

УДК 578.32;578.865;539.26

НУКЛЕОИД-АССОЦИИРОВАННЫЕ БЕЛКИ HU И IHF: ОЛИГОМЕРИЗАЦИЯ В РАСТВОРЕ И ГИДРОДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

© 2023 Л.А. Дадинова¹, М.В. Петухов¹, А.М. Гордиенко¹, В.А. Манувера^{2,3},
В.Н. Лазарев^{2,3}, Т.В. Ракитина^{4,5}, А.А. Можжев^{1,4}, Г.С. Петерс⁵, Э.В. Штыкова^{1*}

¹ ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН,
Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова,
119333 Москва, Россия; электронная почта: shtykova@ns.crys.ras.ru

² Федеральный научно-клинический центр
физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, 119435 Москва, Россия

³ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
141701 Долгопрудный, Московская обл., Россия

⁴ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 Москва, Россия

⁵ НИЦ «Курчатовский институт», 123182 Москва, Россия

Поступила в редакцию 28.12.2022

После доработки 10.03.2023

Принята к публикации 23.03.2023

Структура и функция бактериального нуклеоида контролируются нуклеоид-ассоциированными белками NAP. В любой фазе роста различные NAP, действуя последовательно, уплотняют нуклеоид и обеспечивают его транскрипционно активную структуру. Однако в поздней стационарной фазе происходит мощная экспрессия только одного из NAP, белка Dps, и формируются ДНК-белковые кристаллы, трансформирующие нуклеоид в статическую структуру, эффективно защищённую от внешних воздействий. Обнаружение кристаллических структур в живых клетках и связь этого феномена с бактериальной резистентностью к антибиотикам вызвало огромный интерес к изучению этого явления. Целью настоящей работы является получение и сравнительное исследование структур двух родственных NAP (HU и IHF), поскольку именно они накапливаются в клетке на поздней стационарной стадии роста, предшествующей началу формирования защитного ДНК–Dps кристаллического комплекса. Для структурных исследований в работе применялись два взаимодополняющих метода: малоугловое рентгеновское рассеяние (МУРР) в качестве основного метода изучения структуры белков в растворе и динамическое рассеяние света — в качестве дополнительного. Для интерпретации данных МУРР использовались различные подходы и компьютерные программы (в частности, использовался анализ структурных инвариантов, метод молекулярной тектоники и анализ олигомерных смесей в терминах объёмных долей компонентов), что позволило определить макромолекулярные характеристики и получить структурные 3D-модели различных олигомерных форм белков HU и IHF с типичным для МУРР разрешением ~2 нм. Было показано, что эти белки олигомеризуются в растворе в разной степени, и для IHF характерно присутствие крупных олигомеров, состоящих из исходных димеров, выстроенных в цепочку. Анализ экспериментальных и литературных данных позволил высказать гипотезу, что именно этот белок непосредственно перед экспрессией Dps формирует наблюдавшиеся ранее *in vivo* тороидальные структуры и подготавливает платформу для образования кристаллов ДНК–Dps. Полученные результаты необходимы для дальнейшего исследования феномена формирования биокристаллов в бактериальных клетках и нахождения путей преодоления резистентности различных патогенов к внешнему воздействию.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нуклеоид-ассоциированные белки, гистоноподобные белки HU и IHF, олигомеризация, малоугловое рентгеновское рассеяние, динамическое светорассеяние.

DOI: 10.31857/S032097252305007X, **EDN:** AXWAAN

Принятые сокращения: ДРС — динамическое светорассеяние; МУРР — малоугловое рентгеновское рассеяние; Dps — ДНК-связывающий белок голодающих клеток; Fis — фактор инверсионной стимуляции; H-NS — гистоноподобный белок, структурирующий нуклеоид; Lrp — регуляторный, чувствительный к лейцину белок; NAP — нуклеоид-ассоциированные белки.

* Адресат для корреспонденции.

ВВЕДЕНИЕ

Хранение и реализация генетической программы функционирования живой клетки происходит в хромосомах, которые представляют собой комплексы нуклеиновых кислот с белками. В отличие от эукариотических клеток, где различные ДНК-содержащие структуры в компактном виде находятся в ядре, хромосомы безъядерных прокариот, в том числе бактерий, в большинстве случаев содержат только одну кольцевую макромолекулу ДНК (нуклеоид) и находятся в цитоплазме в свободном состоянии. Нуклеоид содержит от 1 до 5 млн пар оснований (п.о.) и имеет длину порядка 1–2 мм, что вызывает необходимость его компактной упаковки, не превышающей объём клетки. Компактизация ДНК в нуклеоиде достигается за счёт молекулярного краудинга и суперспирализации ДНК, происходящих при участии нуклеоид-ассоциированных белков (Nucleoid-Associated Proteins, NAP) [1–7]. Эти архитектурные белки взаимодействуют с ДНК нуклеоида, заставляя её складываться в компактную структуру. Большая часть NAP представляет собой небольшие, основные, дили мультимерные белки с мономерами, состоящими примерно из 100 аминокислотных остатков. Эти белки часто называют гистоноподобными белками по аналогии с гистонами эукариот. Помимо участия в организации и компактизации хроматина, NAP играют значительную роль в процессах, связанных с функционированием ДНК: рекомбинации, репарации, репликации и транскрипции [8–11], а также выполняют ДНК-защитные функции [12]. Такое сочетание структурных и регуляторных ролей NAP оказывает серьёзное влияние как на функционирование нуклеоида, так и на жизнеспособность и вирулентность бактерий.

Условно NAP можно разделить на три основные группы [13, 14]: 1) белки, соединяющие отдельные участки ДНК; 2) белки, изгибающие ДНК; 3) белки, участвующие в альтернативных механизмах организации и компактизации ДНК.

К первой группе относится гистоноподобный белок, структурирующий нуклеоид (Histone-like Nucleoid Structuring protein, H-NS). H-NS имеет молекулярную массу 15,6 кДа и участвует в регуляции бактериальной транскрипции путём репрессии определённых генов [15, 16]. Основными функциональными единицами H-NS являются димеры, которые, в свою очередь, олигомеризуются, формируя сложные структуры, связывающие между собой различ-

ные участки ДНК, в результате чего происходит компактизация нуклеоида [17]. Характерной особенностью H-NS является наличие двух ДНК-связывающих доменов, которые могут взаимодействовать одновременно с двумя дуплексами ДНК, соединяя их наподобие застёжки-молнии [18].

Другим важным представителем первой группы является регуляторный, чувствительный к лейцину белок (Leucine-responsive regulatory protein, Lrp). Lrp обладает молекулярной массой 15 кДа и функционально реагирует на изменение концентрации лейцина. Основной функциональной единицей Lrp является октамер, но могут существовать и более крупные олигомеры [19]. Октамеры Lrp образуют «дисковидные» структуры, которые наматывают на себя ДНК как нить на катушку, сближая удалённые друг от друга участки ДНК и тем самым эффективно её уплотняя [20]. Присутствие лейцина вызывает диссоциацию Lrp и, соответственно, влияет на его ДНК-связывающие свойства [21, 22].

К первой группе NAP также относят белок SMC (Structural Maintenance of Chromosomes), являющийся высококонсервативным во всём живом царстве от бактерий до человека и обладающий высокой молекулярной массой (выше 150–200 кДа) [23, 24]. Димер SMC образует V-образную структуру с двумя длинными двуспиральными плечами, которые могут взаимодействовать сразу с несколькими регионами ДНК, что позволяет ему участвовать в сепарации вновь реплицированных хромосом [25].

Важнейшими представителями NAP 2-й группы (белков, изгибающих ДНК) являются белки IHF (Integration Host Factor) и HU [26]. Название HU означает гистоноподобный (H) и (U), где U93 — штамм *Escherichia coli*, откуда белок был выделен, а не heat unstable, что до сих пор встречается в литературе [27]. HU и IHF имеют сходные первичные и пространственные структуры, но отличаются пространственностью в бактериальном царстве и особенностями ДНК-связывания.

HU — это наиболее широко распространённый и высокопредставленный в делящейся клетке NAP бактерий [28, 29]. У большинства бактерий HU является гомодимером с массой мономеров около 10 кДа. HU относят 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%, и их пространственные структуры исключительно консервативны [28].

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. Расположенные на концах «рук» остатки пролина интеркалируют в малую бороздку ДНК и изгибают её [26]. HU не имеет специфических сайтов связывания с ДНК, но имеет повышенное сродство к ДНК со структурными искажениями, такими как разрывы одной или двух цепей, а также репликативные вилки [10, 27]. Профили специфичности к ДНК-структурам у разных HU-белков заметно отличаются, другие различия связаны с длиной сайта связывания, углом изгиба ДНК и степенью кооперативности [28, 30]. Предполагается также, что взаимодействия HU–ДНК играют критическую функцию в ремоделировании нуклеоидов, которое может служить общим микробным механизмом регуляции транскрипции и адаптации к изменяющимся условиям [31].

INF встречается только в энтеробактериях и является гомологом HU (30–40% идентичности) [28]. В отличие от HU, INF 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, INF использует интеркаляцию двух консервативных остатков пролина в малую бороздку ДНК на расстоянии 9 п.о. друг от друга, индуцируя или стабилизируя изгиб ДНК [26]. В отличие от HU, INF специфически распознаёт последовательности из 13 п.о. с консенсусом 5'-(A/T)ATCAANNNTT(A/G)-3', где N – это любой нуклеотид [32].

Ко второй группе NAP относится также семейство Fis (Factor for inversion stimulation). Белки этого семейства представляют собой гомодимеры, каждая субъединица которых состоит из 98 аминокислот [33]. *In vitro* в высоких концентрациях Fis связывается с ДНК неспецифически, однако *in vivo* белок выбирает определённые последовательности длиной 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 [34–36].

К третьей группе NAP относится ДНК-связывающий белок голодающих клеток (DNA-binding protein from starved cells, Dps), который, связываясь с ДНК, обеспечивает наиболее упорядоченный уровень её организации, так как при этом образуется не просто компактная структура, а устойчивый кристаллический комплекс Dps–ДНК, защищающий дезоксирибонуклеиновую кислоту от внешнего нега-

тивного воздействия, в том числе от антибиотиков [37–40]. Обнаружение кристаллических структур в живых клетках и связь этого феномена с бактериальной резистентностью к лекарственным препаратам вызвало огромный интерес к структуре самого Dps и его комплекса с ДНК [41–51].

Dps представляет собой додекамер, мономер которого состоит из четырёх α -спиралей и имеет молекулярную массу 18,7 кДа [52]. Dps может также существовать в виде тримера, который, однако, не образует с ДНК кристаллических форм [53]. Предполагается, что Dps связывает ДНК за счёт электростатических связей богатых лизином N-концевых доменов с отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом ДНК [36, 37, 54].

Изменчивость качественного и количественного состава NAP у разных бактерий и на разных стадиях жизненного цикла [4, 7], их способность компенсировать отсутствие друг друга и менять функциональные свойства в ответ на изменение клеточной среды препятствуют изучению вклада индивидуальных NAP в поддержание как структуры нуклеоида, так и жизнеспособности и вирулентности бактериальной клетки. В этой ситуации, когда имитировать сложные процессы, происходящие в бактериальном нуклеоиде, *in vitro* не представляется возможным, традиционным решением является последовательное изучение структуры и свойств отдельных белков, а затем на базе полученных данных – результата их взаимодействия.

Ранее методом малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) и криоэлектронной микроскопии нами были определены типы кристаллической упаковки сокристаллов Dps–ДНК в растворе в зависимости от состава буфера [44, 45], а также проведено изучение влияния конформационной подвижности N-концевых областей Dps из *E. coli* на характер взаимодействия белка с ДНК в разных условиях [46, 47].

Целью настоящей работы является получение и сравнительное исследование структур двух родственных NAP (HU и INF), которые накапливаются в клетке на поздней стационарной стадии роста, предшествующей началу формирования защитного кристаллического комплекса Dps–ДНК. Для достижения этой цели, во-первых, были использованы два разных метода получения рекомбинантных белков HU и INF. Белок HU представляет собой гомодимер HUa *E. coli* и был получен по методу, описанному в работе Agarova et al. [55]. INF является гетеродимером, и для его получения использовался оригинальный метод,

описанный в данной работе ниже и основанный на экспрессии бицистронных оперонов. Во-вторых, для структурных исследований применялись два независимых, взаимодополняющих метода: малоугловое рентгеновское рассеяние в качестве основного метода изучения структуры белков в растворе и динамическое рассеяние света (ДРС) — в качестве дополнительного.

МУРР представляет собой упругое рассеяние рентгеновского излучения на неоднородностях электронной плотности вещества [56]. Пространственное распределение электронной плотности, в свою очередь, зависит от структуры рассеивающего объекта и определяет профиль экспериментальной кривой рассеяния $I(s)$, анализ которой даёт возможность вычислить радиус инерции R_g и максимальный размер $D_{\max}$ рассеивающих частиц. Современные методы интерпретации данных МУРР и созданное для них программное обеспечение позволяют определить не только упомянутые инварианты малоуглового рассеяния, но также построить 3D структурные модели рассеивающих объектов с разрешением порядка 1–2 нм [56].

ДРС основано на эффекте Доплера (изменение частоты падающего света) и броуновского движения частиц в растворе, и с его помощью измеряется флуктуация рассеяния света, непосредственно связанная с диффузией частиц в растворе, что даёт возможность определить гидродинамический радиус R_h , через уравнение Стокса–Эйнштейна.

Важно отметить, что МУРР и ДРС позволяют проводить изучение биологических объектов в среде, максимально приближенной к естественной, т.е. в растворе при заданных температуре, pH, солевом составе и других параметрах среды [56]. В отличие от классических биохимических техник разделения белков (таких как хроматография или электрофорез), оба метода могут детектировать и изучать нестабильные (слабые и короткоживущие) комплексы. Необходимость совместного использования данных методов состоит в том, что ДРС позволяет определить степень олигомеризации белков, которую необходимо учитывать при построении пространственных структурных моделей по данным МУРР.

Результаты настоящей работы будут служить основой для дальнейшего исследования феномена формирования биокристаллов в бактериальных клетках и нахождения путей преодоления резистентности различных патогенов к внешнему воздействию.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение рекомбинантного белка HUa *E. coli*. Использовали плазмиду pBAD-hupA и клетки *E. coli* с делетированными генами HU-белка. Плазида и клетки были любезно предоставлены J. Oberto (Институт физико-химической биологии, Париж, Франция). Предварительно в плазмиду по сайтам рестрикции BamHI и NdeI был встроено олигонуклеотидный дуплекс, кодирующий последовательности 6-гистидинового тага и сайта протеазы вируса гравировки табака (MGSDKINNNNNHENLYFQ*GH, * — сайт расщепления). Полученной плазмидой pBad-HisTEVhupA трансформировали клетки *E. coli* штамма C600 (hupA:Cm, hupB:Km). Клетки штамма-продуцента культивировали в среде LB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл), канамицин (25 мкг/мл) и хлорамфеникол (25 мкг/мл) при 37 °C в течение ночи. Ночную культуру разводили в 100 раз средой LB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл), и подращивали при 37 °C до оптической плотности OD₆₀₀ = 0,8. Экспрессию индуцировали добавлением арабинозы до 0,2% (v/v) и проводили в течение ночи (16 ч) при 25 °C. Клетки осаждали центрифугированием (6000 g, 10 °C, 20 мин). Выделение рекомбинантного белка проводили, как описано ранее [55]. Схема выделения включала две стадии металлохелатной аффинной хроматографии (MXAX), разделённые обработкой TEV-протеазой, и финальную очистку белка с помощью ионообменной хроматографии. Все хроматографии проводили с использованием хроматографической системы AKTA Prime («GE Healthcare», США).

Биомассу (около 10 г), полученную из 1 литра бактериальной культуры, лизировали в 25 мл охлаждённого буферного раствора А (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 500 mM NaCl), который содержал 5% глицерина, 0,2% Triton X-100 и 1 mM PMSF, и обрабатывали ультразвуком с помощью ультразвукового дезинтегратора Ultrasonic Processor («Cole Parmer», США) в режиме (5 × 30 с), охлаждая во льду. Нерастворимые компоненты осаждали центрифугированием (20 000 g, 4 °C, 20 мин). Осветлённый лизат наносили на колонку с металлоаффинной смолой Ni-NTA Superflow («Qiagen», Германия), уравновешенную буфером А. Для удаления неспецифически-связавшихся белков и фрагментов ДНК колонку промывали буфером А, содержащим 1 M NaCl и 40 mM имидазола. Элюцию целевого белка проводили буфером А, содержащим 300 mM имидазола. Фракции, содержащие целевой белок,

объединяли и инкубировали с протеазой TEV при комнатной температуре в течение 2 ч с последующим диализом против буфера А в течение 16 ч при 4 °С. Для освобождения от 6-гистидинового тага и TEV-протеазы проводили повторную МХАХ, собирая фракции, не связавшиеся со смолой. Финальную очистку проводили с помощью ионообменной хроматографии, проводимой на колонке ResourceQ («GE Healthcare»), уравновешенной буфером (20 mM Tris-HCl (pH 7,8), 50 mM NaCl) с использованием градиента NaCl (50 mM–1 M). Для обессоливания и концентрирования препарата до и после ионообменной хроматографии использовали колонки PD10 («GE Healthcare») и центрифужные концентраторы Amicon Ultra 3kDa, («Millipore», США). Все белковые фракции, полученные в процессе выделения белка, анализировали с помощью электрофореза в 15%-ном ПААГ в денатурирующих условиях с последующим окрашиванием Кумасси G-250.

Получение рекомбинантного белка INF. Белок INF, в отличие от HU, представляет собой гетеродимер. В литературе описано, что для получения INF требуется экспрессировать гены обеих его цепей в одной клетке, иначе белок не образует правильной структуры [57]. Для решения этой задачи мы получили генетическую конструкцию, содержащую двусторонний оперон, на базе плазмиды семейства pET. С помощью ПЦР нарабатывали три фрагмента ДНК, два из них кодировали альфа- и бета-цепи INF, а третий представлял собой практически полноразмерную плазмиду pET-22b без участка между промоторно-операторной областью и T7-терминатором. Три фрагмента объединяли в одну плазмиду

по методу PIPE [58]. В результате была получена плазида pET-INFab, содержащая двусторонний оперон под контролем промотора T7, кодирующий обе цепи INF. В короткую нетранслируемую область между участками ДНК, кодирующими альфа- и бета-цепи, был введен сайт связывания рибосомы (RBS) для трансляции второго цистрона.

Для ПЦР-амплификации участков ДНК, кодирующих альфа- и бета-цепи INF, использовали пары праймеров INFa-F и INFa-R, INFb-F и INFb-R соответственно и ДНК *E. coli* K-12 MG1655 в качестве матрицы. Для амплификации плазмиды использовались праймеры PETPIPE-1 и PETPIPE-2, а также плазида pET-22b («Novagen», США) в качестве матрицы. ДНК-фрагменты были очищены с помощью препаративного электрофореза в агарозном геле и выделены с помощью набора diaGene («Диаэм», Россия). Далее три ПЦР-фрагмента объединяли в экспрессионную плазмиду по методу PIPE [58]. Для этого их смешивали в эквимольных количествах и без лигирования трансформировали смесью компетентные клетки *E. coli* TOP10. За счёт наличия у фрагментов ДНК перекрывающихся частей в клетке *E. coli* происходило восстановление полной плазмиды. Клоны, содержащие рекомбинантные плазмиды, отбирали с помощью ПЦР клеточной суспензии с использованием праймеров T7 и T7t. Последовательности праймеров, использованных в работе («Литех», Россия), представлены в табл. 1. Из отобранных клонов выделяли плазмидную ДНК и подтверждали соответствие её структуры ожидаемой с помощью автоматического секвенирования по Сэнгеру на секвенаторе ABI Prism («Applied biosystems», США).

Таблица 1. Последовательности праймеров, используемых в работе

Название	Последовательность 5'→3'
INFa-F	GAAGGAGATATACATATGGCGCTTACAAAAGCTGA
INFa-R	CATTATTTACCTCCTTTATTTACTCGTCTTTGGGCGAAG
INFb-F	GTAATAAAGGAGGTAAATAATGACCAAGTCAGAATTGATAG
INFb-R	GTGGTGGTGCTCGAGTTAACCGTAAATATTGGCGCGA
PETPIPE-1	CATATGTATATCTCCTTCTTAAAG
PETPIPE-2	CTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
T7t	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

Для наработки белка INF плазмидой pET-INFab трансформировали клетки *E. coli* BL21(DE3) gold («Novagen», США). Далее в колбу, содержащую 50 мл среды LB и 150 мг/литр ампициллина, помещали отдельную колонию *E. coli* BL21-gold(DE3)/pET-INFab. Колбу инкубировали в течение ночи при 30 °C в шейкере-инкубаторе. Затем 50 мл ночной культуры переносили в 1 литр свежей среды LB (ампициллин 100 мг/литр) и подращивали в шейкере-инкубаторе при 37 °C до момента достижения культурой OD600 = 0,8. Далее к культуре добавляли IPTG до конечной концентрации 0,5 mM и инкубировали 4 ч при температуре 37 °C в шейкере-инкубаторе. Клетки осаждали центрифугированием. Клеточную массу ресуспендировали в 50 мл 20 mM Tris-HCl (pH 7,5) и разрушали клетки с помощью ультразвукового дезинтегратора. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием в течение 20 мин при ускорении 15 000 g. Полученный раствор фильтровали через фильтр с порами 0,22 мкм и наносили на хроматографическую колонку, содержащую 5 мл сорбента DEAE Sepharose FF («GE Healthcare») и уравнивавшую 20 mM Tris-HCl (pH 7,5). Собирали фракцию белков, не связавшихся с колонкой. Большая часть белков из клеточного лизата в этих условиях связывалась с сорбентом, в то время как INF проходил колонку без связывания. После первичной очистки с помощью DEAE-сефарозы INF специфично очищали с помощью хроматографии на колонке с гепарин-сефарозой [59]. Для этого использовали колонку HiTrap Heparin HP 1ml («GE Healthcare») в соответствии с рекомендациями производителя. В результате был получен электрофоретически гомогенный препарат белка INF.

Подготовка образцов для анализа. Замена буфера и концентрирование белковых растворов проводили с помощью центрифужных концентраторов Amicon Ultra-4 с порогом отсеивания — 3 кДа. Образцы переводили в буфер (20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂) и концентрировали до 5 мг/мл. Также образцы перед измерениями центрифугировали в течение часа при 11 000 g в охлаждаемой настольной центрифуге.

Эксперимент и анализ данных МУРР. Эксперимент по малоугловому рентгеновскому рассеянию проводился на станции «БиоМУР» [60, 61] Курчатовского источника синхротронного излучения (НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия) в геометрии на пропускание. Растворы с образцами помещали в тонкостенные кварцевые капилляры диаметром 2 мм и толщиной стенок 0,01 мм.

Для регистрации рентгенограмм использовали двухкоординатный детектор DECTRIS Pilatus3 1M с площадью рабочей поверхности 168,7 × 179,4 мм, разрешением 981 × 1043 точек и размером пикселя — 172 мкм, установленный на расстоянии около 750 мм от образца. Интенсивность рассеяния $I(s)$ была измерена в области значений векторов рассеяния $0,09 < s < 4 \text{ нм}^{-1}$, где $s = (4\pi \sin\theta)/\lambda$, 2θ — угол рассеяния и $\lambda = 0,1445 \text{ нм}$ — длина волны рассеяния. Для каждого образца было снято по 12 экспериментальных кривых рассеяния со временем экспозиции 300 с каждая (суммарное время облучения 60 мин) с целью контроля возможных радиационных повреждений. Точная калибровка расстояния образец–детектор осуществлялась в программе Fit2D [62] по образцу бегената серебра («Sigma-Aldrich», Германия).

Первичная обработка данных, включающая усреднение кривых рассеяния и вычет сигнала от буфера, а также определение структурных инвариантов МУРР, проводилась с помощью программы PRIMUS [63]. Дальнейшая обработка полученных данных проводилась с помощью программ специального пакета ATSAS [64].

Для определения максимального размера рассеивающих частиц в растворе и построения функций распределения по расстояниям $p(r)$ использовалась программа GNOM [65].

Сравнение экспериментальных данных и кривых МУРР, полученных от моделей, осуществлялось программой CRY SOL [66]. Программа использует мультипольное разложение амплитуд рассеяния для расчёта сферически усреднённой картины рассеяния и учитывает гидратную оболочку. Экспериментальные данные МУРР приближаются путём оптимизации расчётной кривой рассеяния, минимизируя расхождение между ними. Критерием сходимости является значение невязки χ^2 :

$$\chi^2 = \frac{1}{N-1} \sum_j \left[\frac{I_{\text{exp}}(s_j) - c I_{\text{calc}}(s_j)}{\sigma(s_j)} \right]^2, \quad (1)$$

где N — число экспериментальных точек, $I_{\text{exp}}(s_j)$ и $\sigma(s_j)$ — экспериментальные интенсивности и их ошибки, $I_{\text{calc}}(s_j)$ — интенсивность, вычисленная от модели, c — шкалирующий множитель.

Для моделирования структуры олигомеров HU и INF нами была также разработана программа NEMIX. Данная программа позволяет строить мультичастичные образования, в которых каждый следующий строительный блок получается из предыдущего путём одинаковой

трансформации первого блока для получения второго из первого, третьего из второго и т.д. Затем программа рассматривает все возможные конфигурации таких строительных блоков внутри олигомера и с помощью их комбинации приближает данные МУРР от олигомерной смеси, содержащей как полный олигомер, так и его составные части. В данной работе при моделировании строительным блоком для IHF был гетеродимер (PDB ID: 1ihf) и гомодимер (PDB ID: 5l8z) — для HU, а в качестве компонентов смеси, соответственно, использовали один (димер), два (тетрамер, как часть олигомера) и три (полный олигомер) строительных блока.

Количественный состав равновесных смесей, состоящих из компонентов, для каждого из которых имеется кривая рассеяния (либо измеренная экспериментально, либо посчитанная от модели программой CRY SOL [66]), определялся программой OLIGOMER [63]. OLIGOMER с помощью линейной комбинации кривых МУРР от компонентов приближает экспериментальные данные от смеси. При этом весовые коэффициенты компонентов определяют их объёмные доли v_k в такой смеси:

$$I(s) = \sum_{k=1}^K v_k I_k(s), \quad (2)$$

где $I_k(s)$ — интенсивность рассеяния компонентой.

Следует заострить внимание, что в формулу (2) входят объёмные доли компонентов, а не их молярные фракции, из чего следует, что вклад больших олигомеров будет более существенным, чем, например, димеров. Таким образом, при одних и тех же объёмных долях количество олигомеров в единицах будет обратно пропорционально их молекулярному весу.

Моделирование методом молекулярной тектоники по данным от олигомерной смеси проводилось программой SASREFMX [67]. Данная программа восстанавливает четвертичную структуру комплекса путём вращения и сдвига относительно друг друга атомной структуры субъединиц, формирующих комплекс. При этом экспериментальная кривая МУРР приближается смесью кривых рассеяния от целого комплекса и от его компонентов, а в качестве дополнительных параметров моделирования используются объёмные доли компонентов. В данной работе комплексом являлся высокий олигомер белка, а в качестве субъединиц использовались составляющие его димеры.

Эксперимент и анализ результатов динамического светорассеяния. Анализ проводили с использованием прибора Zetasizer™ NanoS («Malvern Panalytical», Великобритания). Технические характеристики — 4 мВт He-Ne-лазер, $\lambda_0 = 633$ нм, $\theta = 173^\circ$.

Настройки прибора оптимизировались автоматически с помощью программного обеспечения ZS XPLOER («Malvern Panalytical»). Для каждого образца проведено пять повторных измерений при 25°C с термостабилизацией 120 с. Динамическое рассеяние света измеряет автокорреляционную функцию, т.е. корреляцию флуктуации света, рассеянного наночастицами, находящимися в броуновском движении в растворе. Коэффициент диффузии наночастиц рассчитывается путём подбора автокорреляционной функции и используется для определения диаметра (или радиуса) частиц через уравнение Стокса–Эйнштейна:

$$d(H) = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h}, \quad (3)$$

где k_B — константа Больцмана, T — абсолютная температура, η — вязкость жидкости, R_h — гидродинамический радиус частицы. Анализ полученных данных проводится в предположении сферической аппроксимации исследуемого объекта. Распределение по гидродинамическим размерам белков и индекс полидисперсности растворов получены с помощью программного обеспечения Zetasizer («Malvern Panalytical»). Вязкость воды была установлена на уровне $0,08872$ мПа·с с рефракционным индексом 1,33. Ошибка измерений определена как стандартное отклонение пяти повторных измерений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ гидродинамического поведения белков HU и IHF с помощью динамического светорассеяния. Имеющиеся литературные данные указывают на способность гистонподобных белков олигомеризоваться в растворе [17, 31, 68–70]. Поэтому степень олигомеризации, т.е. распределение по гидродинамическим размерам и объёмные доли отдельных компонент, белков HU и IHF были определены с помощью динамического рассеяния света (рис. 1).

Полученные распределения по гидродинамическим размерам демонстрируют асимметричные профили для обоих белков, что свидетельствует о наличии в растворе не только димерных форм HU и IHF, но и более крупных

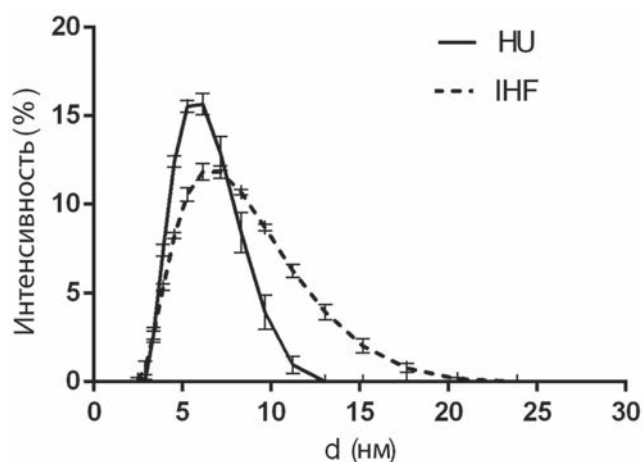


Рис. 1. Распределение по гидродинамическим размерам для гистоноподобных белков HU и IHF

образований. Тем не менее основной фракцией рассеивающих частиц являются частицы с z -средними гидродинамическими размерами порядка 8–10 нм, что хорошо соответствует размерам димеров исследуемых белков с учётом гидратной оболочки. Расчёты с помощью программы Zetasizer показывают, что в растворе присутствует 83% (v/v) димеров HU и око-

ло 17% (v/v) более крупных частиц. Для этого белка профиль распределения по размерам сравнительно узок (индекс полидисперсности равен 0,32), в то время как для IHF степень полидисперсности высокая (0,75): в растворе присутствуют 45% (v/v) димеров, 35% (v/v) более высоких олигомеров и порядка 20% (v/v) ещё более крупных частиц.

Интегральные структурные характеристики гистоноподобных белков HU и IHF. Кривые малоуглового рассеяния гистоноподобных белков HU и IHF были измерены в буферном растворе, содержащем катионы Mg^{2+} . Выбор солевого состава, содержащего бивалентные катионы магния, был основан на результатах ранее проведённых экспериментов по оптимизации условий формирования ДНК-белковых комплексов белка Dps, способного образовывать сокристаллы Dps–ДНК [46, 47]. Из литературных данных также известно, что присутствие бивалентных катионов магния имеет решающее значение для образования сокристаллов Dps–ДНК [46, 47, 71] и, следовательно, может оказать влияние на структуру белков HU и IHF, которые предшествуют Dps на поздних фазах роста клеток [13, 29].

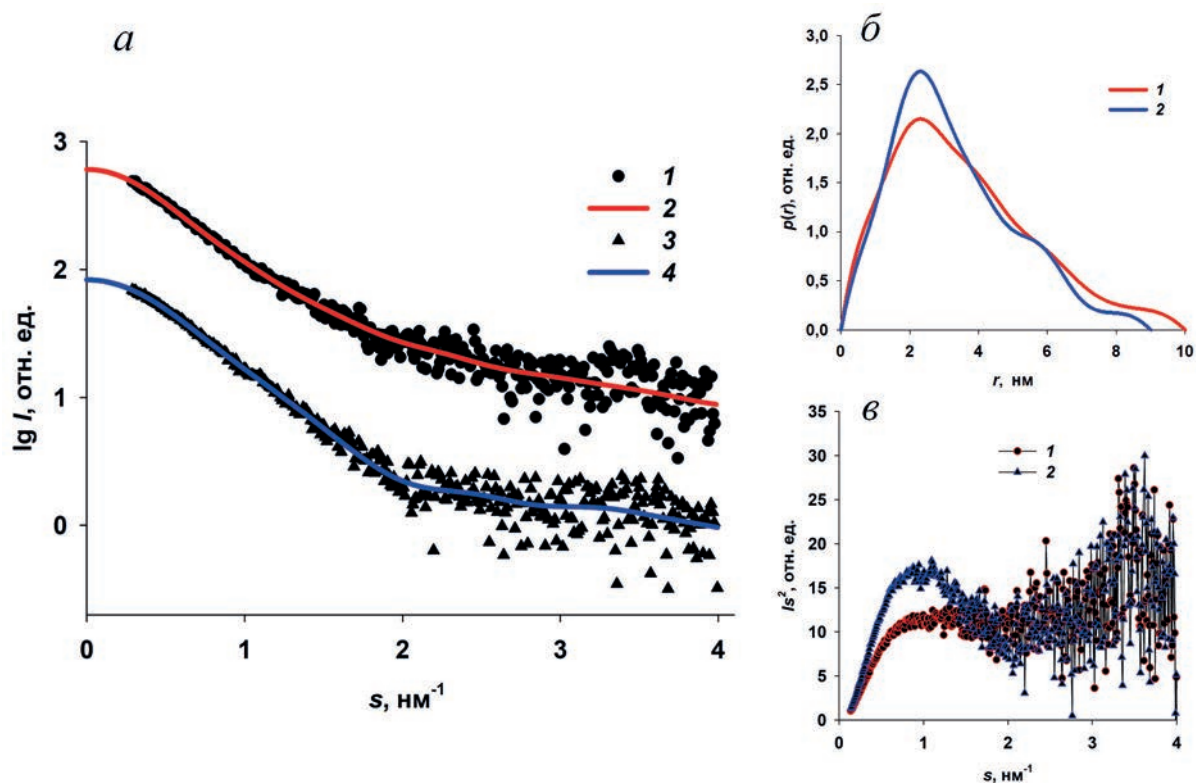


Рис. 2. Анализ кривых МУРР от гистоноподобных белков HU и IHF. *a* – Экспериментальные кривые малоуглового рассеяния от IHF (1) и HU (3) и кривые, рассчитанные от функций распределения по расстояниям $p(r)$ для IHF (2) и HU (4). Кривые разнесены попарно по вертикали на один логарифмический порядок для лучшей визуализации; *б* – функции распределения по расстояниям $p(r)$, рассчитанные для IHF (1) и HU (2); *в* – графики в координатах Кратки для IHF (1) и HU (2)

Таблица 2. Интегральные структурные характеристики гистоноподобных белков HU и IHF в растворе

Образец	V_p , нм ³	$M_{\text{эксп}}$, кДа	$M_{\text{теор}}$, кДа	R_g , нм	R_g^* , нм	D_{max} , нм
HU	45 ± 5	27 ± 3	20,5	2,62 ± 0,02	2,2	9,0
IHF	55 ± 5	33 ± 3	21,5	2,89 ± 0,03	2,1	10,0

Примечание. R_g^* — теоретические значения радиуса инерции R_g .

Белки HU и IHF были измерены при концентрациях 2 мг/мл и 4,8 мг/мл. Поскольку концентрационной зависимости в этом интервале концентраций не наблюдалось, для дальнейших расчётов и структурного моделирования использовались кривые с концентрацией 4,8 мг/мл, как наиболее информативные и с меньшими экспериментальными шумами (рис. 2, а; кривые 1 и 3).

Поскольку кривые МУРР для обоих белков имеют тенденцию увеличения интенсивности рассеяния в самых малых углах (больше — для IHF и в меньшей степени — для HU), можно предположить, что в растворах могут присутствовать олигомеры более высоких степеней — тетрамеры, гексамеры и другие. Рассчитанные с помощью программы PRIMUS такие инварианты, как породовский объём V_p и молекулярные массы (табл. 2), явно указывают на наличие некоторого количества олигомеров выше, чем димер, в обоих растворах: средние молекулярные массы $M_{\text{эксп}}$, определённые по кривым МУРР из соотношения $V_p/1,65$ [72], существенно превышают теоретические ($M_{\text{теор}}$).

Важнейшей структурной характеристикой белков является функция распределения по расстояниям $p(r)$ (рис. 2, б), связанная с интенсивностью рассеяния $I(s)$ преобразованием Фурье и необходимая для анализа структуры рассеивающих объектов:

$$p(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty s r I(s) \sin(sr) ds. \quad (4)$$

Функция $p(r)$ представляет собой совокупность расстояний между каждыми двумя точками в интервале между r и $r + dr$ и распространяется на весь интервал $[0, D_{\text{max}}]$, где D_{max} — максимальное расстояние между двумя точками внутри рассеивающей частицы. Таким образом, эта функция содержит информацию о форме, размере и структуре образца и позволяет оценивать его максимальный размер D_{max} из условия $p(r) = 0$ при $r > D_{\text{max}}$. Профиль $p(r)$ отражает основные особенности рассеивающего объекта и для монодисперсных соединений используется для *ab initio* восстановления структуры по данным МУРР [73]. В данном

случае такое восстановление невозможно из-за присутствия разных олигомерных форм белков HU и IHF в растворе. Однако с помощью функции $p(r)$ можно определить усреднённые максимальный размер D_{max} и радиус инерции R_g . В этом случае из-за полидисперсности образцов R_g определяется не с помощью графика Guinier [74], а как усреднённая величина, рассчитанная программой GNOM из функции распределения по расстояниям $p(r)$. Как видно из табл. 2, усреднённые значения R_g для HU и IHF заметно превышают полученные с помощью программы CRY SOL [66] теоретические значения R_g^* , особенно для белка IHF. Усреднённый максимальный размер D_{max} IHF больше такового для белка HU, хотя геометрические размеры их кристаллических структур (IHF PDB ID: 1ihf и HU PDB ID: 5l8z) равны соответственно для IHF — 6,6 нм и для HU — 7,3 нм. Для моделирования использовали структуру HU-белка *Spiroplasma melliferum*, имеющую одно из максимальных разрешений, полученных для белков данного класса [75], так как в доступных кристаллических структурах HUa (PDB ID: 1MUL, 2O97) не разрешены подвижные β-листные «руки», а сравнительный анализ, проведённый в работе Kamashev et al. [28], показал исключительно высокую консервативность пространственных структур HU-белков.

Представленные на рис. 2, б функции распределения по расстояниям $p(r)$ характерны для сильно вытянутых рассеивающих объектов — максимум смещён влево, и отношение D_{max} к размеру поперечного сечения, равного 2,3 нм и примерно соответствующего размеру белкового ядра, равно 3,9 для белка HU и 4,4 — для IHF. Максимумы на спаде функции $p(r)$ справа могут соответствовать рассеянию от повторяющихся в структуре форм, предположительно, димерам.

На рис. 2, в представлены также графики в координатах Кратки для обоих белков, позволяющие оценить степень свернутости/упорядоченности рассеивающих частиц. Колоколообразная форма максимума на графиках в целом свидетельствует об упорядоченных рассеивающих структурах, но для белка IHF этот

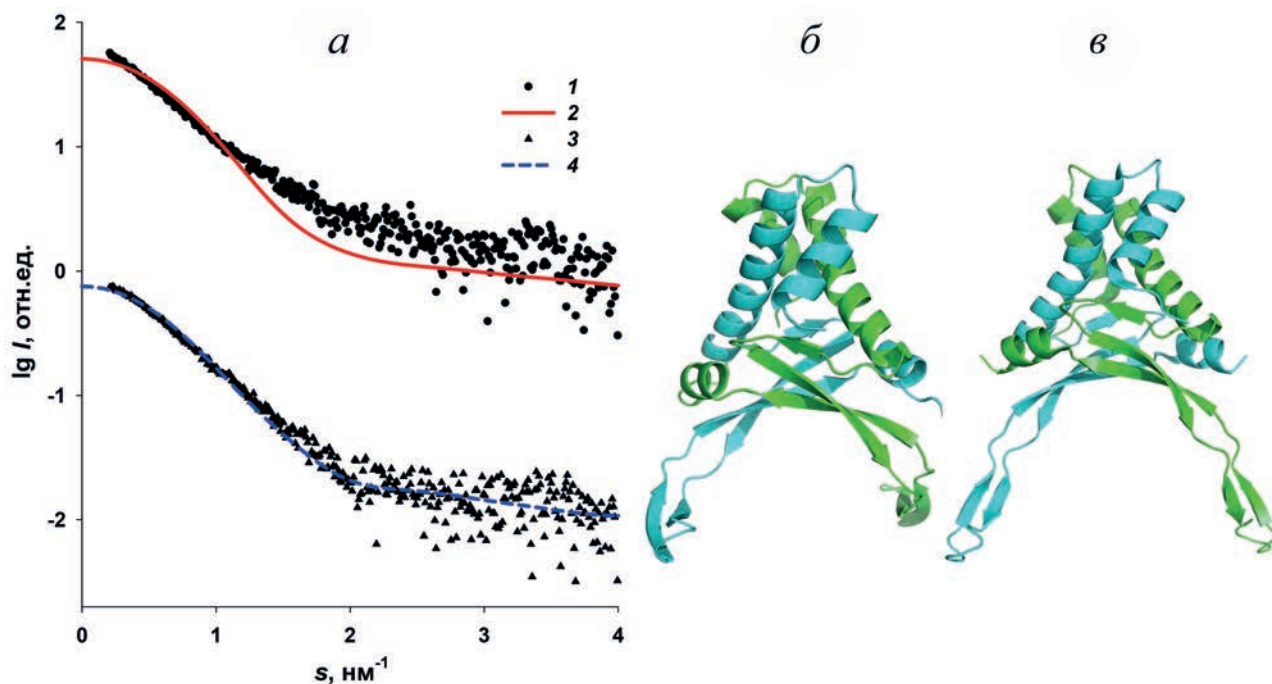


Рис. 3. Сравнение рассеяния от структур высокого разрешения белков IHF и HU с экспериментальными кривыми МУРР. *а* – Экспериментальные данные от IHF (1) и HU (3), приближение атомной моделью димера IHF (IHF PDB ID: 1ihf) (2) и HU (HU PDB ID: 5l8z) (4); *б* – структура высокого разрешения димера IHF; *в* – структура высокого разрешения димера HU. Мономеры белков IHF и HU показаны разными цветами

максимум менее выражен и характерен для более развёрнутой и вытянутой структуры [76].

Структурное моделирование белков HU и IHF по данным МУРР. Полученные нами интегральные структурные характеристики HU и IHF ясно свидетельствуют об олигомеризации белков в растворе. Хотя основным компонентом для обоих белков является димер, в растворе явно присутствуют олигомеры более высокого порядка, и особенно ярко это выражено для белка IHF. Ещё одним доказательством мультимеризации HU и IHF является сравнение теоретического рассеяния от структур высокого разрешения с экспериментальными кривыми МУРР (рис. 3).

Для белка IHF сравнение экспериментальной (рис. 3, кривая 1) и теоретической, рассчитанной программой CRY SOL [66] из атомных координат димера IHF (PDB ID: 1ihf) (рис. 3, кривая 2), кривых рассеяния свидетельствует об их несовпадении на всех диапазонах угловых векторов, что подтверждает сделанный выше вывод о наличии в растворе этого белка более высоких, чем димер, олигомеров, причём в достаточно больших количествах.

Для белка HU такое несовпадение не столь очевидно. Однако теоретическая кривая МУРР для этого белка (использовались атомные координаты его димера PDB ID: 5l8z) (рис. 3, кривая 4) не вполне удовлетворительно при-

ближает экспериментальные данные, полученные от раствора HU (рис. 3, кривая 3). В частности, в районе самых малых углов расчётная кривая систематически отличается от экспериментальной, что, по всей видимости, также связано с частичной мультимеризацией HU в растворе. Если в образце HU наряду с димерами предположить наличие определённого количества тетрамеров (использующих димер как функциональную строительную единицу), то возможно приблизить данные МУРР. Исходно был опробован тетрамер, образованный двумя соседними димерами в элементарной ячейке кристаллической структуры, полученный с помощью сервера PISA [77]. С учётом наличия в растворе определённого количества такого тетрамера экспериментальные данные удалось приблизить во всём диапазоне углов рассеяния (рис. 4, *а*; кривая 2). Полученные при этом программой OLIGOMER [63] объёмные доли димера и тетрамера в их равновесной смеси составили 75% и 25% соответственно.

Использование тетрамера из кристаллической структуры позволяет ограничить количество степеней свободы при моделировании четвертичной структуры мультимера в растворе, но в то же время такая конфигурация может быть артефактом. Стоит отметить, что в действительности в растворе может присутствовать тетрамер и с другой четвертичной

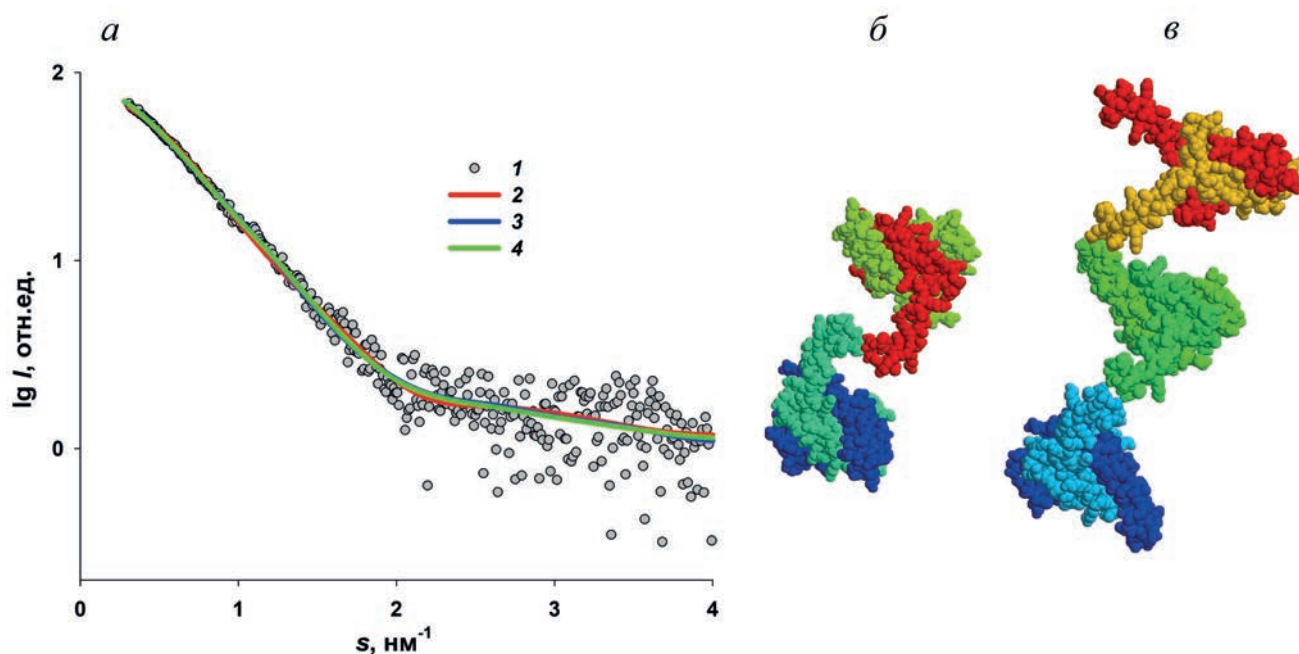


Рис. 4. Приближение экспериментальных данных МУРР от НУ равновесными смесями (а): 1 — экспериментальные данные; 2 — кривая рассеяния от смеси димеров и тетрамеров, полученных с помощью PISA; 3 — кривая рассеяния от смеси димеров и тетрамеров, полученных с помощью SASREFMX; 4 — кривая рассеяния от смеси димеров, тетрамеров и гексамеров, полученных в NEMIX. б — Модель тетрамера, построенная из двух димеров программой SASREFMX. Отдельные мономеры показаны разным цветом. в — Модель гексамера, построенная NEMIX из трёх кристаллографических димеров

структурой, имеющий интерфейс, отличный от кристаллической упаковки. С использованием программы расчёта четвертичной структуры с помощью метода молекулярной тектоники для приближения данных МУРР от полидисперсного раствора SASREFMX [67], использовавшей димер в качестве твёрдого тела, были построены несколько различных тетрамеров с разными интерфейсами димер-димер. Одна из полученных моделей, показанная на рис. 4, б, также приближает всю кривую МУРР (рис. 4, а; кривая 3). Несмотря на различия в конфигурации тетрамеров, полученные в отдельных восстановлении, объёмные доли тем не менее варьировались в узком диапазоне 20–23%. Такой вклад тетрамера хорошо согласуется с данными ДРС, предсказывающими наличие 17% частиц больших, чем димер, в растворе НУ. Были также предприняты попытки построить более длинные олигомеры (гексамеры) с помощью программы NEMIX, представляющую раствор как равновесную смесь димеров, тетрамеров и гексамеров. В этом случае приближение экспериментальных данных было также хорошим (рис. 4, а; кривая 4) при объёмных долях димера, тетрамера и гексамера 83%, 10% и 7% соответственно, что ещё лучше согласуется с данными ДРС. Получившийся интерфейс между отдельными димерами в гексамере (рис. 4, в) хорошо воспроизводит

тип контакта, полученный в модели тетрамера с помощью SASREFMX (рис. 4, б и в). Однако следует учесть, что полученные объёмные доли тетрамеров и гексамеров соответствуют меньшим молярным долям этих олигомеров. По сравнению с димером, молярные фракции снижаются в 2 и в 3 раза для тетрамера и гексамера соответственно. Таким образом, в молярном выражении присутствие высоких олигомеров достаточно ограничено.

Предположительное присутствие в растворе высоких олигомеров ИНФ (например, гексамеров) не позволяет провести структурное моделирование этого белка по той же схеме, как это было сделано для белка НУ. Например, анализ с помощью PISA не мог быть проведён, т.к. в элементарной ячейке кристаллографической модели (PDB ID: 1ihf) отсутствуют связанные фрагменты, состоящие из 6 мономеров белка.

Для моделирования гексамера ИНФ также не могла быть использована программа SASREFMX, поскольку её алгоритм предполагает возможное наличие только двух фракций в смеси (полная структура и один продукт диссоциации). В данном случае необходимо было принимать во внимание три фракции в растворе: димеры, тетрамеры и гексамеры, поэтому для структурного моделирования этого белка была использована программа NEMIX.

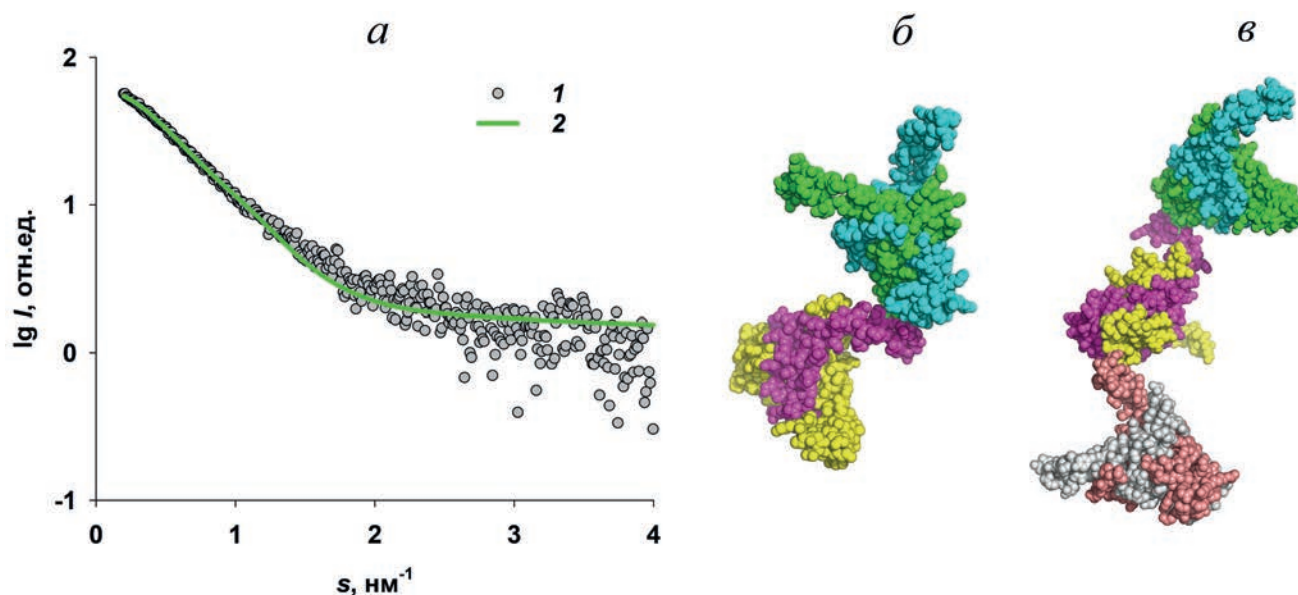


Рис. 5. Приближение экспериментальных данных МУРР от ИНФ равновесными смесями (а): 1 — экспериментальные данные; 2 — кривая рассеяния от смеси димеров, тетрамеров и гексамеров, полученных в NEMIX. б — Модель, состоящая из 2 димеров. в — Модель, состоящая из 3 димеров

С помощью программы NEMIX были построены тетрамер и гексамер, где в качестве строительного блока использовался димер. Программа перебирает все возможные конфигурации таких строительных блоков. Модели, построенные таким образом, представлены на рис. 5, б и в.

Для оценки объёмной доли компонентов в растворе белка ИНФ, полученных программой NEMIX (димера, тетрамера и гексамера), использовалась программа OLIGOMER. Хорошее приближение к экспериментальным данным для ИНФ (рис. 5, а; кривая 2) получилось при объёмных долях димера, тетрамера и гексамера 45%, 33% и 22%. Молекулярная масса такой смеси оказалась равной 38 кДа, что совпадает со значением этой величины, полученным по экспериментальным данным (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Организация и уплотнение ДНК служит нескольким целям. С одной стороны, уменьшение полезного объёма бактериальной хромосоме требуется, чтобы поместиться в клетке. С другой стороны, становится всё более очевидным, что ответ на стимулы окружающей среды в значительной степени опосредуется действием архитектурных белков — NAP. Эти белки, весьма разнообразные по своим структурным и функциональным особенностям (см. «Введение»), либо действуют однонаправленно, формируя репрессивные мультисуб-

комые комплексы, или, наоборот, проявляют антагонизм, противодействуя друг другу. Разнообразие функций, контролируемых NAP на разных этапах жизненного цикла клетки, приводит к изменению их экспрессии в разные периоды роста клеточной популяции [4, 7]. При этом в каждой фазе роста присутствует по крайней мере один из белков NAP, который экспрессируется максимально [13]. В соответствии с данными, приведёнными в работе Luijsterburg et al. [13] для 5 архитектурных белков *E. coli* (H-NS, HU, INF, Fis и Dps), на ранней экспоненциальной стадии доминирует Fis, на экспоненциальной — HU, в стационарной — INF 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, INF, Fis) и противодействующие влиянию соединяющих белков 1-й группы (H-NS). Эти NAP модулируют петлевую структуру нуклеоида, тем самым обеспечивая транскрипционно активную структуру нуклеоида во время фаз относительно быстрого роста [8–11]. И только в поздней стационарной фазе Dps образует кристаллы с ДНК и в результате трансформирует динамический нуклеоид в статическую, и, как предполагалось ранее, транскрипционно неактивную структуру, эффективно защищённую от внешних воздействий [13, 78]. Однако недавние исследования *in vitro* продемонстрирова-

ли, что Dps блокирует эндонуклеазы рестрикции, но не РНК-полимеразы от связывания с ДНК [79].

Для выяснения сложного механизма функциональных взаимоотношений среди белков NAP необходимо сначала детально разобраться в молекулярных особенностях функционирования индивидуальных белков. На настоящий момент основная структурная информация о белках NAP получена с помощью рентгеноструктурного анализа (РСА) и не отражает их поведения в растворе, о чём свидетельствуют структурные исследования методом ЯМР, проведённые, к сожалению, для незначительного числа белков. В этой ситуации именно малоугловые исследования могут выявить важные особенности поведения индивидуальных NAP в нативном (не кристаллическом) состоянии.

Результаты проведённых в данной работе исследований с помощью МУРР показывают, что белки HU и IHF олигомеризуются в растворе, причём в разной степени: для IHF характерно присутствие крупных олигомеров, состоящих из исходных димеров, выстроенных в цепочку. Это наблюдение очень важно с точки зрения взаимодействия этих белков с ДНК на поздних стадиях роста клеток. В работе Frenkiel-Krispin et al. [43] с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и томографической реконструкции в эксперименте *in vivo* было показано, что в начале стационарной фазы роста бактериальный хроматин претерпевает массивную реорганизацию и формируется в упорядоченные тороидальные структуры. Авторами был сделан вывод, что основным фактором такой реорганизации является белок Dps. Тороидальная форма хроматина характерна для периода 24-часового голодания бактерий *E. coli*. Далее, по мере голодания тороидальная морфология, по мнению авторов, действуя как структурный шаблон, способствует формированию гексагональных кристаллических решёток ДНК–Dps посредством эпитаксиального роста, и после 48-часового голодания тороидальные структуры полностью исчезают. Интерпретация, предложенная Frenkiel-Krispin et al. [43], несколько противоречива, поскольку в полученных тороидальных формах расстояние между чередующимися слоями, предположительно ДНК–Dps, оценивалось в 6,8–7,5 нм, что недостаточно для наличия в этих слоях белка Dps с размерами 9 нм в присутствии нитей ДНК толщиной порядка 2,4 нм, учитывая даже 20%-ную возможную усадку под электронным лучом. Нами с помощью МУРР и криоэлектронной микроскопии было показано, что в

зависимости от состава буфера *in vitro* кристаллическая упаковка комплекса ДНК–Dps в растворе может меняться от гексагональной до кубической с межслоевыми расстояниями соответственно 9,97 и 9,81 нм [44, 45], и ДНК в этих структурах располагается во впадинах между сферическими молекулами белка.

На основании анализа приведённых выше литературных данных и результатов нашей работы мы можем предложить гипотезу, которая несколько иначе представляет процесс формирования комплексов ДНК–Dps, где вместо крупных сферических молекул Dps в ранней стационарной фазе присутствует более компактный белок IHF, который доминирует в этой фазе и предшествует появлению Dps в доминантных количествах. Как мы показали, IHF образует олигомеры в виде цепочек, что предполагает возможность слоевой укладки ДНК, изгибая её в тороидальную структуру в соответствии с функциональной особенностью белка этого класса. Кроме того, геометрические размеры и форма IHF могут объяснить формирование тороидов в ранней стационарной фазе с межплоскостным расстоянием 6,8–7,5 нм, как это было определено Frenkiel-Krispin et al. [43]. В этом случае можно предположить, что в поздней стационарной фазе молекулы IHF заменяются на Dps, который даже без ДНК образует мультислоевую структуру с гексагональной упаковкой додекамера [80] и тем самым определяет структуру возникающего кристаллического комплекса ДНК–Dps.

Мы предполагаем, что именно таким образом белки-предшественники HU и IHF на разных стадиях жизненного цикла бактериальной клетки готовят условия для формирования защитного кристаллического комплекса ДНК–Dps. Будучи гомологами, схожими по форме, HU и IHF могут действовать и последовательно, и вместе. В целом, можно заключить, что переход от активного роста бактерий к стационарной фазе влечёт за собой скоординированный процесс, в котором энергезависимый динамический порядок хроматина последовательно заменяется равновесным кристаллическим порядком. Тем не менее возможен и обратный переход. Так, в работе Lee et al. [81] показано, что изменение факторов окружающей среды в физиологическом диапазоне, например, повышение pH и концентрации $MgCl_2$, приводит к переключению связывания ДНК с Dps на IHF-связывание, т.е. к возвращению к транскрипционно активной структуре нуклеоида, когда клетки могут перейти к экспоненциальной фазе и способны продолжать свою метаболическую активность.

Важно отметить, что подобные процессы в бактериальных клетках происходят посредством мультимеризации NAP. Эти процессы, а также формирование комплексов NAP с ДНК являются обратимыми (см. выше), так как бактерии нуждаются в динамической модуляции своих нуклеоидных структур на разных фазах роста, а также в ответ на изменения окружающей среды. При этом большая часть физиологически значимых белок-белковых и белок-геномных взаимодействий являются транзиентными, что позволяет белкам легко переходить из одного комплекса в другой при изменении условий среды.

Олигомеризация NAP вызывает интерес многих научных групп, и эти процессы ещё далеко не полностью исследованы. С помощью малоуглового рентгеновского рассеяния нам удалось не только детектировать образующиеся при сравнительно низких концентрациях белка (2–5 мг/мл) мультимеры HU и IHF, но также определить их пространственную структуру. Полученные нами результаты станут основой для дальнейшего изучения процессов биокристаллизации и помогут выявить важные в научном (понимание механизма действия) и практическом (разработка фармакологических ингибиторов) плане особенности

поведения индивидуальных NAP в нативном (не кристаллическом) состоянии.

Вклад авторов. Л.А. Дадинова, Э.В. Штыкова — концепция и руководство работой; Л.А. Дадинова, М.В. Петухов, А.М. Гордиенко, Г.С. Петерс — проведение экспериментов; В.А. Манувера, В.Н. Лазарев, Т.В. Ракитина, А.А. Можаяев — получение образцов; Л.А. Дадинова, М.В. Петухов, А.М. Гордиенко, В.А. Манувера, В.Н. Лазарев, Т.В. Ракитина, А.А. Можаяев, Г.С. Петерс, Э.В. Штыкова — написание текста; М.В. Петухов, Т.В. Ракитина, Э.В. Штыкова — редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 18-74-10071) в части исследований белка IHF и при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН в части исследований белка HU.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dame, R. T. (2005) The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin, *Mol. Microbiol.*, **56**, 858–870, doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04598.x.
2. Johnson, R. C., Johnson, L. M., Schmidt, J. W., and Gardner, J. F. (2005) *Major Nucleoid Proteins in the Structure and Function of the Escherichia coli Chromosome*, in *The Bacterial Chromosome* (Patrick Higgins, N., ed.) ACM Press, Washington, DC, pp. 65–131.
3. Travers, A., and Muskhelishvili, G. (2005) Bacterial chromatin, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **15**, 507–514, doi: 10.1016/j.gde.2005.08.006.
4. Dillon, S. C., and Dorman, C. J. (2010) Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression, *Nat. Rev. Microbiol.*, **8**, 185–195, doi: 10.1038/nrmicro2261.
5. Glinkowska, M., Waldminghaus, T., and Riber, L. (2021) Editorial: bacterial chromosomes under changing environmental conditions, *Front. Microbiol.*, **12**, 633466, doi: 10.3389/fmicb.2021.633466.
6. Norris, V., Kayser, C., Muskhelishvili, G., and Kontoghiorghi, Y. (2022) The roles of nucleoid-associated proteins and topoisomerases in chromosome structure, strand segregation and the generation of phenotypic heterogeneity in bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.*, fuac049, doi: 10.1093/femsre/fuac049.
7. Amemiya, H. M., Schroeder, J., and Freddolino, P. L. (2021) Nucleoid-associated proteins shape chromatin structure and transcriptional regulation across the bacterial kingdom, *Transcription*, **12**, 182–218, doi: 10.1080/21541264.2021.1973865.
8. Wold, S., Crooke, E., and Skarstad, K. (1996) The *Escherichia coli* Fis protein prevents initiation of DNA replication from oriC *in vitro*, *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3527–3532, doi: 10.1093/nar/24.18.3527.
9. Atlung, T., and Ingmer, H. (1997) H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression, *Mol. Microbiol.*, **24**, 7–17, doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.3151679.x.
10. Kamashev, D., and Rouviere-Yaniv, J. (2000) The histone-like protein HU binds specifically to DNA recombination and repair intermediates, *EMBO J.*, **19**, 6527–6535, doi: 10.1093/emboj/19.23.6527.
11. Shahul Hameed, U. F., Liao, C., Radhakrishnan, A. K., Huser, F., Aljedani, S. S., Zhao, X., Momin, A. A., Melo, F. A., Guo, X., Brooks, C., Li, Y., Cui, X., Gao, X., Ladbury, J. E., Jaremko, L.,

- Jaremko, M., Li, J., and Arold, S. T. (2019) H-NS uses an autoinhibitory conformational switch for environment-controlled gene silencing, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 2666-2680, doi: 10.1093/nar/gky1299.
12. Holowka, J., and Zakrzewska-Czerwinska, J. (2020) Nucleoid associated proteins: the small organizers that help to cope with stress, *Front. Microbiol.*, **11**, 590, doi: 10.3389/fmicb.2020.00590.
13. Luijsterburg, M. S., Noom, M. C., Wuite, G. J., and Dame, R. T. (2006) The architectural role of nucleoid-associated proteins in the organization of bacterial chromatin: a molecular perspective, *J. Struct. Biol.*, **156**, 262-272, doi: 10.1016/j.jsb.2006.05.006.
14. Wang, W., Li, G. W., Chen, C., Xie, X. S., and Zhuang, X. (2011) Chromosome organization by a nucleoid-associated protein in live bacteria, *Science*, **333**, 1445-1449, doi: 10.1126/science.1204697.
15. Hommais, F., Krin, E., Laurent-Winter, C., Soutourina, O., Malpertuy, A., Le Caer, J. P., Danchin, A., and Bertin, P. (2001) Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS, *Mol. Microbiol.*, **40**, 20-36, doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02358.x.
16. Tendeng, C., and Bertin, P. N. (2003) H-NS in Gram-negative bacteria: a family of multifaceted proteins, *Trends Microbiol.*, **11**, 511-518, doi: 10.1016/j.tim.2003.09.005.
17. Dorman, C. J., Hinton, J. C., and Free, A. (1999) Domain organization and oligomerization among H-NS-like nucleoid-associated proteins in bacteria, *Trends Microbiol.*, **7**, 124-128, doi: 10.1016/s0966-842x(99)01455-9.
18. Thanbichler, M., Wang, S. C., and Shapiro, L. (2005) The bacterial nucleoid: a highly organized and dynamic structure, *J. Cell. Biochem.*, **96**, 506-521, doi: 10.1002/jcb.20519.
19. Leonard, P. M., Smits, S. H., Sedelnikova, S. E., Brinkman, A. B., de Vos, W. M., van der Oost, J., Rice, D. W., and Rafferty, J. B. (2001) Crystal structure of the Lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus*, *EMBO J.*, **20**, 990-997, doi: 10.1093/emboj/20.5.990.
20. Beloin, C., Jeusset, J., Revet, B., Mirambeau, G., Le Hégarat, F., and Le Cam, E. (2003) Contribution of DNA conformation and topology in right-handed DNA wrapping by the *Bacillus subtilis* LrpC protein, *J. Biol. Chem.*, **278**, 5333-5342, doi: 10.1074/jbc.M207489200.
21. Calvo, J. M., and Matthews, R. G. (1994) The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*, *Microbiol. Rev.*, **58**, 466-490, doi: 10.1128/mr.58.3.466-490.1994.
22. Brinkman, A. B., Ettema, T. J., de Vos, W. M., and van der Oost, J. (2003) The Lrp family of transcriptional regulators, *Mol. Microbiol.*, **48**, 287-294, doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03442.x.
23. Losada, A., and Hirano, T. (2005) Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins, *Genes Dev.*, **19**, 1269-1287, doi: 10.1101/gad.1320505.
24. Nasmyth, K., and Haering, C. H. (2005) The structure and function of SMC and kleisin complexes, *Annu. Rev. Biochem.*, **74**, 595-648, doi: 10.1146/annurev.biochem.74.082803.133219.
25. Strunnikov, A. V. (2006) SMC complexes in bacterial chromosome condensation and segregation, *Plasmid*, **55**, 135-144, doi: 10.1016/j.plasmid.2005.08.004.
26. Swinger, K. K., and Rice, P. A. (2004) IHF and HU: flexible architects of bent DNA, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **14**, 28-35, doi: 10.1016/j.sbi.2003.12.003.
27. Kamashev, D. E., Rakitina, T. V., Matyushkina, D. S., Evsyutina, D. V., Vanyushkina, A. A., Agapova, Y. K., Anisimova, V. E., Drobyshev, A. L., Butenko, I. O., Pobeguts, O. V., and Fisunov, G. Y. (2019) Proteome of HU-Lacking *E. coli* studied by means of 2D Gel electrophoresis, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **45**, 366-373, doi: 10.1134/S1068162019050029.
28. Kamashev, D., Agapova, Y., Rastorguev, S., Talyzina, A. A., Boyko, K. M., Korzhenevskiy, D. A., Vlaskina, A., Vasilov, R., Timofeev, V. I., and Rakitina, T. V. (2017) Comparison of histone-like HU protein DNA-binding properties and HU/IHF protein sequence alignment, *PLoS One*, **12**, e0188037, doi: 10.1371/journal.pone.0188037.
29. Stojkova, P., Spidlova, P., and Stulik, J. (2019) Nucleoid-associated protein HU: A lilliputian in gene regulation of bacterial virulence, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **9**, 159, doi: 10.3389/fcimb.2019.00159.
30. Prieto, A. I., Kahramanoglou, C., Ali, R. M., Fraser, G. M., Seshasayee, A. S., and Luscombe, N. M. (2012) Genomic analysis of DNA binding and gene regulation by homologous nucleoid-associated proteins IHF and HU in *Escherichia coli* K12, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 3524-3537, doi: 10.1093/nar/gkr1236.
31. Remesh, S. G., Verma, S. C., Chen, J. H., Ekman, A. A., Larabell, C. A., Adhya, S., and Hammel, M. (2020) Nucleoid remodeling during environmental adaptation is regulated by HU-dependent DNA bundling, *Nat. Commun.*, **11**, 2905, doi: 10.1038/s41467-020-16724-5.
32. Hales, L. M., Gumpert, R. I., and Gardner, J. F. (1994) Determining the DNA sequence elements required for binding integration host factor to two different target sites, *J. Bacteriol.*, **176**, 2999-3006, doi: 10.1128/jb.176.10.2999-3006.1994.
33. Kostrewa, D., Granzin, J., Koch, C., Choe, H. W., Raghunathan, S., Wolf, W., Labahn, J., Kahmann, R., and Saenger, W. (1991) Three-dimensional structure of the *E. coli* DNA-binding protein FIS, *Nature*, **349**, 178-180, doi: 10.1038/349178a0.
34. Pan, C. Q., Finkel, S. E., Cramton, S. E., Feng, J. A., Sigman, D. S., and Johnson, R. C. (1996) Variable structures of Fis-DNA complexes determined by

- flanking DNA-protein contacts, *J. Mol. Biol.*, **264**, 675-695, doi: 10.1006/jmbi.1996.0669.
35. Shao, Y., Feldman-Cohen, L. S., and Osuna, R. (2008) Biochemical identification of base and phosphate contacts between Fis and a high-affinity DNA binding site, *J. Mol. Biol.*, **380**, 327-339, doi: 10.1016/j.jmb.2008.04.075.
 36. Azam, T. A., and Ishihama, A. (1999) Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity, *J. Biol. Chem.*, **274**, 33105-33113, doi: 10.1074/jbc.274.46.33105.
 37. Almiron, M., Link, A. J., Furlong, D., and Kolter, R. (1992) A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*, *Genes Dev.*, **6**, 2646-2654, doi: 10.1101/gad.6.12b.2646.
 38. Nair, S., and Finkel, S. E. (2004) Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase, *J. Bacteriol.*, **186**, 4192-4198, doi: 10.1128/JB.186.13.4192-4198.2004.
 39. Frenkiel-Krispin, D., and Minsky, A. (2006) Nucleoid organization and the maintenance of DNA integrity in *E. coli*, *B. subtilis* and *D. radiodurans*, *J. Struct. Biol.*, **156**, 311-319, doi: 10.1016/j.jsb.2006.05.014.
 40. Martinez, A., and Kolter, R. (1997) Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps, *J. Bacteriol.*, **179**, 5188-5194, doi: 10.1128/jb.179.16.5188-5194.1997.
 41. Reich, Z., Wachtel, E. J., and Minsky, A. (1994) Liquid-crystalline mesophases of plasmid DNA in bacteria, *Science*, **264**, 1460-1463, doi: 10.1126/science.8197460.
 42. Wolf, S. G., Frenkiel, D., Arad, T., Finkel, S. E., Kolter, R., and Minsky, A. (1999) DNA protection by stress-induced biocrystallization, *Nature*, **400**, 83-85, doi: 10.1038/21918.
 43. Frenkiel-Krispin, D., Ben-Avraham, I., Englander, J., Shimoni, E., Wolf, S. G., and Minsky, A. (2004) Nucleoid restructuring in stationary-state bacteria, *Mol. Microbiol.*, **51**, 395-405, doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03855.x.
 44. Dadinova, L. A., Chesnokov, Y. M., Kamyshinsky, R. A., Orlov, I. A., Petoukhov, M. V., Mozhaev, A. A., Soshinskaya, E. Y., Lazarev, V. N., Manuvera, V. A., Orekhov, A. S., Vasiliev, A. L., and Shtykova, E. V. (2019) 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.*, **593**, 1360-1371, doi: 10.1002/1873-3468.13439.
 45. Kamyshinsky, R., Chesnokov, Y., Dadinova, L., Mozhaev, A., Orlov, I., Petoukhov, M., Orekhov, A., Shtykova, E., and Vasiliev, A. (2019) Polymorphic protective Dps-DNA co-crystals by cryo electron tomography and small Angle X-Ray scattering, *Biomolecules*, **10**, 39, doi: 10.3390/biom10010039.
 46. Dadinova, L., Kamyshinsky, R., Chesnokov, Y., Mozhaev, A., Matveev, V., Gruzinov, A., Vasiliev, A., and Shtykova, E. (2021) Structural rearrangement of Dps-DNA complex caused by divalent Mg and Fe cations, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 6056, doi: 10.3390/ijms22116056.
 47. Сошинская Е. Ю., Дадина Л. А., Можаяев А. А., Штыкова Э. В. (2020) Влияние состава буфера на конформационную подвижность N-концевых фрагментов Dps и характер взаимодействия с ДНК. Исследование методом малоуглового рентгеновского рассеяния, *Кристаллография*, **65**, 886-895, doi: 10.31857/S0023476120060338.
 48. Dubrovin, E. V., Dadinova, L. A., Petoukhov, M. V., Soshinskaya, E. Y., Mozhaev, A. A., Klinov, D. V., Schaffer, T. E., Shtykova, E. V., and Batishchev, O. V. (2021) Spatial organization of Dps and DNA-Dps complexes, *J. Mol. Biol.*, **433**, 166930, doi: 10.1016/j.jmb.2021.166930.
 49. Shtykova, E. V., Petoukhov, M. V., and Mozhaev, A. A. (2022) Formation of iron oxide nanoparticles in the internal cavity of ferritin-like Dps protein: studies by anomalous X-ray scattering, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 511-523, doi: 10.1134/S0006297922060037.
 50. Loiko, N., Danilova, Y., Moiseenko, A., Kovalenko, V., Tereshkina, K., Tutukina, M., El'-Registan, G., Sokolova, O., and Krupyanskii, Y. (2020) Morphological peculiarities of the DNA-protein complexes in starved *Escherichia coli* cells, *PLoS One*, **15**, e0231562, doi: 10.1371/journal.pone.0231562.
 51. Krupyanskii, Y. F., Kovalenko, V. V., Loiko, N. G., Generalova, A. A., Moiseenko, A. V., Tereshkin, E. V., Sokolova, O. S., Tereshkina, K. B., El'-Registan, G. I., and Popov, A. N. (2022) Architecture of condensed DNA in the nucleoid of *Escherichia coli* bacterium, *Biophysics*, **67**, 506-517, doi: 10.1134/S0006350922040133.
 52. Grant, R. A., Filman, D. J., Finkel, S. E., Kolter, R., and Hogle, J. M. (1998) The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA, *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 294-303, doi: 10.1038/nsb0498-294.
 53. Gupta, S., and Chatterji, D. (2003) Bimodal protection of DNA by *Mycobacterium smegmatis* DNA-binding protein from stationary phase cells, *J. Biol. Chem.*, **278**, 5235-5241, doi: 10.1074/jbc.M208825200.
 54. Ceci, P., Cellai, S., Falvo, E., Rivetti, C., Rossi, G. L., and Chiancone, E. (2004) DNA condensation and self-aggregation of *Escherichia coli* Dps are coupled phenomena related to the properties of the N-terminus, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 5935-5944, doi: 10.1093/nar/gkh915.
 55. Agapova, Y. K., Altukhov, D. A., Timofeev, V. I., Stroylov, V. S., Mityanov, V. S., Korzhenevskiy, D. A., Vlaskina, A. V., Smirnova, E. V., Bocharov, E. V., and Rakitina, T. V. (2020) Structure-based inhibitors targeting the alpha-helical domain of the *Spiroplasma melliferum* histone-like HU protein, *Sci. Rep.*, **10**, 15128, doi: 10.1038/s41598-020-72113-4.

56. Svergun, D. I., Koch, M. H., Timmins, P. A., and May, R. P. (2013) *Small Angle X-ray and Neutron Scattering from Solutions of Biological Macromolecules*, Oxford University Press, London.
57. Nash, H. A., Robertson, C. A., Flamm, E., Weisberg, R. A., and Miller, H. I. (1987) Overproduction of *Escherichia coli* integration host factor, a protein with nonidentical subunits, *J. Bacteriol.*, **169**, 4124-4127, doi: 10.1128/jb.169.9.4124-4127.1987.
58. Klock, H. E., and Lesley, S. A. (2009) The Polymerase Incomplete Primer Extension (PIPE) method applied to high-throughput cloning and site-directed mutagenesis, *Methods Mol. Biol.*, **498**, 91-103, doi: 10.1007/978-1-59745-196-3_6.
59. Vorgias, C. E., and Wilson, K. S. (1991) A rapid purification procedure of recombinant integration host factor from *Escherichia coli*, *Protein Expr. Purif.*, **2**, 317-320, doi: 10.1016/1046-5928(91)90089-2.
60. Peters, G. S., Zakharchenko, O. A., Konarev, P. V., Karmazikov, Y. V., Smirnov, M. A., Zabelin, A. V., Mukhamedzhanov, E. H., Veligzhanin, A. A., Blagov, A. E., and Kovalchuk, M. V. (2019) The small-angle X-ray scattering beamline BioMUR at the Kurchatov synchrotron radiation source, *Nuclear Instr. Methods Phys. Res. Sec. A Accelerat. Spectrom. Detect. Assoc. Equip.*, **945**, 162616, doi: 10.1016/j.nima.2019.162616.
61. Peters, G. S., Gaponov, Y. A., Konarev, P. V., Marchenkova, M. A., Ilina, K. B., Volkov, V. V., Pisarevskiy, Y. V., and Kovalchuk, M. V. (2022) Upgrade of the BioMUR beamline at the Kurchatov synchrotron radiation source for serial small-angle X-ray scattering experiments in solutions, *Nuclear Instr. Methods Phys. Res. Sec. A Accelerat. Spectrom. Detect. Assoc. Equip.*, **1025**, 166170, doi: 10.1016/j.nima.2021.166170.
62. Hammersley, A. P. (2016) FIT2D: a multi-purpose data reduction, analysis and visualization program, *J. Appl. Cryst.*, **49**, 646-652, doi: 10.1107/S1600576716000455.
63. Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M. H. J., and Svergun, D. I. (2003) PRIMUS – a Windows-PC based system for small-angle scattering data analysis, *J. Appl. Cryst.*, **36**, 1277-1282, doi: 10.1107/S0021889803012779.
64. Manalastas-Cantos, K., Konarev, P. V., Hajizadeh, N. R., Kikhney, A. G., Petoukhov, M. V., Molodenskiy, D. S., Panjkovich, A., Mertens, H. D. T., Gruzinov, A., Borges, C., Jeffries, C. M., Svergun, D. I., and Franke, D. (2021) ATSAS 3.0: expanded functionality and new tools for small-angle scattering data analysis, *J. Appl. Cryst.*, **54**, 343-355, doi: 10.1107/S1600576720013412.
65. Svergun, D. I. (1992) Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria, *J. Appl. Cryst.*, **25**, 495-503, doi: 10.1107/S0021889892001663.
66. Svergun, D. I., Barberato, C., and Koch, M. H. J. (1995) CRY SOL – a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates, *J. Appl. Cryst.*, **28**, 768-773, doi: 10.1107/S0021889895007047.
67. Petoukhov, M. V., Billas, I. M., Takacs, M., Graewert, M. A., Moras, D., and Svergun, D. I. (2013) Reconstruction of quaternary structure from X-ray scattering by equilibrium mixtures of biological macromolecules, *Biochemistry*, **52**, 6844-6855, doi: 10.1021/bi400731u.
68. Winardhi, R. S., Yan, J., and Kenney, L. J. (2015) H-NS regulates gene expression and compacts the nucleoid: insights from single-molecule experiments, *Biophys. J.*, **109**, 1321-1329, doi: 10.1016/j.bpj.2015.08.016.
69. Hammel, M., Amlanjyoti, D., Reyes, F. E., Chen, J. H., Parpana, R., Tang, H. Y., Larabell, C. A., Tainer, J. A., and Adhya, S. (2016) HU multimerization shift controls nucleoid compaction, *Sci. Adv.*, **2**, e1600650, doi: 10.1126/sciadv.1600650.
70. Huang, L., Zhang, Z., and McMacken, R. (2021) Interaction of the *Escherichia coli* HU protein with various topological forms of DNA, *Biomolecules*, **11**, 1724, doi: 10.3390/biom11111724.
71. Frenkiel-Krispin, D., Levin-Zaidman, S., Shimoni, E., Wolf, S. G., Wachtel, E. J., Arad, T., Finkel, S. E., Kolter, R., and Minsky, A. (2001) Regulated phase transitions of bacterial chromatin: a non-enzymatic pathway for generic DNA protection, *EMBO J.*, **20**, 1184-1191, doi: 10.1093/emboj/20.5.1184.
72. Petoukhov, M. V., Franke, D., Shkumatov, A. V., Tria, G., Kikhney, A. G., Gajda, M., Gorba, C., Mertens, H. D. T., Konarev, P. V., and Svergun, D. I. (2012) New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis, *J. Appl. Crystallogr.*, **45**, 342-350, doi: 10.1107/S0021889812007662.
73. Svergun, D. I. (1999) Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing, *Biophys. J.*, **76**, 2879-2886, doi: 10.1016/S0006-3495(99)77443-6.
74. Guinier, A. (1939) La diffraction des rayons X aux tres petits angles; application a l'etude de phenomenes ultramicroscopiques, *Ann. Phys. (Paris)*, **12**, 161-237, doi: 10.1051/anphys/193911120161.
75. Boyko, K. M., Rakitina, T. V., Korzhenevskiy, D. A., Vlaskina, A. V., Agapova, Y. K., Kamashev, D. E., Kleymenov, S. Y., and 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, doi: 10.1038/srep36366.
76. Jacques, D. A., Guss, J. M., Svergun, D. I., and Trehwella, J. (2012) Publication guidelines for structural modelling of small-angle scattering data from biomolecules in solution, *Acta Crystallogr. Sec. D*, **68**, 620-626, doi: 10.1107/S0907444912012073.

77. Krissinel, E., and Henrick, K. (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state, *J. Mol. Biol.*, **372**, 774-797, doi: 10.1016/j.jmb.2007.05.022.
78. Stephani, K., Weichart, D., and Hengge, R. (2003) Dynamic control of Dps protein levels by ClpXP and ClpAP proteases in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.*, **49**, 1605-1614, doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03644.x.
79. Janissen, R., Arens, M. M. A., Vtyurina, N. N., Rivai, Z., Sunday, N. D., Eslami-Mossallam, B., Gritsenko, A. A., Laan, L., de Ridder, D., Artsimovitch, I., Dekker, N. H., Abbondanzieri, E. A., and Meyer, A. S. (2018) Global DNA compaction in stationary-phase bacteria does not affect transcription, *Cell*, **174**, 1188-1199. e1114, doi: 10.1016/j.cell.2018.06.049.
80. Ren, B., Tibbelin, G., Kajino, T., Asami, O., and Ladenstein, R. (2003) The multi-layered structure of Dps with a novel di-nuclear ferroxidase center, *J. Mol. Biol.*, **329**, 467-477, doi: 10.1016/s0022-2836(03)00466-2.
81. Lee, S. Y., Lim, C. J., Droge, P., and Yan, J. (2016) Regulation of bacterial DNA packaging in early stationary phase by competitive DNA binding of Dps and IHF, *Sci. Rep.*, **5**, 18146, doi: 10.1038/srep18146.

NUCLEOID-ASSOCIATED PROTEINS HU AND IHF: OLIGOMERIZATION IN SOLUTION AND HYDRODYNAMIC PROPERTIES

**L. A. Dadinova¹, M. V. Petoukhov¹, A. M. Gordienko¹, V. A. Manuvera^{2,3}, V. N. Lazarev^{2,3},
T. V. Rakitina^{4,5}, A. A. Mozhaev^{1,4}, G. S. Peters⁵, and E. V. Shtykova^{1*}**

¹ Shubnikov Institute of Crystallography of Federal Scientific Research Centre "Crystallography and Photonics", Russian Academy of Sciences, 119333 Moscow, Russia; shtykova@ns.crys.ras.ru

² Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency, 119435 Moscow, Russia

³ Moscow Institute of Physics and Technology (State University), 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

⁴ Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia

⁵ NRC "Kurchatov Institute", 123182 Moscow, Russia

The structure and function of the bacterial nucleoid is controlled by nucleoid-associated NAP proteins. In any phase of growth, various NAPs, acting sequentially, condense the nucleoid and provide its transcriptionally active structure. However, in the late stationary phase, only one of the NAPs, the Dps protein, is strongly expressed, and DNA–protein crystals are formed that transform the nucleoid into a static, transcriptionally inactive structure, effectively protected from external influences. The discovery of crystal structures in living cells and the association of this phenomenon with bacterial resistance to antibiotics has aroused great interest in studying this phenomenon. The aim of this work is to obtain and compare the structures of two related NAPs (HU and IHF), since they are the ones that accumulate in the cell at the late stationary stage of growth, which precedes the formation of the protective DNA–Dps crystalline complex. For structural studies, two complementary methods were used in the work: small-angle X-ray scattering (SAXS) as the main method for studying the structure of proteins in solution and dynamic light scattering as an additional one. Various approaches and computer programs were used to interpret the SAXS data, which made it possible to determine the macromolecular characteristics and obtain reliable structural 3D models of various oligomeric forms of the HU and IHF proteins. It was shown that these proteins oligomerize in solution to varying degrees, and IHF is characterized by the presence of large oligomers consisting of initial dimers arranged in a chain. It was suggested that just before Dps expression, it is this protein that forms the toroidal structures previously observed *in vivo* and prepares the platform for the formation of DNA–Dps crystals. The results obtained are necessary for further study of the phenomenon of biocrystal formation in bacterial cells and finding ways to overcome the resistance of various pathogens to external conditions.

Keywords: nucleoid-associated proteins, histone-like proteins HU and IHF, oligomerization, small-angle X-ray scattering, dynamic light scattering