam T.A., Ishihama A. Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity // *J Biol Chem.* 1999. Vol. 274, № 46. P. 33105–33113.
31. Almirón M. et al. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli* // *Genes Dev.* 1992. Vol. 6, № 12B. P. 2646–2654.
32. Nair S., Finkel S.E. Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase // *J Bacteriol.* 2004. Vol. 186, № 13. P. 4192–4198.
33. Frenkiel-Krispin D., Minsky A. Nucleoid organization and the maintenance of DNA integrity in *E. coli*, *B. subtilis* and *D. radiodurans* // *J Struct Biol.* 2006. Vol. 156, № 2. P. 311–319.
34. Martinez A., Kolter R. Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps // *J Bacteriol.* 1997. Vol. 179, № 16. P. 5188–5194.

35. Reich Z., Wachtel E.J., Minsky A. Liquid-crystalline mesophases of plasmid DNA in bacteria // *Science*. 1994. Vol. 264, № 5164. P. 1460–1463.
36. Wolf S.G. et al. DNA protection by stress-induced biocrystallization // *Nature*. 1999. Vol. 400, № 6739. P. 83–85.
37. Frenkiel-Krispin D. et al. Nucleoid restructuring in stationary-state bacteria // *Mol Microbiol*. 2004. Vol. 51, № 2. P. 395–405.
38. Dadinova L.A. et al. Protective Dps-DNA co-crystallization in stressed cells: an in vitro structural study by small-angle X-ray scattering and cryo-electron tomography // *FEBS Lett*. 2019. Vol. 593, № 12. P. 1360–1371.
39. Kamyshinsky R. et al. Polymorphic Protective Dps-DNA Co-Crystals by Cryo Electron Tomography and Small Angle X-Ray Scattering // *Biomolecules*. 2019. Vol. 10, № 1. P. 39.
40. Dadinova L. et al. Structural Rearrangement of Dps-DNA Complex Caused by Divalent Mg and Fe Cations // *Int J Mol Sci*. 2021. Vol. 22, № 11. P. 6056.
41. Сошинская Е.Ю. et al. Влияние состава буфера на конформационную подвижность N-концевых фрагментов DPS и характер взаимодействия с ДНК. Исследование методом малоуглового рентгеновского рассеяния // *Кристаллография*. 2020. Vol. 65, № 6.
42. Dubrovin E.V. et al. Spatial organization of Dps and DNA-Dps complexes // *J Mol Biol*. 2021. Vol. 433, № 10. P. 166930.
43. Shtykova E.V., Petoukhov M.V., Mozhaev A.A. Formation of Iron Oxide Nanoparticles in the Internal Cavity of Ferritin-Like Dps Protein: Studies by Anomalous X-Ray Scattering // *Biochemistry Moscow*. 2022. Vol. 87, № 6. P. 511–523.
44. Grant R.A. et al. The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA // *Nat Struct Biol*. 1998. Vol. 5, № 4. P. 294–303.
45. Gupta S., Chatterji D. Bimodal protection of DNA by *Mycobacterium smegmatis* DNA-binding protein from stationary phase cells // *J Biol Chem*. 2003. Vol. 278, № 7. P. 5235–5241.

46. Ceci P. et al. DNA condensation and self-aggregation of *Escherichia coli* Dps are coupled phenomena related to the properties of the N-terminus // *Nucleic Acids Res.* 2004. Vol. 32, № 19. P. 5935–5944.
47. Stephani K., Weichart D., Hengge R. Dynamic control of Dps protein levels by ClpXP and ClpAP proteases in *Escherichia coli* // *Mol Microbiol.* 2003. Vol. 49, № 6. P. 1605–1614.
48. Rouvière-Yaniv J., Gros F. Characterization of a novel, low-molecular-weight DNA-binding protein from *Escherichia coli* // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975. Vol. 72, № 9. P. 3428–3432.
49. Drlica K., Rouviere-Yaniv J. Histone-like proteins of bacteria // *Microbiol Rev.* 1987. Vol. 51, № 3. P. 301–319.
50. Rouvière-Yaniv J. et al. *Histone-Like Proteins in Prokaryotic Organisms and Their Interaction With DNA.* New York, NY: Academic Press. 1977. P. 211–231.
51. Boubrik F., Rouviere-Yaniv J. Increased sensitivity to gamma irradiation in bacteria lacking protein HU // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995. Vol. 92, № 9. P. 3958–3962.
52. Christodoulou E., Rypniewski W.R., Vorgias C.R.E. High-resolution X-ray structure of the DNA-binding protein HU from the hyper-thermophilic *Thermotoga maritima* and the determinants of its thermostability // *Extremophiles.* 2003. Vol. 7, № 2. P. 111–122.
53. Ramstein J. et al. Evidence of a thermal unfolding dimeric intermediate for the *Escherichia coli* histone-like HU proteins: thermodynamics and structure // *J Mol Biol.* 2003. Vol. 331, № 1. P. 101–121.
54. Kawamura S. et al. Investigation of the structural basis for thermostability of DNA-binding protein HU from *Bacillus stearothermophilus* // *J Biol Chem.* 1998. Vol. 273, № 32. P. 19982–19987.
55. Welfle H. et al. Salt-dependent and protein-concentration-dependent changes in the solution structure of the DNA-binding histone-like protein, HBSu, from *Bacillus subtilis* // *Eur J Biochem.* 1992. Vol. 204, № 3. P. 1049–1055.

56. Papageorgiou A.C. et al. HU histone-like DNA-binding protein from *Thermus thermophilus*: structural and evolutionary analyses // *Extremophiles*. 2016. Vol. 20, № 5. P. 695–709.
57. Oberto J. et al. The HU regulon is composed of genes responding to anaerobiosis, acid stress, high osmolarity and SOS induction // *PLoS One*. 2009. Vol. 4, № 2. P. e4367.
58. Bensaïd A. et al. Cross-talk Between Topoisomerase I and HU in *Escherichia coli* // *Journal of Molecular Biology*. 1996. Vol. 256, № 2. P. 292–300.
59. Balandina A., Kamashev D., Rouviere-Yaniv J. The bacterial histone-like protein HU specifically recognizes similar structures in all nucleic acids. DNA, RNA, and their hybrids // *J Biol Chem*. 2002. Vol. 277, № 31. P. 27622–27628.
60. Chernov V.M. et al. [Adaptive reactions of mycoplasmas in vitro: “viable but unculturable forms” and nanocells of *Acholeplasma laidlawii*] // *Mikrobiologiya*. 2005. Vol. 74, № 4. P. 498–504.
61. Li S., Waters R. *Escherichia coli* strains lacking protein HU are UV sensitive due to a role for HU in homologous recombination // *J Bacteriol*. 1998. Vol. 180, № 15. P. 3750–3756.
62. Dorman C.J., Deighan P. Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria // *Current Opinion in Genetics & Development*. 2003. Vol. 13, № 2. P. 179–184.
63. Rouvière-Yaniv J., Yaniv M., Germond J.E. *E. coli* DNA binding protein HU forms nucleosomelike structure with circular double-stranded DNA // *Cell*. 1979. Vol. 17, № 2. P. 265–274.
64. Stojkova P. et al. HU protein is involved in intracellular growth and full virulence of *Francisella tularensis* // *Virulence*. 2018. Vol. 9, № 1. P. 754–770.
65. Mangan M.W. et al. Nucleoid-associated protein HU controls three regulons that coordinate virulence, response to stress and general physiology in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium // *Microbiology (Reading)*. 2011. Vol. 157, № Pt 4. P. 1075–1087.

66. Priyadarshini R. et al. The nucleoid-associated protein HU β affects global gene expression in *Porphyromonas gingivalis* // *Microbiology (Reading)*. 2013. Vol. 159, № Pt 2. P. 219–229.
67. Ferrándiz M.-J. et al. HU of *Streptococcus pneumoniae* Is Essential for the Preservation of DNA Supercoiling // *Front Microbiol.* 2018. Vol. 9. P. 493.
68. Preobrajenskaya O. et al. The protein HU can displace the LexA repressor from its DNA-binding sites // *Mol Microbiol.* 1994. Vol. 13, № 3. P. 459–467.
69. Berger M. et al. Genes on a Wire: The Nucleoid-Associated Protein HU Insulates Transcription Units in *Escherichia coli* // *Sci Rep.* 2016. Vol. 6. P. 31512.
70. Grove A. Functional evolution of bacterial histone-like HU proteins // *Curr Issues Mol Biol.* 2011. Vol. 13, № 1. P. 1–12.
71. Mouw K.W., Rice P.A. Shaping the *Borrelia burgdorferi* genome: crystal structure and binding properties of the DNA-bending protein Hbb // *Molecular Microbiology.* 2007. Vol. 63, № 5. P. 1319–1330.
72. Ali Azam T. et al. Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid // *J Bacteriol.* 1999. Vol. 181, № 20. P. 6361–6370.
73. Yasuzawa K. et al. Histone-like proteins are required for cell growth and constraint of supercoils in DNA // *Gene.* 1992. Vol. 122, № 1. P. 9–15.
74. Micka B., Marahiel M.A. The DNA-binding protein HBSu is essential for normal growth and development in *Bacillus subtilis* // *Biochimie.* 1992. Vol. 74, № 7–8. P. 641–650.
75. Bhowmick T. et al. Targeting *Mycobacterium tuberculosis* nucleoid-associated protein HU with structure-based inhibitors // *Nat Commun.* 2014. Vol. 5. P. 4124.
76. Pettijohn D. Histone-like proteins and bacterial chromosome structure // *The Journal of biological chemistry.* 1988. Vol. 263. P. 12793–12796.

77. Oliveira Paiva A.M. et al. The Bacterial Chromatin Protein HupA Can Remodel DNA and Associates with the Nucleoid in *Clostridium difficile* // *J Mol Biol.* 2019. Vol. 431, № 4. P. 653–672.
78. Kamashev D. et al. Proteome of HU-Lacking *E. coli* Studied by Means of 2D Gel Electrophoresis // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* 2019. Vol. 45. P. 366–373.
79. Swinger K.K. et al. Flexible DNA bending in HU-DNA cocrystal structures // *EMBO J.* 2003. Vol. 22, № 14. P. 3749–3760.
80. Swinger K.K., Rice P.A. Structure-based analysis of HU-DNA binding // *J Mol Biol.* 2007. Vol. 365, № 4. P. 1005–1016.
81. Christodoulou E., Vorgias C.E. Cloning, overproduction, purification and crystallization of the DNA binding protein HU from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima* // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 1998. Vol. 54, № Pt 5. P. 1043–1045.
82. White S.W. et al. The high-resolution structure of DNA-binding protein HU from *Bacillus stearothermophilus* // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 1999. Vol. 55, № Pt 4. P. 801–809.
83. Saitoh F. et al. Arginine-55 in the beta-arm is essential for the activity of DNA-binding protein HU from *Bacillus stearothermophilus* // *Biosci Biotechnol Biochem.* 1999. Vol. 63, № 12. P. 2232–2235.
84. Altukhov D.A. et al. Enhanced conformational flexibility of the histone-like (HU) protein from *Mycoplasma gallisepticum* // *J Biomol Struct Dyn.* 2018. Vol. 36, № 1. P. 45–53.
85. Ghosh S. et al. Lysine acetylation of the *Mycobacterium tuberculosis* HU protein modulates its DNA binding and genome organization // *Mol Microbiol.* 2016. Vol. 100, № 4. P. 577–588.
86. Hołowka J. et al. HupB Is a Bacterial Nucleoid-Associated Protein with an Indispensable Eukaryotic-Like Tail // *mBio.* 2017. Vol. 8, № 6. P. e01272-17.

87. Curti E. et al. DNA polymerase switching: effects on spontaneous mutagenesis in *Escherichia coli* // *Mol Microbiol.* 2009. Vol. 71, № 2. P. 315–331.
88. Holck A., Kleppe K. Affinity of protein HU for different nucleic acids // *FEBS Lett.* 1985. Vol. 185, № 1. P. 121–124.
89. Rouvière-Yaniv J. Localization of the HU protein on the *Escherichia coli* nucleoid // *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1978. Vol. 42 Pt 1. P. 439–447.
90. Berthold V., Geider K. Interaction of DNA with DNA-binding proteins. The characterization of protein HD from *Escherichia coli* and its nucleic acid complexes // *Eur J Biochem.* 1976. Vol. 71, № 2. P. 443–449.
91. Kamau E. et al. Surface salt bridges modulate the DNA site size of bacterial histone-like HU proteins // *Biochem J.* 2005. Vol. 390, № Pt 1. P. 49–55.
92. Castaing B. et al. HU protein of *Escherichia coli* binds specifically to DNA that contains single-strand breaks or gaps // *J Biol Chem.* 1995. Vol. 270, № 17. P. 10291–10296.
93. Pinson V., Takahashi M., Rouviere-Yaniv J. Differential binding of the *Escherichia coli* HU, homodimeric forms and heterodimeric form to linear, gapped and cruciform DNA // *J Mol Biol.* 1999. Vol. 287, № 3. P. 485–497.
94. Kamashev D. et al. HU binds and folds single-stranded DNA // *Nucleic Acids Res.* 2008. Vol. 36, № 3. P. 1026–1036.
95. Rice P.A. et al. Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein-induced DNA U-turn // *Cell.* 1996. Vol. 87, № 7. P. 1295–1306.
96. Lynch T.W. et al. Integration Host Factor: Putting a Twist on Protein–DNA Recognition // *Journal of Molecular Biology.* 2003. Vol. 330, № 3. P. 493–502.
97. Bao Q. et al. A Divalent Metal-mediated Switch Controlling Protein-induced DNA Bending // *Journal of Molecular Biology.* 2007. Vol. 367, № 3. P. 731–740.
98. Kim D.H. et al. β -Arm flexibility of HU from *Staphylococcus aureus* dictates the DNA-binding and recognition mechanism // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2014. Vol. 70, № Pt 12. P. 3273–3289.

99. Hammel M. et al. HU multimerization shift controls nucleoid compaction // *Sci Adv.* 2016. Vol. 2, № 7. P. e1600650.
100. Remesh S.G. et al. Nucleoid remodeling during environmental adaptation is regulated by HU-dependent DNA bundling: 1 // *Nat Commun.* Nature Publishing Group, 2020. Vol. 11, № 1. P. 2905.
101. Verma S.C. et al. Non-specific and specific DNA binding modes of bacterial histone, HU, separately regulate distinct physiological processes through different mechanisms // *Mol Microbiol.* 2023.
102. Lioy V.S. et al. Multiscale Structuring of the *E. coli* Chromosome by Nucleoid-Associated and Condensin Proteins // *Cell.* 2018. Vol. 172, № 4. P. 771-783.e18.
103. Lioy V.S., Junier I., Boccard F. Multiscale Dynamic Structuring of Bacterial Chromosomes // *Annu Rev Microbiol.* 2021. Vol. 75. P. 541–561.
104. Cournac A., Plumbridge J. DNA looping in prokaryotes: experimental and theoretical approaches // *J Bacteriol.* 2013. Vol. 195, № 6. P. 1109–1119.
105. Dorman C.J., Dorman M.J. DNA supercoiling is a fundamental regulatory principle in the control of bacterial gene expression // *Biophys Rev.* 2016. Vol. 8, № Suppl 1. P. 89–100.
106. Thakur B. et al. The DNA-binding protein HU is a molecular glue that attaches bacteria to extracellular DNA in biofilms // *J Biol Chem.* 2021. Vol. 296. P. 100532.
107. Aoki K. et al. Extracellular mycobacterial DNA-binding protein 1 participates in mycobacterium-lung epithelial cell interaction through hyaluronic acid // *J Biol Chem.* 2004. Vol. 279, № 38. P. 39798–39806.
108. Paino A. et al. Interleukin-1 β is internalised by viable *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilm and locates to the outer edges of nucleoids // *Cytokine.* 2012. Vol. 60, № 2. P. 565–574.
109. Freire M.O. et al. A bacterial-biofilm-induced oral osteolytic infection can be successfully treated by immuno-targeting an extracellular nucleoid-associated protein // *Mol Oral Microbiol.* 2017. Vol. 32, № 1. P. 74–88.

110. Rancès E. et al. Genetic and functional characterization of the type IV secretion system in *Wolbachia* // *J Bacteriol.* 2008. Vol. 190, № 14. P. 5020–5030.
111. Beckmann J.F. et al. Detection of the *Wolbachia*-encoded DNA binding protein, HU beta, in mosquito gonads // *Insect Biochem Mol Biol.* 2013. Vol. 43, № 3. P. 272–279.
112. Jurcisek J.A. et al. Nontypeable *Haemophilus influenzae* releases DNA and DNABII proteins via a T4SS-like complex and ComE of the type IV pilus machinery // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017. Vol. 114, № 32. P. E6632–E6641.
113. Kim N. et al. Proteins released by *Helicobacter pylori* in vitro // *J Bacteriol.* 2002. Vol. 184, № 22. P. 6155–6162.
114. Konecna K. et al. Comparative proteomic profiling of culture filtrate proteins of less and highly virulent *Francisella tularensis* strains // *Proteomics.* 2010. Vol. 10, № 24. P. 4501–4511.
115. Klimentova J. et al. *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* Releases Differentially Loaded Outer Membrane Vesicles Under Various Stress Conditions // *Front Microbiol.* 2019. Vol. 10. P. 2304.
116. Yan L. et al. Diverse Aquatic Animal Matrices Play a Key Role in Survival and Potential Virulence of Non-O1/O139 *Vibrio cholerae* Isolates // *Front Microbiol.* 2022. Vol. 13. P. 896767.
117. Martínez E., Paly E., Barre F.-X. CTX ϕ Replication Depends on the Histone-Like HU Protein and the UvrD Helicase // *PLoS Genet.* 2015. Vol. 11, № 5. P. e1005256.
118. Martínez E., Campos-Gómez J., Barre F.-X. CTX ϕ : Exploring new alternatives in host factor-mediated filamentous phage replications // *Bacteriophage.* 2016. Vol. 6, № 2. P. e1128512.
119. Liu D. et al. Histone-like DNA binding protein of *Streptococcus intermedius* induces the expression of pro-inflammatory cytokines in human monocytes via activation of ERK1/2 and JNK pathways // *Cell Microbiol.* 2008. Vol. 10, № 1. P. 262–276.

120. Yumoto H. et al. The Pathogenic Factors from Oral Streptococci for Systemic Diseases // *Int J Mol Sci*. 2019. Vol. 20, № 18. P. 4571.
121. Choi S.H., Stinson M.W. Binding of a *Streptococcus mutans* cationic protein to kidney in vitro // *Infect Immun*. 1991. Vol. 59, № 2. P. 537–543.
122. Winters B.D., Ramasubbu N., Stinson M.W. Isolation and characterization of a *Streptococcus pyogenes* protein that binds to basal laminae of human cardiac muscle // *Infect Immun*. 1993. Vol. 61, № 8. P. 3259–3264.
123. Stinson M.W. et al. Streptococcal histone-like protein: primary structure of hlpA and protein binding to lipoteichoic acid and epithelial cells // *Infect Immun*. 1998. Vol. 66, № 1. P. 259–265.
124. Severin A. et al. Proteomic analysis and identification of *Streptococcus pyogenes* surface-associated proteins // *J Bacteriol*. 2007. Vol. 189, № 5. P. 1514–1522.
125. Lei B. et al. Identification and immunogenicity of group A *Streptococcus* culture supernatant proteins // *Infect Immun*. 2000. Vol. 68, № 12. P. 6807–6818.
126. Zhang L. et al. Streptococcal histone induces murine macrophages To produce interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha // *Infect Immun*. 1999. Vol. 67, № 12. P. 6473–6477.
127. Devaraj A. et al. DNABII proteins play a central role in UPEC biofilm structure // *Mol Microbiol*. 2015. Vol. 96, № 6. P. 1119–1135.
128. Brockson M.E. et al. Evaluation of the kinetics and mechanism of action of anti-integration host factor-mediated disruption of bacterial biofilms // *Mol Microbiol*. 2014. Vol. 93, № 6. P. 1246–1258.
129. Gustave J.E. et al. Targeting bacterial integration host factor to disrupt biofilms associated with cystic fibrosis // *J Cyst Fibros*. 2013. Vol. 12, № 4. P. 384–389.
130. Novotny L.A. et al. Monoclonal antibodies against DNA-binding tips of DNABII proteins disrupt biofilms in vitro and induce bacterial clearance in vivo // *EBioMedicine*. 2016. Vol. 10. P. 33–44.

131. Novotny L.A. et al. Structural stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms is reliant on eDNA structure and presence of a bacterial nucleic acid binding protein // *PLoS One*. 2013. Vol. 8, № 6. P. e67629.
132. Rocco C.J. et al. Natural antigenic differences in the functionally equivalent extracellular DNABII proteins of bacterial biofilms provide a means for targeted biofilm therapeutics // *Mol Oral Microbiol*. 2017. Vol. 32, № 2. P. 118–130.
133. Turnbull L. et al. Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms // *Nat Commun*. 2016. Vol. 7. P. 11220.
134. Gunn J.S., Bakaletz L.O., Wozniak D.J. What's on the Outside Matters: The Role of the Extracellular Polymeric Substance of Gram-negative Biofilms in Evading Host Immunity and as a Target for Therapeutic Intervention // *J Biol Chem*. 2016. Vol. 291, № 24. P. 12538–12546.
135. Novotny L.A., Goodman S.D., Bakaletz L.O. Redirecting the immune response towards immunoprotective domains of a DNABII protein resolves experimental otitis media // *NPJ Vaccines*. 2019. Vol. 4. P. 43.
136. Zhang P. et al. Bacteriophage protein Gp46 is a cross-species inhibitor of nucleoid-associated HU proteins // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022. Vol. 119, № 9. P. e2116278119.
137. Raj R. et al. Epigallocatechin Gallate with Potent Anti-*Helicobacter pylori* Activity Binds Efficiently to Its Histone-like DNA Binding Protein // *ACS Omega*. 2021. Vol. 6, № 5. P. 3548–3570.
138. Mabe K. et al. In vitro and in vivo activities of tea catechins against *Helicobacter pylori* // *Antimicrob Agents Chemother*. 1999. Vol. 43, № 7. P. 1788–1791.
139. Taylor P.W., Hamilton-Miller J.M.T., Stapleton P.D. Antimicrobial properties of green tea catechins // *Food Sci Technol Bull*. 2005. Vol. 2. P. 71–81.
140. Cui Y. et al. AFM study of the differential inhibitory effects of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) against Gram-positive and Gram-negative bacteria // *Food Microbiol*. 2012. Vol. 29, № 1. P. 80–87.

141. Jeon J. et al. The Antimicrobial Activity of (-)-Epigallocatechin-3-Gallate and Green Tea Extracts against *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Isolated from Skin Wounds // *Ann Dermatol*. 2014. Vol. 26, № 5. P. 564–569.
142. Nakayama M. et al. Mechanism for the antibacterial action of epigallocatechin gallate (EGCg) on *Bacillus subtilis* // *Biosci Biotechnol Biochem*. 2015. Vol. 79, № 5. P. 845–854.
143. Lee S., Razqan G.S.A., Kwon D.H. Antibacterial activity of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and its synergism with β -lactam antibiotics sensitizing carbapenem-associated multidrug resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* // *Phytomedicine*. 2017. Vol. 24. P. 49–55.
144. Parvez M.A.K. et al. Antibacterial activities of green tea crude extracts and synergistic effects of epigallocatechingallate (EGCG) with gentamicin against MDR pathogens // *Heliyon*. 2019. Vol. 5, № 7. P. e02126.
145. Бисфенольные производные флуорена, обладающие антимикоплазменной активностью, и способ их получения - патент | ИСТИНА – Интеллектуальная Система Тематического Исследования Наукометрических данных [Electronic resource]. URL: <https://istina.ips.ac.ru/patents/127217644/> (accessed: 20.11.2023).
146. Liu R. et al. The structural basis of African swine fever virus pA104R binding to DNA and its inhibition by stilbene derivatives // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020. Vol. 117, № 20. P. 11000–11009.
147. Agapova Y. et al. Inhibitor Targeting the Interface between Monomers of HU Protein from *Spiroplasma melliferum* Disrupts Conformational Dynamics and DNA-Binding Properties of the Protein // *Crystallography Reports*. 2020. Vol. 65. P. 903–908.
148. Agapova Y.K. et al. Structure-based inhibitors targeting the alpha-helical domain of the *Spiroplasma melliferum* histone-like HU protein // *Sci Rep*. 2020. Vol. 10, № 1. P. 15128.

149. Talyzina A.A. et al. Application of virtual screening and molecular dynamics for the analysis of selectivity of inhibitors of HU proteins targeted to the DNA-recognition site // *Crystallogr. Rep.* 2017. Vol. 62, № 6. P. 903–908.
150. Agapova Y. et al. Virtual Screening Targeting Dimerization Signals of Two Mycoplasma HU Proteins Revealed Different Types of Inhibitors Interacting with Common Binding Determinants // *Crystallography Reports.* 2019. Vol. 64. P. 602–607.
151. Agapova Yu.K. et al. Comparative Analysis of the Interfaces between Monomers in the Dimers of Bacterial Histone-Like HU Proteins by the MM-GBSA Method // *Crystallography Reports.* 2022. Vol. 67, № 6. P. 897–904.
152. Dey D., Ramakumar S. Phylogenetic Studies and Inhibitor Design Targeting Protein Interacting Interface of Nucleoid-Associated Protein HU. 2020.
153. Клонирование ДНК. Методы / ed. Кайзер К., Мюррей Н., Дэвис Р.В. Москва: Мир, 1988. 538 p.
154. Rogers S., Bendich A. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // *Plant molecular biology.* 1985. Vol. 5. P. 69–76.
155. Mikhailova A.G. et al. Activity modulation of the oligopeptidase B from *Serratia proteamaculans* by site-directed mutagenesis of amino acid residues surrounding catalytic triad histidine // *Biochimie.* 2017. Vol. 139. P. 125–136.
156. Mukherjee A., Bhattacharyya G., Grove A. The C-terminal domain of HU-related histone-like protein Hlp from *Mycobacterium smegmatis* mediates DNA end-joining // *Biochemistry.* 2008. Vol. 47, № 33. P. 8744–8753.
157. Dey D., Nagaraja V., Ramakumar S. Structural and evolutionary analyses reveal determinants of DNA binding specificities of nucleoid-associated proteins HU and IHF // *Mol Phylogenet Evol.* 2017. Vol. 107. P. 356–366.
158. Christodoulou E., Vorgias C.E. The thermostability of DNA-binding protein HU from mesophilic, thermophilic, and extreme thermophilic bacteria // *Extremophiles.* 2002. Vol. 6, № 1. P. 21–31.

159. Stroganov O.V. et al. Lead finder: an approach to improve accuracy of protein-ligand docking, binding energy estimation, and virtual screening // *J Chem Inf Model*. 2008. Vol. 48, № 12. P. 2371–2385.
160. Novikov F.N. et al. Improving performance of docking-based virtual screening by structural filtration // *J Mol Model*. 2010. Vol. 16, № 7. P. 1223–1230.
161. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: visual molecular dynamics // *J Mol Graph*. 1996. Vol. 14, № 1. P. 33–38, 27–28.
162. Glass J.I. et al. Essential genes of a minimal bacterium // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006. Vol. 103, № 2. P. 425–430.
163. Karr J.R. et al. A whole-cell computational model predicts phenotype from genotype // *Cell*. 2012. Vol. 150, № 2. P. 389–401.
164. Whithear K.G. et al. Evaluation and use of a micro-broth dilution procedure for testing sensitivity of fermentative avian mycoplasmas to antibiotics // *Avian Dis*. 1983. Vol. 27, № 4. P. 937–949.