

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.113.7

АНАЛИЗ ЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА ДНК-БЕЛКОВЫХ КРИСТАЛЛОВ
*IN VITRO*А.В. Моисеенко¹, Н.Г. Лойко^{2, 3}, О.В. Чертков¹, А.В. Феофанов^{1, 4}, Ю.Ф. Крупянский³,
О.С. Соколова^{1, *}¹Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;²ФИЦ «Биотехнологии РАН», Российская академия наук, Россия, г. Москва, 119071, Ленинский просп. д. 33, стр. 2;³ФИЦ «Химической физики им. Н.Н. Семенова РАН», Российская академия наук, Россия, г. Москва, 119991, Москва, ул. Косыгина д. 4;⁴Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

*e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru

Универсальным ответом бактерий *Escherichia coli* на стресс является усиление синтеза специфических гистоноподобных белков Dps, которые связывают и защищают бактериальную ДНК. В результате в цитоплазме голодающих бактерий могут наблюдаться трехмерные кристаллоподобные массивы. Мы подобрали условия для получения ко-кристаллов ДНК-Dps *in vitro* и изучили их элементный состав с использованием аналитической электронной микроскопии. Было обнаружено, что Dps в составе ко-кристалла сохраняет свою ферритин-подобную активность, то есть может стимулировать окисление ионов Fe^{2+} до Fe^{3+} и способствовать накоплению железа в форме Fe_2O_3 .

Ключевые слова: *E. coli*, нуклеоид, Dps, электронная аналитическая микроскопия, биокристаллизация, флуоресцентная микроскопия

Белок Dps продуцируется в клетках *Escherichia coli*, относится к классу оксидоредуктаз, окисляющих ионы металлов [1]. Недавний скрининг выявил в бактериальной ДНК области генома, преимущественно ответственные за связывание с Dps [2]. Сайты, имеющие сродство к Dps, перекрываются с сайтами, ответственными за взаимодействие с другими ДНК-связывающими белками, в том числе РНК-полимеразами. Таким образом, предполагается, что Dps может модулировать транскрипцию бактериальной хромосомы [3], препятствуя синтезу РНК с некоторых участков посредством конкуренции с РНК-полимеразой или, наоборот, конкурируя с ингибиторами, активировать транскрипцию. Dps взаимодействует с ДНК, не ингибируя транскрипцию, но ограничивая доступ к ДНК других белков, таких как эндонуклеазы рестрикции.

Синтез белка Dps усиливается при переходе *E. coli* в стационарную фазу роста [1]. При этом образуются высоко упорядоченные и стабильные ко-кристаллы с ДНК. Внутри кристаллов бактериальная ДНК конденсирована и

защищена от различных повреждений. Кроме этого, Dps защищает генетический аппарат бактериальной клетки от ультрафиолетового и гамма-излучения, температурного стресса и кислотно-основного воздействия [4].

Этот механизм, видимо, обеспечивает возобновление роста бактериальных клеток при улучшении внешних условий [5]. Плотные упакованные конденсированную ДНК с Dps различной морфологии находили при исследовании ультратонких срезов покоящихся клеток *E. coli*, архей, эндоспор *B. thuringiensis* и *Br. laterosporus*, экзоспор стрептомицетов, клеток артробактера и псевдомонад [6]. Клетки-персисторы, содержащиеся в популяциях патогенных бактерий и обладающие полирезистентностью к лекарственным препаратам, также вероятно обладают кристаллическим нуклеоидом, что, возможно, и обеспечивает их устойчивость к антибиотикам.

Предполагают, что эффективное образование ко-кристаллов ДНК-Dps вызвано различным содержанием двухвалентных катионов в последовательных фазах жизнедеятельности

бактериальной клетки. В частности, в лог-фазе взаимодействие ДНК-Dps может ингибироваться пониженным содержанием ионов Mg^{2+} , а в стационарной фазе — наоборот, активироваться повышенным содержанием этих ионов [7]. Ранее было также показано, что добавление ионов железа Fe^{2+} стабилизирует основную функциональную олигомерную форму белка Dps [8]. Однако влияние двухвалентных катионов на структуру ко-кристаллов ДНК-Dps *in vitro* до сих пор не было изучено. Также неизвестна истинная конформация ДНК в нанокристаллических комплексах ДНК-Dps. Мы использовали флуоресцентно-меченый фрагмент ДНК для его визуализации в составе ко-кристалла, что позволило подобрать условия для получения тонких ко-кристаллов ДНК-Dps *in vitro* [9]. В данной работе мы изучили элементный состав ко-кристаллов ДНК-Dps, полученных в присутствии ионов железа и цинка, с использованием аналитической электронной микроскопии.

Материалы и методы

Сборка меченой ДНК-матрицы. Флуоресцентно-меченую ДНК-матрицу длиной 165 п.н., содержащую последовательность s603, получали при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР), как описано ранее [9]. Очистку ДНК осуществляли с помощью набора для очистки ПЦР-продуктов (Sigma), следуя инструкциям производителя. Концентрацию ДНК определяли по оптической плотности при длине волны 260 нм. Концентрация составила 0,25 мкг/мкл. В результате была получена меченая ДНК, имеющая следующую последовательность:

AGCGACACCGGCACTGGGCCCCGGTTCG
CGCTCCCGCCTTCCGTGTGTTGTCGTCTCT
CGGGCGTCTAAGTACGCTTAGCGCACGGTA
GAGCGCAATCCAAGGCTAACCACCGTGCAT
CGATGTTGAAAGAGGCCCTCCGTCCTTATTA
CTTCAAGTCCCTGGGGT

Экспрессию и очистку белка Dps проводили по протоколу, описанному ранее [8]. Для этого штамм *E. coli* BL21-Gold трансформировали плазмидой pET-DPS. Культуральную среду LB (Lysogeny broth; с добавлением 150 мг/л ампициллина и 10 мМ лактозы) инокулировали единичной колонией бактерий и инкубировали 16–18 ч в шейкере-инкубаторе при 37 °С. Клетки осаждали центрифугированием (5000 g, 15 мин), ресуспендировали в 0,1 М Трис-НСl буфере (pH 7,5) и разрушали ультразвуковым дезинтегратором. Лизат центрифугировали при 13000g 10 мин. Супернатант очищали с помощью ионообменной хроматографии на смоле ДЕАЕ-Сефадекс-A25. Дальнейшую очистку проводили с

помощью гель-фильтрации на Сефадексе-G200 и высаливания белка с последующим диализом против буфера, содержащего 0,2М NaCl, 20 мМ Tris-HCl (pH 7,5).

Получение ко-кристаллов ДНК-Dps *in vitro*.

Ко-кристаллы получали путем смешивания очищенного белка Dps (3,4 мг/мл) с линейным флуоресцентно-меченым фрагментом ДНК (0,25 нг/мкл). Для флуоресцентных исследований 3 мкл раствора Dps добавляли к 3 мкл ДНК в силиконовой лунке с последующим добавлением 3 мкл водного раствора ЭДТА (0,14 мМ) и 1 мкл водного раствора (10 мМ) одной из солей: $FeCl_3$, $K_4[Fe(CN)_6]$ либо $ZnSO_4$. Соотношение Dps/ДНК составило 14:1.

Для исследований с помощью ПЭМ (просвечивающей электронной микроскопии), ко-кристаллы формировали непосредственно на сетке для электронной микроскопии. Для этого каплю (1,5 мкл) очищенного Dps добавляли к капле (1,5 мкл) ДНК, нанесенной на покрытую углеродом медную сетку (SPI, США). Далее для образования кристаллов к смеси добавляли 1,5 мкл ЭДТА (0,14 мМ). Для изучения влияния на кристаллы катионов железа и цинка к смеси добавляли 0,5 мкл 10 мМ одного из растворов: $FeCl_3$, $K_4[Fe(CN)_6]$ или $ZnSO_4$.

Конфокальная микроскопия. Оценку эффективности взаимодействия Dps с ДНК производили флуоресцентным методом в лунках камеры, прикрепленной к покровному стеклу. Изображения получали с помощью инвертированного конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM710-Confocor3 (Zeiss, Германия) с использованием водоиммерсионного объектива C-Apochromat 40x/1,20. Флуоресценцию возбуждали лазером с длиной волны 514,5 нм и детектировали в диапазоне 524–639 нм. Латеральное и аксиальное разрешение составляли соответственно 0,2 и 0,6 мкм.

Электронная микроскопия. ПЭМ-исследования были выполнены на просвечивающем электронном микроскопе JEM-2100 (JEOL, Япония) с катодом из гексаборита лантана (LaB_6) при ускоряющем напряжении 200 кВ. Объективная апертура — 40 мкм. Изображения были получены на детекторе Gatan Ultrascan 1000FTXP с размером матрицы 2K×2K при реальном увеличении 48200× (для образцов с $FeCl_3$ и $K_4[Fe(CN)_6]$) и 6425× (для образцов с $ZnSO_4$).

Спектроскопия характеристических потерь энергии электронов (СХПЭЭ). Для получения спектров использовался спектрометр Gatan GIF Quantum ER (Gatan, США). Входная апертура спектрометра — 5 мм. Ожидаемое спектральное разрешение, измеренное по полуширине пика

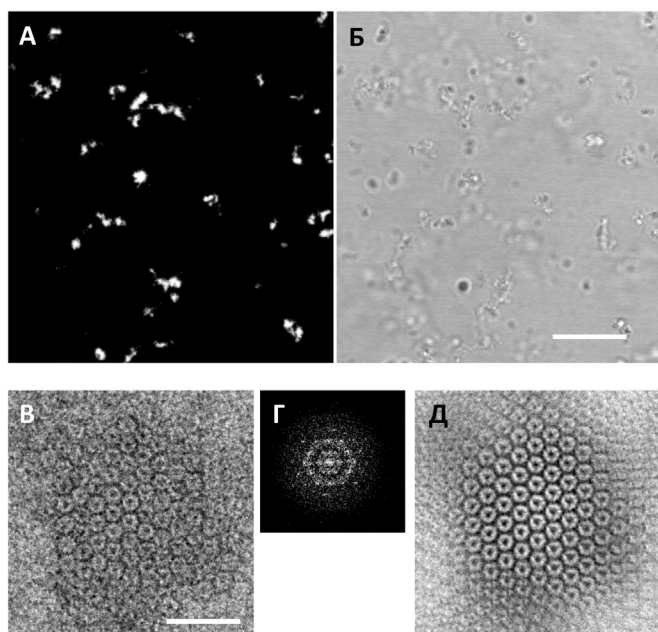


Рис. 1. Получение ко-кристаллов ДНК-Dps в присутствии ЭДТА и FeCl_3 . (А) Ко-кристаллы ДНК-Dps, наблюдаемые в конфокальный микроскоп, флуоресцентное изображение; (Б) изображение той же области в проходящем свете; масштабный отрезок — 50 мкм. (В) Ко-кристалл ДНК-Dps в ПЭМ с окраской уранилацетатом; масштабный отрезок — 50 нм. (Г) Преобразование Фурье от выбранного участка; (Д) фильтрованное проекционное изображение ко-кристалла ДНК-Dps.

нулевых потерь, не хуже, чем 1,2 эВ.

Спектрометр использовался в дифракционно-связанном режиме: проекционная система микроскопа в режиме энергетически фильтрованной просвечивающей электронной микроскопии (ЭФПЭМ), угол сбора сигнала ограничен объективной апертурой до 10 мрад. Участок на образце для набора спектров ограничивался с помощью селективной дифракционной апертуры (SAD), либо с помощью входной апертуры спектрометра в случае малых увеличений.

Для детектирования железа выбран пик Fe L_{2,3} на смещении 708 эВ, для детектирования цинка — пик Zn L_{2,3} на смещении 1020 эВ. У L_{2,3}-пигов переходных металлов в спектрах СХПЭЭ хорошее соотношение сигнал-шум, что позволяет обнаруживать даже небольшие концентрации атомов этих элементов. Однако малое сечение рассеяния по L_{2,3}-пикам и их характерная структура («white lines») затрудняют точное вычисление сечений рассеяния и, как следствие, количественный анализ содержания выбранных элементов [10].

Для получения спектров в области L_{2,3}-пика железа использовались следующие параметры: увеличение микроскопа 48200×, дисперсия 0,05 эВ/канал при 2048 каналах, диапазон спектра

698–800 эВ, время экспозиции одного спектра 30 с, суммирование по 10 спектрам.

Для набора спектров в области L_{2,3}-пика цинка использовалось увеличение 6425×, дисперсия 0,25 эВ/канал при 2048 каналах, диапазон спектра 870–1382 эВ, время экспозиции 5 с, суммирование по 10 спектрам, объективная апертура 60 мкм, ограничивающая угол сбора сигнала до не менее, чем 20 мрад.

На каждом из образцов был произведен предварительный локальный контроль толщины образца методом ЭФПЭМ-изображений для оценки необходимости введения поправок на многократное рассеяние. Толщина всех образцов находится в пределах 0,2 длин свободного пробега электрона для данного ускоряющего напряжения. Поэтому поправки на многократное рассеяние не применяли.

Во всех приведенных спектрах СХПЭЭ удалена фоновая составляющая. Фоновую составляющую экстраполировали с помощью степенной функции с входным окном 698–705 эВ для спектров железа и 870–1000 эВ для спектров цинка. Обработка спектров была произведена в программном пакете «Digital Micrograph» (Gatan, США).

Результаты и обсуждение

Процесс биокристаллизации нуклеоида при голодании прокариотических клеток к настоящему времени частично изучен методом криоэлектронной микроскопии [11] и рентгеноструктурного анализа [12]. Однако до сих пор существуют разногласия по поводу истинной конформации ДНК нанокристаллических комплексов ДНК-Dps в клетках. Данный вопрос является важным, поскольку имеет отношение к проблеме организации генетического материала, которая влияет на трансляцию и экспрессию генов и, ввиду этого, критически важна для функционирования организмов.

Использование флуоресцентно-меченого фрагмента ДНК позволило нам непосредственно в растворе наблюдать ко-кристаллы ДНК-Dps (рис. 1). Так как на формирование ко-кристаллов влияет концентрация двухвалентных катионов [7], мы добавляли к смеси хелатирующий агент ЭДТА в концентрации 0,14 мМ и сразу же (не более, чем через 2–5 мин) наблюдали образование небольших флуоресцентных образований (таблица). Добавление двухвалентных катионов Zn^{2+} в форме ZnCl_2 или Fe^{2+} в форме $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ приводило к некоторому увеличению линейных размеров флуоресцентных образований, а при использовании трехвалентного Fe^{3+} в форме FeCl_3 размеры образований оказа-

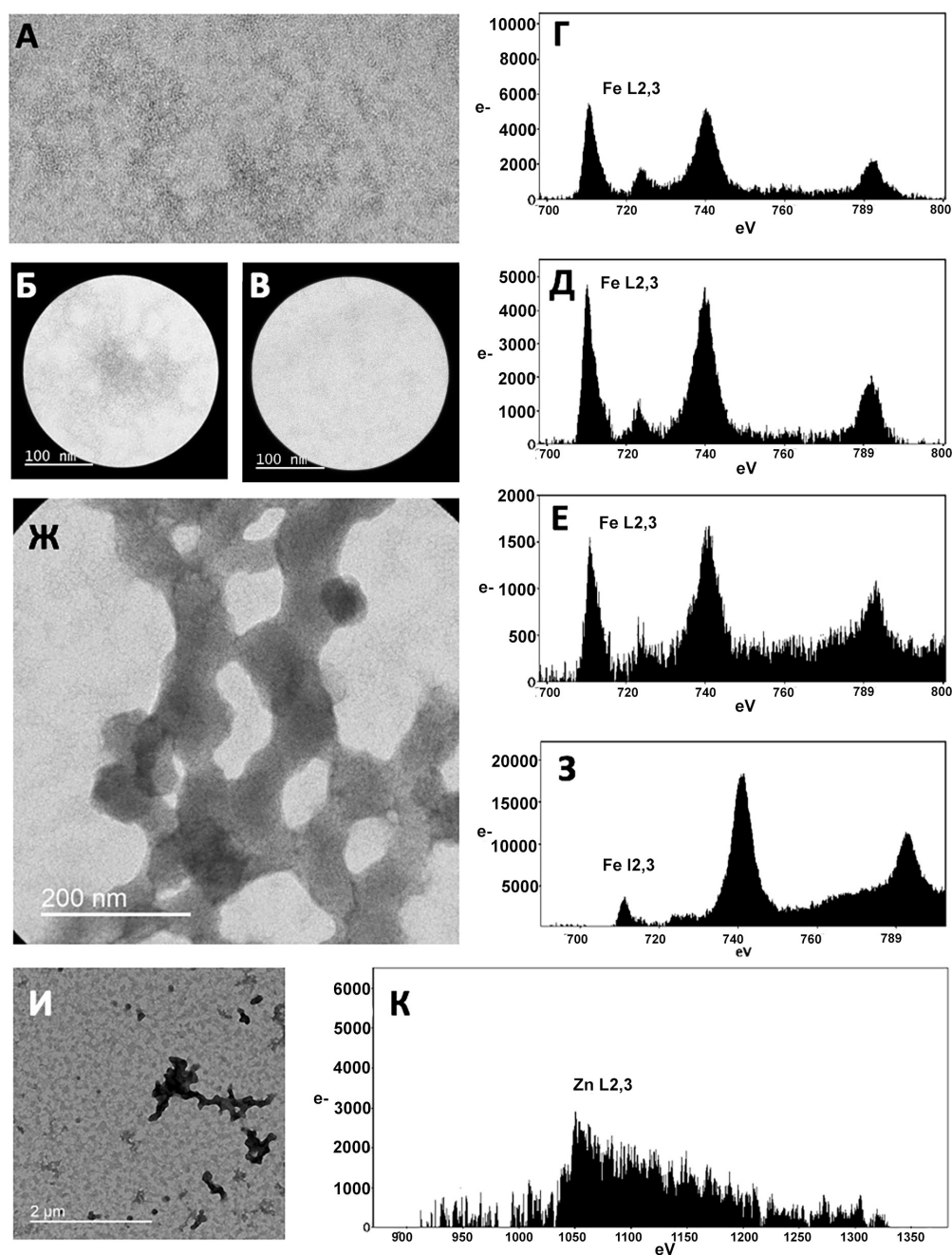


Рис. 2. Элементный анализ ко-кристаллов ДНК-Dps. (А) ПЭМ-изображение участка образца с FeCl_3 , содержащего ко-кристаллы ДНК-Dps; масштабный отрезок — 100 нм. (Б) Участок, ограниченный селективной апертурой, содержащий ко-кристаллы ДНК-Dps. (В) Участок, ограниченный селективной апертурой, не содержащий ко-кристаллов. (Г, Д, Е) спектры СХПЭЭ в области L2,3-пика железа, соответствующие участкам А, Б, В. (Ж) ПЭМ-изображение участка образца с $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, содержащего ко-кристаллы ДНК-Dps, ограниченного селективной апертурой 100 мкм. (З) Спектр СХПЭЭ в области L2,3-пика железа с участка Ж. (И) участок образца с ZnSO_4 , содержащий ко-кристаллы ДНК-Dps. (К) Соответствующий спектр СХПЭЭ, содержащий L-2,3 пик цинка.

лись в 2 раза больше, чем в контроле без ионов (с EDTA).

Использование ПЭМ с негативным окрашиванием образцов подтвердило, что флуоресцентные образования, наблюдаемые в растворе, имеют кристаллическую структуру (рис. 1, В–Д) с четкими очертаниями частиц с размерами,

соответствующими размерам додекамера Dps [1]. Это свидетельствует о том, что ко-кристаллы содержат ДНК и Dps.

Обзорные спектры СХПЭЭ с образцов с FeCl_3 и $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ показали, что максимумы в области L2,3-пика железа наблюдаются на 710 эВ и 723 эВ, однако интенсивность этих максимумов оказалась крайне мала. Еще меньшая интенсивность наблюдалась на образцах с ZnSO_4 у L2,3-пика цинка. Это свидетельствует о том, что железо и цинк в ко-кристаллах находятся в количествах, недостаточных для построения карт распределения атомов этих элементов методом энергетически-фильтрованных изображений. Построение карт методом СПЭМ-СХПЭЭ (СПЭМ — сканирующая просвечивающая электронная микроскопия) также оказалось невозможным по причине сильного дрейфа и повреждения образцов электронным лучом высокой интенсивности в СПЭМ во время набора данных. Поэтому для получения информации о пространственном распределе-

нии атомов железа и цинка использовался метод ПЭМ-СХПЭЭ с ограничением области набора данных с помощью селективной апертуры.

На рис. 2, Г–Е представлены СХПЭЭ-спектры образца с FeCl_3 , полученные как с участков, содержащих ко-кристаллы белок-ДНК, так и с тех, что их не содержали (рис. 2, А–В). На

Таблица

Линейные размеры кристаллов, наблюдаемых в конфокальный микроскоп, зависят от ионного состава раствора

Условия образования ко-кристаллов	Контроль (EDTA)	Fe ²⁺	Fe ³⁺	Zn ²⁺
Размер*, мкм	1,8±1,0	2,8±1,4	3,6±2,7	2,62±1,9
Доверительный интервал	0,25	0,35	0,3	0,8

*Среднее ± стандартное отклонение

спектрах присутствуют пики на 709 эВ и 722 эВ, соответствующие L3- и L2-пикам железа. Данные спектры получены в одинаковых условиях. Видно, что сигнал по L2,3-линии железа в областях образца, не содержащих белок-ДНК, присутствует, но имеет существенно меньшую интенсивность, чем в областях с ко-кристаллами. В соответствии с данными о структуре L3-пика железа [13] можно сделать вывод, что атомы железа находятся в степени окисления 3+. Пик на 707 эВ, соответствующий железу в степени окисления 2+ в полученных спектрах отсутствует. Следует также иметь в виду, что в спектрах, полученных со всех рассмотренных образцов, присутствуют интенсивные максимумы на 740 эВ и на 782 эВ. Эти максимумы наблюдаются на различных участках всех изученных образцов, они, вероятно, соответствуют M4-линии Cs и M5-линии Ba. Эти элементы могут входить в качестве примесей в уранилацетат, используемый для негативного контрастирования.

На рис. 2, Ж–З представлены СХПЭЭ-спектры образца с K₄[Fe(CN)₆]. Для улучшения соотношения сигнал-шум была выбрана селективная апертура большего диаметра – 100 мкм. На этом образце интенсивность L2,3-пика железа относительно интенсивности M4-пика цезия(Cs) существенно более низкая, чем на образце с FeCl₃. Видно, что положение L3-пика также соответствует железу в степени окисления 3+. Сигнал от железа 2+ в спектре отсутствует.

Известно, что в свободном состоянии каталитические центры Dps окисляют ионы железа. Окисленное железо проникает во внутреннюю полость белка Dps, образуя неорганическое ядро [2]. Мы полагаем, что нечто подобное может происходить с Dps, находящимся в составе ко-кристалла с ДНК. В кристаллическом состоянии Dps, по-видимому, также может стимулировать накопление железа в форме Fe₂O₃ (или Fe₃O₄) во внутренней полости олигомера. Таким образом, полученные нами данные расширяют представление о роли Dps в клетке.

Спектры с образцов с ZnSO₄ представлены на рис. 2, И–К. Наблюдается пик на 1043 эВ, что соответствует положению L2,3-пика цинка. Однако интенсивность этого пика оказалась мала. Это подтверждает данные о том, что Dps не связывает на постоянной основе двухвалентные катионы (кроме железа, которое он окисляет) и что этот процесс имеет динамический характер [7].

Таким образом, в данной работе при использовании флуоресцентно-меченого фрагмента ДНК методом конфокальной лазерной микроскопии показано образование в растворе, содержащем ионы железа, ко-кристаллов ДНК с белком Dps. При сравнении наших экспериментальных данных с данными для очищенного белка Dps [2], сделано предположение, что Dps в составе ко-кристалла сохраняет свою ферритин-подобную активность, то есть может стимулировать окисление ионов Fe²⁺ до Fe³⁺ и способствовать накоплению железа в форме Fe₂O₃ (или Fe₃O₄) во внутренней полости олигомера, как показано ранее. Эти данные можно в дальнейшем использовать при изучении трехмерной организации генетического материала в бактериальных клетках.

Аналитическая электронная и флуоресцентная микроскопии выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-30003). Экспрессия и очистка белка Dps проводились в рамках государственного задания Минобрнауки России (тема 0082-2014-0001, №АААА-А17-117040610310-6 и тема 0104-2019-0005). Электронная микроскопия проводилась с использованием аналитического электронного микроскопа JEOL2100 (JEOL, Япония) в составе уникальной научной установки «Трёхмерная электронная микроскопия и спектроскопия» биологического факультета МГУ.

Исследование выполнено без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Almiron M., Link A.J., Furlong D., Kolter R. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli* // *Genes Dev.* 1992. Vol. 6. P. 2646–2654.
2. Antipov S.S., Tutukina M.N., Preobrazhenskaya E.V., Kondrashov F.A., Patrushev M.V., Toschakov S.V., Dominova I., Shvyreva U.S., Vrublevskaya V.V., Morenkov O.S., Sukharicheva N.A., Panyukov V.V., Ozoline O.N. The nucleoid protein Dps binds genomic DNA of *Escherichia coli* in a nonrandom manner // *Plos One*. 2017. Vol. 12. N 8: e0182800.
3. Shen B.A., Landick R. Transcription of bacterial chromatin // *J. Mol. Biol.* 2019. N S0022-2836(19).30325-0.
4. Martinez A., Kolter R. Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps // *J. Bacteriol.* 1997. Vol. 179. N 16. P. 5188–5194.
5. Minsky A., Shimoni E., Frenkiel-Krispin D. Stress, order and survival // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002. Vol. 3. P. 50–60.
6. Loiko N.G., Suzina N.E., Soina V.S., Smirnova T.A., Zubasheva M.V., Azizbekyan R.R., Sinitsyn D.O., Tereshkina K.B., Nikolaev Y.A., Krupyanskiy Y.F., El'-Registan G.I. Biocrystalline structures in nucleoids of stationary and dormant cells of procarior // *Microbiology*. 2017. Vol. 86. N 6. P. 714–727.
7. Frenkiel-Krispin D., Levin-Zaidman S., Shimoni E., Wolf S.G., Wachtel E.J., Arad T., Finkel S.E., Kolter R., Minsky A. Regulated phase transitions of bacterial chromatin: A non-enzymatic pathway for generic DNA protection // *EMBO J.* 2001. Vol. 20. N 5. P. 1184–1191.
8. Antipov S., Turishchev S., Purtov Y., Shvyreva U., Sinelnikov A., Semov Y., Preobrazhenskaya E., Berezhnoy A., Shusharina N., Novolokina N., Vakhtel V., Artyukhov V., Ozoline O. The oligomeric form of the *Escherichia coli* Dps protein depends on the availability of iron ions // *Molecules*. 2017. Vol. 22. N 11: 1904.
9. Moiseenko A., Loiko N., Tereshkina K., Danilova Y., Kovalenko V., Chertkov O., Feofanov A.V., Krupyanskii Y.F., Sokolova O.S. Projection structures reveal the position of the DNA within DNA-Dps co-crystals // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019. Vol. 517. N 3. P. 463–469.
10. Egerton R.F. Electron energy-loss spectroscopy in the electron microscope, third edition. N.Y.: Springer, 2011. 491 pp.
11. Dadinova L.A., Chesnokov Y.M., Kamyshevsky 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., Shtykova E.V. 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. N 12. P. 1360–1371.
12. Loiko N.G., Danilova Ya.A., Moiseenko A.V., Demkina E.V., Kovalenko V.V., Tereshkina K.B., El'-Registan G.I., Sokolova O.S., Krupyanskii Yu.F. Condensation of nucleoid in *Escherichia coli* cell as a result of prolonged starvation // *ArXiv Quantitative Biol.* 2019. Vol. 1901: 11322.
13. Garvie L.A.J., Craven A.J., Brydson R. Use of electron-energy loss near-edge fine structure in the study of minerals // *Am. Mineral.* 1994. Vol. 79. N 5–6. P. 411–425.

Поступила в редакцию 07.07.2019 г.
После доработки 11.08.2019 г.
Принята в печать 17.09.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

ANALYSIS OF ELEMENT COMPOSITION OF DNA-PROTEIN CRYSTALS
IN VITRO

A.V. Moiseenko¹, N.G. Loiko^{2, 3}, O.V. Chertkov¹, A.V. Feofanov^{1, 4}, Yu.F. Krupyanskii³,
O.S. Sokolova^{1, *}

¹Department of Bioengineering, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Leninsky prospect 33–2, Moscow, 119071, Russia;

³N.N. Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Kosygina st., 4, Moscow, 117977, Russia;

⁴Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Miklouho-Maclay st. 16/10 Moscow, 117997, Russia

*e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru

The universal response of *Escherichia coli* to stress is the enhancement of the synthesis of specific histone-like Dps proteins that bind bacterial DNA. As a result, two-dimensional and three-dimensional crystalline arrays can be observed in the cytoplasm of starving bacteria. We selected the conditions for obtaining *in vitro* co-crystals of DNA-Dps and studied their elemental composition using analytical electron microscopy. We found that Dps in the co-crystal retains its ferritin-like activity, that is, it can stimulate the oxidation of Fe^{2+} ions to Fe^{3+} and facilitate the accumulation of iron in the form of Fe_2O_3 in the inner cavity of the oligomer.

Keywords: *E. coli*, nucleoid, Dps, electronic analytical microscopy, biocrystallization, fluorescence microscopy

Сведения об авторах

Моисеев Андрей Владимирович — вед. инженер лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: postmoiseenko@gmail.com

Чертков Олег Валериевич — канд. биол. наук, вед. инженер кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: ochertkov@mail.ru

Лойко Наталия Геннадиевна — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории выживаемости микроорганизмов ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН. Тел.: 8-499-135-21-39; e-mail: loikonat@mail.ru

Крупянский Юрий Федорович — докт. физ.-мат. наук, гл. науч. сотр., рук. отдела строения вещества ФИЦ «Химической физики им. Н.Н. Семенова РАН». Тел.: 8-495-939-73-00; e-mail: yufk@chph.ras.ru

Феофанов Алексей Валерьевич — докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: avfeofanov@yandex.ru

Соколова Ольга Сергеевна — докт. биол. наук, доц. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru