

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 539.26

ОЛИГОМЕРИЗАЦИЯ БЕЛКА IHF В ПРИСУТСТВИИ КАТИОНОВ МЕТАЛЛОВ

© 2024 г. А. М. Гордиенко^{1,*}, Л. А. Дадина¹, М. В. Петухов^{1,2,3}, А. А. Можжев^{1,2},
В. А. Манувер^{4,5}, В. Н. Лазарев^{4,5}, Э. В. Штыкова¹

¹Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова Курчатовского комплекса кристаллографии и фотоники
НИЦ “Курчатовский институт”, Москва, Россия

²Институт биоорганической химии РАН им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

³Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, Россия

⁴Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России,
Москва, Россия

⁵Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Долгопрудный, Россия

*E-mail: alex.gor99@mail.ru

Поступила в редакцию 06.10.2023 г.

После доработки 07.11.2023 г.

Принята к публикации 07.11.2023 г.

Олигомерное состояние нуклеоид-ассоциированного белка IHF (Integration Host Factor) играет существенную роль в организации и компактизации бактериального нуклеоида, а также в процессе возникновения резистентности бактерий к неблагоприятным условиям среды, в том числе к антибиотикам. Хотя IHF был идентифицирован более 25 лет назад, молекулярные механизмы его участия в таких процессах остаются малоизученными. В данном исследовании с использованием метода малоуглового рентгеновского рассеяния впервые выявлены различные олигомерные формы IHF в водной среде в зависимости от наличия катионов металлов. Обнаружено, что присутствие ионов Mg^{2+} и K^{+} препятствует формированию олигомеров IHF высокого порядка. Полученные данные могут быть полезными при разработке стратегий преодоления устойчивости бактерий к лекарственным препаратам.

DOI: 10.31857/S0023476124020105, EDN: YSYOUV

ВВЕДЕНИЕ

Хромосомы бактерий представляют собой кольцевые молекулы ДНК и играют ключевую роль во всех клеточных процессах [1]. Они содержат генетический код, обеспечивающий синтез белков, и определяют особенности наследственности и изменчивости бактерий. Размеры ДНК бактериальной хромосомы варьируются в среднем от 1 до 5 миллионов пар оснований (п.о.) и имеют длину ~1–2 мм, что однозначно требует ее упаковки в компактную структуру, не превышающей объем клетки. Сворачивание или компактизация бактериальных хромосом осуществляется с помощью таких механизмов, как молекулярный краудинг и суперспирализация ДНК [2]. Эти процессы тесно связаны с нуклеоид-ассоциированными белками (Nucleoid-Associated Proteins, NAP). NAP часто называют гистоноподобными белками, так как они обладают функциями, схожими с функциями

гистонов, упаковывающими ДНК эукариот, хотя гистонами эти белки не являются. Они играют решающую роль в пространственной организации и компактизации нуклеоида, а также обеспечивают такие процессы, как репликация, рекомбинация, транспозиция и транскрипция [3, 4].

Существует множество различных NAP, которые синтезируются в разных количествах в различные периоды жизни и роста бактерий [5]. Эти периоды делятся на несколько фаз. Когда количество питательных веществ находится в избытке, бактерии находятся в стадии экспоненциального роста. При недостатке питательных веществ наступает этап стационарного роста, когда темпы роста популяции и смертности приблизительно равны. В зависимости от периода жизненного цикла бактерий происходят структурные изменения нуклеоида, в которых участвуют необходимые для данной фазы NAP. Особые изменения нуклеоида бактерий наблюдаются в поздней стадии стационарной фазы

роста при формировании кристаллической формы генома [6]. Феномен образования кристаллов в живых клетках привлекает огромное внимание исследователей прежде всего из-за возможности сохранения жизнеспособности бактерий при самых неблагоприятных условиях в течение длительного периода. В фазе кристаллизации наиболее распространенными нуклеоид-ассоциированными белками являются белок **IHF** (Integration Host Factor) [7] и белок **Dps** (DNA – binding protein from starved cells) [8] с существенным преобладанием последнего [9]. Известно, что в этих условиях формирование устойчивых кристаллических комплексов Dps-ДНК предотвращает разрушение бактериального генома при воздействии различных стрессовых факторов, в том числе антибиотиков, т.е. приводит к устойчивости бактерий к лекарственным средствам [10]. Отметим, что проблема бактериальной резистентности к антибиотикам в настоящее время является весьма актуальной.

Хотя белки Dps и IHF тесно связаны друг с другом, так как они одновременно сосуществуют на поздней стационарной стадии роста бактерий при существенном снижении количества остальных NAR, роль IHF в процессе биокристаллизации остается невыясненной. В [11] на основании структурных исследований с помощью малоуглового рентгеновского рассеяния (**МУРР**) было показано, что IHF образует олигомеры в виде цепочек, что в соответствии с функциональными свойствами этого белка, который стягивает соседние нити ДНК, может приводить к ее слоистой укладке. При продолжении стрессового воздействия молекулы IHF заменяются на Dps, и формируется защитный кристаллический Dps-ДНК-комплекс.

Однако не менее важен и обратный переход, т.е. возвращение к транскрипционно активной структуре нуклеоида, когда клетки могут перейти к экспоненциальной фазе и будут способны продолжать свою метаболическую активность. Оба процесса, как формирование биокристаллов, так и выход из этого состояния, зависят от изменения факторов окружающей среды. Например, в [12] показано, что повышение pH и концентрации $MgCl_2$ приводит к переключению связывания ДНК с Dps на IHF-связывание и распаду кристаллического Dps-ДНК-комплекса. Однако в настоящее время эти процессы остаются мало изученными и прежде всего необходимо исследовать структурные особенности отдельных нуклеоид-ассоциированных белков в различных условиях. Особенно это касается IHF как белка-предшественника процесса биокристаллизации.

Первоначально IHF был обнаружен как важный кофактор сайт-специфической рекомбинации фага λ [13]. Кристаллическая структура белка IHF показывает, что это облигатный гетеродимер, состоящий из переплетенных α - и β -субъединиц массой

около 11 и 10.5 кДа соответственно. Каждая субъединица IHF представляет собой α -спираль, соединенную с β -слоями, вытянутыми в пространстве в виде длинных, подвижных β -тяжей – “рук”. Эти “руки” содержат на конце консервативный аминокислотный остаток пролина, который позволяет изгибать ДНК путем встраивания между парами оснований, и облегчают обертывание ДНК вокруг белка. Благодаря электростатическим взаимодействиям между фосфатной основой ДНК и катионными аминокислотами IHF образуется сайт связывания длиной ~35 п.о. При этом IHF преимущественно связывается с консенсусной последовательностью из 13 п.о. 5'-(A/T)ATCAANNNTT(A/G)-3' (где N – это любой нуклеотид) [14].

Связывание IHF и ДНК происходит с помощью механизмов, чувствительных к факторам окружающей среды, например присутствию ионов K^+ и Mg^{2+} [15]. По результатам калориметрических исследований термодинамики процессов связывания IHF с ДНК с помощью изотермического титрования показана возможность неспецифического связывания при низкой концентрации KCl и высокой стехиометрии IHF-ДНК [16].

Таким образом, для глубокого понимания роли IHF в процессе биокристаллизации и возникновения резистентности бактерий к антибиотикам необходимо проведение структурных исследований этого белка в различных условиях. Цель данной работы – последовательное определение функциональных и структурных особенностей поведения IHF в водной среде, содержащей катионы Mg^{2+} и K^+ . Для достижения поставленной цели использовали МУРР, позволяющее изучать структуру биологических макромолекул в растворе, т.е. в условиях, максимально приближенных к физиологическим [17]. Этот метод используется для получения трехмерных структур низкого разрешения и позволяет оценить олигомерное состояние белков и белковых комплексов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подготовка образца IHF. Экспрессию и очистку IHF проводили по методике, описанной в [11].

Растворы белка IHF переводили в буферы 10 mM Трис (буфер I), 20 mM Трис, 50 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$ (буфер II) при pH 7.5 и концентрировали до 4.8 и 10 мг/мл.

Образцы перед измерениями центрифугировали в течение часа в охлаждаемой настольной центрифуге для избавления от возможных крупных агрегатов.

Эксперимент и анализ данных МУРР. Исследование нуклеоид-ассоциированного белка IHF с помощью МУРР проводили на станции “БиоМУР”

[18, 19] Курчатовского источника синхротронного излучения (НИЦ “Курчатовский институт”, Москва, Россия) в геометрии на пропускание. Исследовали образцы при концентрациях 4.8 и 10 мг/мл в буферных растворах, которые помещали в тонкостенные кварцевые капилляры диаметром 2 мм, с 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 ~ 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, $\lambda = 0.1445 \text{ нм}$ – длина волны рассеяния. Для каждого образца с целью контроля возможных радиационных повреждений сняли по 12 экспериментальных кривых рассеяния со временем экспозиции 300 с каждая (суммарное время облучения 60 мин). Радиационного повреждения обнаружено не было. Точную калибровку угловой шкалы осуществляли в программе Fit2D [20]. В качестве стандарта угловой калибровки использовали бегенат серебра.

Первичную обработку полученных данных (усреднение кривых рассеяния, вычитание усредненной кривой рассеяния буферного раствора из усредненной кривой рассеяния белка и получение основных интегральных характеристик) проводили с помощью программы PRIMUS [21]. Дальнейшую обработку данных проводили с помощью программного комплекса ATSAS [22].

Для каждого рассматриваемого образца в анализе использовали наиболее информативно полезный интервал волновых векторов для избегания ошибочной интерпретации данных ввиду возможных шумов и погрешностей. Для этого использовали формализм выборки Шеннона и программу SHANUM [23].

Радиусы инерции рассчитывали как усредненные величины, рассчитанные с помощью программы косвенного преобразования GNOM [24], также с ее помощью определены функции распределения по расстояниям $p(r)$, которые являются важнейшими структурными характеристиками белков и которые можно выразить с помощью обратного фурье-преобразования интенсивности рассеяния в виде

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

Эта функция содержит информацию о форме и структуре образца, с ее помощью можно оценить максимальный размер $D_{\max}$ из условия, что $p(r) = 0$ при $r > D_{\max}$.

Еще одна из самых важных интегральных характеристик, определяющая объем рассеивающих частиц, – это инвариант Порода (породовский объем) V_p [25], который рассчитывали по анализу полной кривой рассеяния с помощью программы PRIMUS.

Молекулярную массу определяли исходя из установленного эмпирического соотношения между породовским объемом V_p и молекулярной массой $M_{\text{экс}}$, которое в среднем для белков составляет 1.65 [26].

Для расчета интенсивности рассеяния из атомной структуры объекта использовали программу CRY SOL [27], которая также приближает теоретическую кривую рассеяния к экспериментальным данным. В программе используется мультипольное разложение амплитуд рассеяния при расчете сферически усредненной картины рассеяния с варьированием контраста гидратной оболочки. Теоретическая кривая рассеяния рассчитывается так, чтобы минимизировать несоответствие (невязку) χ^2 между расчетным рассеянием и экспериментальными данными:

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

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.

Моделирование структуры олигомеров IHF осуществляли с помощью программы NEMIX. Алгоритм программы заключается в том, что изначально моделируется структура, в которой каждый последующий строительный блок получается из предыдущего путем подобного трансформирования первого блока для получения второго из первого, третьего из второго и т.д. Затем рассчитываются все возможные конфигурации таких строительных блоков внутри олигомера, и с помощью их линейной комбинации приближаются экспериментальные данные МУРР. В настоящей работе при моделировании исходным строительным блоком был гетеродимер IHF (PDB ID: 1ihf).

Для количественной оценки и анализа состава равновесных смесей, полученных в NEMIX, использовали программу OLIGOMER [28]. Алгоритм OLIGOMER основан на представлении кривых МУРР как линейной комбинации от различных компонентов равновесной смеси, где минимизируется расхождение χ^2 между экспериментальными и предсказанными кривыми рассеяния от равновесной смеси и оцениваются объемные доли v_k каждого компонента в растворе. Интенсивность рассеяния представляется по формуле

$$I(s) = \sum_{k=1}^K v_k I_k(s), \quad (3)$$

где K – число компонентов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С использованием формализма Шеннона [29] для анализа и обработки экспериментальных данных белка IHF были выбраны наиболее информативные интервалы волновых векторов $0.14 < s < 3.6 \text{ нм}^{-1}$ согласно табл. 1, где N – число шенновских каналов:

$$N = \frac{s}{\Delta s}, \text{ где } \Delta s = \frac{\pi}{D_{\max}}.$$

Важно обратить внимание на уширение каналов в формализме Шеннона при добавлении в раствор ионов магния и калия, что свидетельствует о различии максимальных размеров белка в зависимости от состава буферного раствора. В данном случае наблюдается уменьшение размера белка в растворе, который содержит ионы металлов.

На рис. 1а представлены экспериментальные кривые малоуглового рассеяния от белка IHF при концентрациях 4.8 и 10 мг/мл в буферах I и II.

Из анализа экспериментальных кривых наблюдается увеличение интенсивности в малых углах, что может свидетельствовать о возможной олигомеризации IHF. При этом в растворах могут присутствовать олигомеры различных степеней.

Поскольку в работе использовали буферы с разным химическим составом и, соответственно, разным воздействием на конформацию белка, для анализа свернутости и упорядоченности белка в растворе был построен график Кратки (рис. 1в) [30]. Характерный колоколообразный вид графика указывает на компактность белка в растворе.

Максимумы функций распределения по расстояниям $p(r)$ оказались смещены влево, что характерно для сильно вытянутых рассеивающих объектов. Наличие пиков на спаде функции может свидетельствовать о наличии некоторых повторяющихся структурных форм, расположенных на

Таблица 1. Характеристики информативности данных в формализме Шеннона

Образец	N , число каналов
10 мг/мл в буфере I	22
4.8 мг/мл в буфере I	16
10 мг/мл в буфере II	12
4.8 мг/мл в буфере II	9

определенных расстояниях друг от друга. Причем для белка IHF в буфере I, т.е. при отсутствии ионов магния и калия, эти пики выражены ярче и максимальные размеры $D_{\max}$ оказываются значительно больше (рис. 1б), что подтверждается анализом экспериментальных кривых в формализме Шеннона.

Интегральные структурные характеристики нуклеоид-ассоциированного белка IHF. С помощью программы PRIMUS провели анализ интегральных характеристик образцов, результаты которого представлены в табл. 2.

Так как у данных образцов предполагалась полидисперсность, т.е. наличие различных олигомерных форм, радиусы инерции R_g определяли не с помощью графика Гинье [31], а как усредненные величины, рассчитанные программой GNOM из функций распределения по расстояниям $p(r)$. Теоретическое значение радиуса инерции R_g , полученное с помощью CRY SOL из кристаллической структуры IHF (PDB ID: 1ihf) для его гетеродимера, составляет 2.1 нм, что существенно ниже полученных значений в результате анализа экспериментальных данных МУРР. Усредненные максимальные размеры $D_{\max}$, которые оценивали с помощью функций распределения по расстояниям $p(r)$ (рис. 2б), оказались намного больше геометрического размера кристаллической структуры гетеродимера IHF, который составляет 6.6 нм, причем особенно выделяется увеличение максимального размера белка в случае отсутствия в растворе ионов магния и калия. Также наблюдается зависимость структурных инвариантов от состава буфера, в котором проводили исследования. Полученные молекулярные массы $M_{\text{эсп}}$

Таблица 2. Интегральные структурные характеристики (инварианты МУРР) нуклеоид-ассоциированного белка IHF в растворе

Образец	R_g , нм	V_p , нм ³	$M_{\text{эсп}}$, кДа	$D_{\max}$, нм
10 мг/мл в буфере I	6.7 ± 1	122 ± 14	74 ± 10	25
4.8 мг/мл в буфере I	3.9 ± 0.6	59 ± 6	36 ± 4	18
10 мг/мл в буфере II	3.01 ± 0.3	46 ± 5	28 ± 3	13
4.8 мг/мл в буфере II	2.85 ± 0.3	43 ± 4	26 ± 3	13

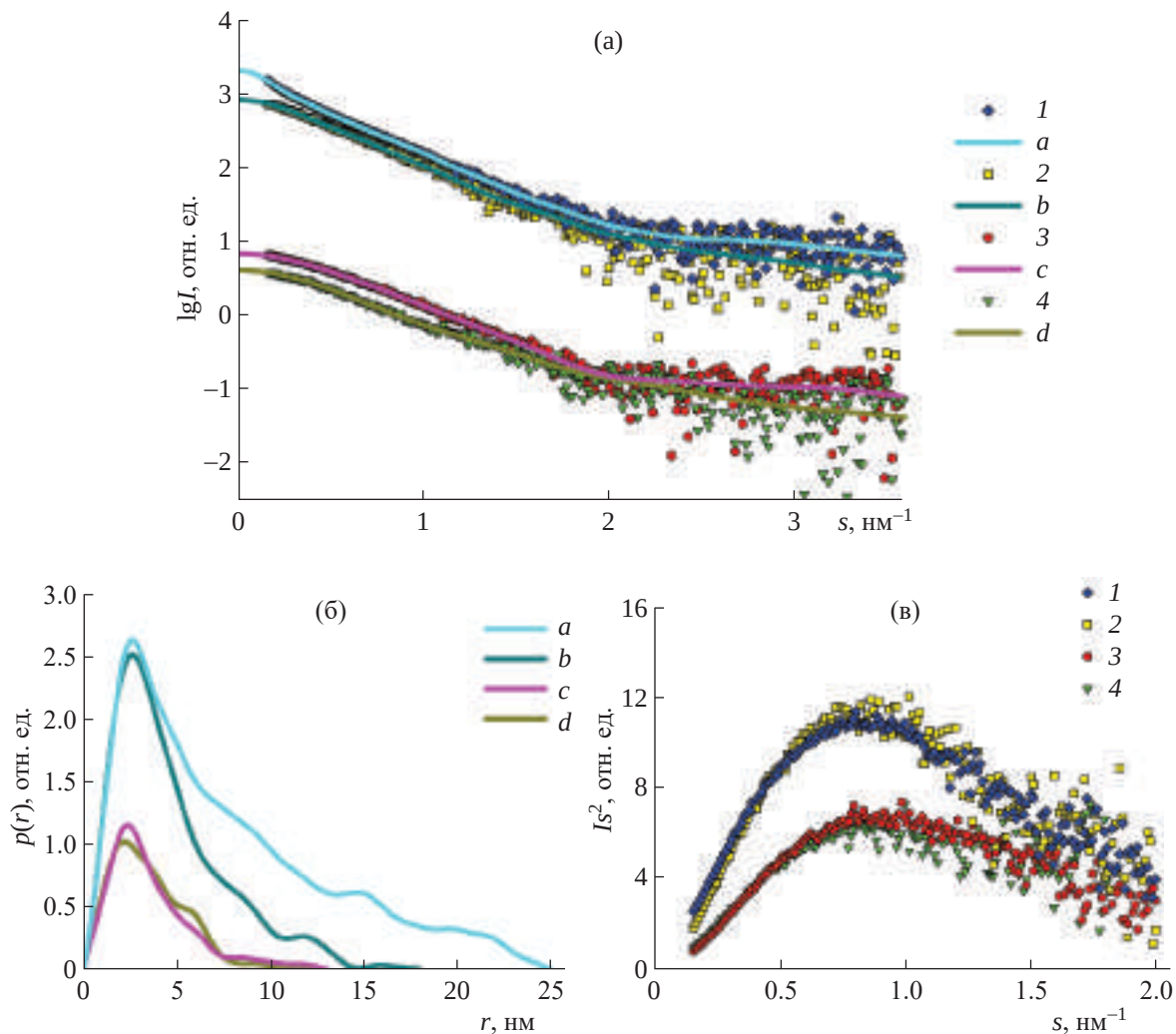


Рис. 1. Анализ кривых МУРР от белка INF: а – экспериментальные кривые малоуглового рассеяния от INF: 1 – концентрация 10 мг/мл в буфере I, 2 – концентрация 4.8 мг/мл в буфере I, 3 – концентрация 10 мг/мл в буфере II, 4 – концентрация 4.8 мг/мл в буфере II; а, b, c, d – соответствующие кривые, рассчитанные от функции распределения расстояниям (цветовая гамма соответствует парным функциям). Кривые разнесены по вертикали для лучшей визуализации; б – функции распределения по расстояниям $p(r)$: а, b, c, d соответствуют концентрациям 1, 2, 3, 4 на панели а; в – графики в координатах Кратки: 1, 2, 3, 4 соответствуют концентрациям панели а.

(табл. 2) также значительно отличаются от теоретической массы димера INF, которая составляет 21.5 кДа. Таким образом, в растворе присутствуют частицы со степенью олигомеризации больше димера.

Можно предположить, что в растворе присутствует смесь различных олигомеров INF с исходной структурной единицей, представленной димером. Таблица 2 демонстрирует явную зависимость структурных инвариантов от состава буфера, в котором проводили исследования. Для растворов, в которых присутствуют ионы металлов, такие как магний и калий, менее выражен процесс олигомеризации: основные интегральные структурные

характеристики INF наиболее близки к характеристикам исходного гетеродимера. В образцах с белком INF в буфере I, т.е. в отсутствие катионов металлов, олигомеризация более выражена, о чем свидетельствует увеличение интенсивности рассеяния в самых малых углах. В данном случае возможно образование агрегатов или больших олигомеров, что особенно заметно при увеличении концентрации белка в растворе.

Для белка Dps при добавлении и повышении концентрации MgCl_2 и KCl его связывание с ДНК нарушается [12], в то время как для белка INF это может оказывать существенно другое влияние, что отражается на его конформации и олигомеризации

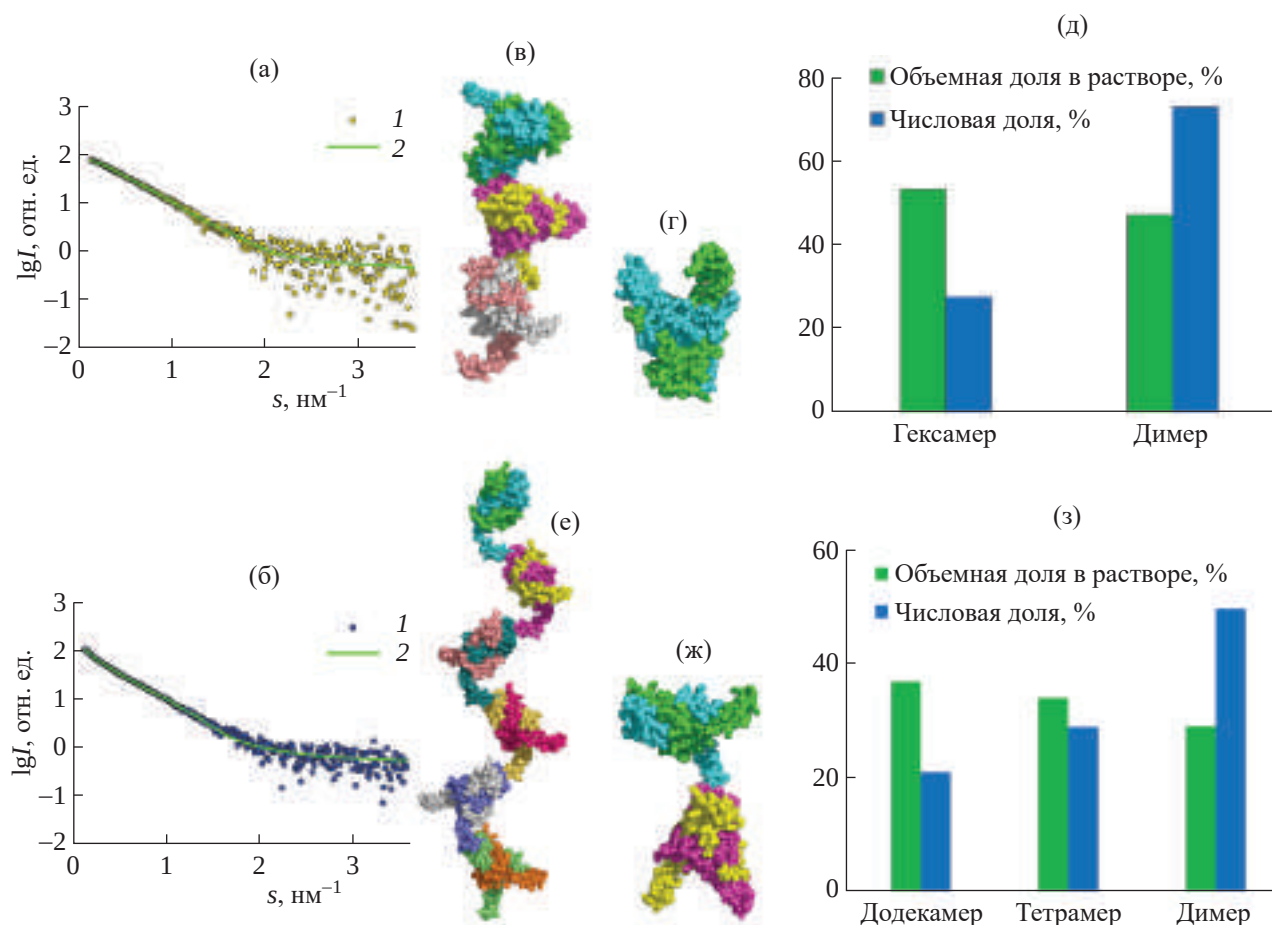


Рис. 2. Приближение экспериментальных данных МУРР равновесными смесями от INF в буфере I: а – при концентрации 4.8 мг/мл, б – при концентрации 10 мг/мл, 1 – экспериментальные данные, 2 – расчетная кривая рассеяния, полученная в программе OLIGOMER от смеси олигомеров, полученных в NEMIX; в, г – модели гексамера и димера INF при концентрации 4.8 мг/мл; е, ж – модели додекамера и тетрамера INF при концентрации 10 мг/мл; д, з – гистограммы объемных и числовых долей в равновесной смеси олигомеров.

в растворе, т.е., возможно, этот белок меняет способ связывания с ДНК. Таким образом, в поздней стационарной фазе роста бактерий в зависимости от условий среды обитания предположительно происходят реакции дифференцирования и отбора между Dps и INF для наиболее предпочтительного связывания с ДНК и организации бактериального нуклеоида в нужной архитектуре в ответ на различные стрессовые состояния.

Структурное моделирование белка INF. Согласно полученным результатам первичного анализа в образцах присутствуют олигомеры белка INF, причем в растворах, где отсутствуют Mg^{2+} и K^{+} , олигомеризация выражена ярче, и возможно образование олигомеров разных порядков.

Для оценки степени олигомеризации INF в растворе было проведено структурное моделирование по данным МУРР. С помощью программы NEMIX получены структуры белка INF для каждого из

образцов, где смоделированы различные олигомеры, состоящие из исходных димеров.

Модели, построенные NEMIX для образцов в буфере I, т.е. в отсутствие катионов металлов (рис. 2в–2ж), демонстрируют процесс олигомеризации INF в растворе. О хорошем качестве и надежности моделирования свидетельствуют значения $\chi^2 = 1.4$ и 1.5 между экспериментальной и расчетной кривой для образцов с концентрациями 4.8 и 10 мг/мл соответственно. Наблюдается выраженная концентрационная зависимость, которая проявляется в образовании крупных олигомеров при увеличении концентрации белка в растворе, что подтверждает полученные при первичном анализе данных МУРР результаты, причем образуются олигомеры разных порядков.

Для количественной оценки объемных долей каждого компонента в растворе использовали программу OLIGOMER, где наилучшее совпадение

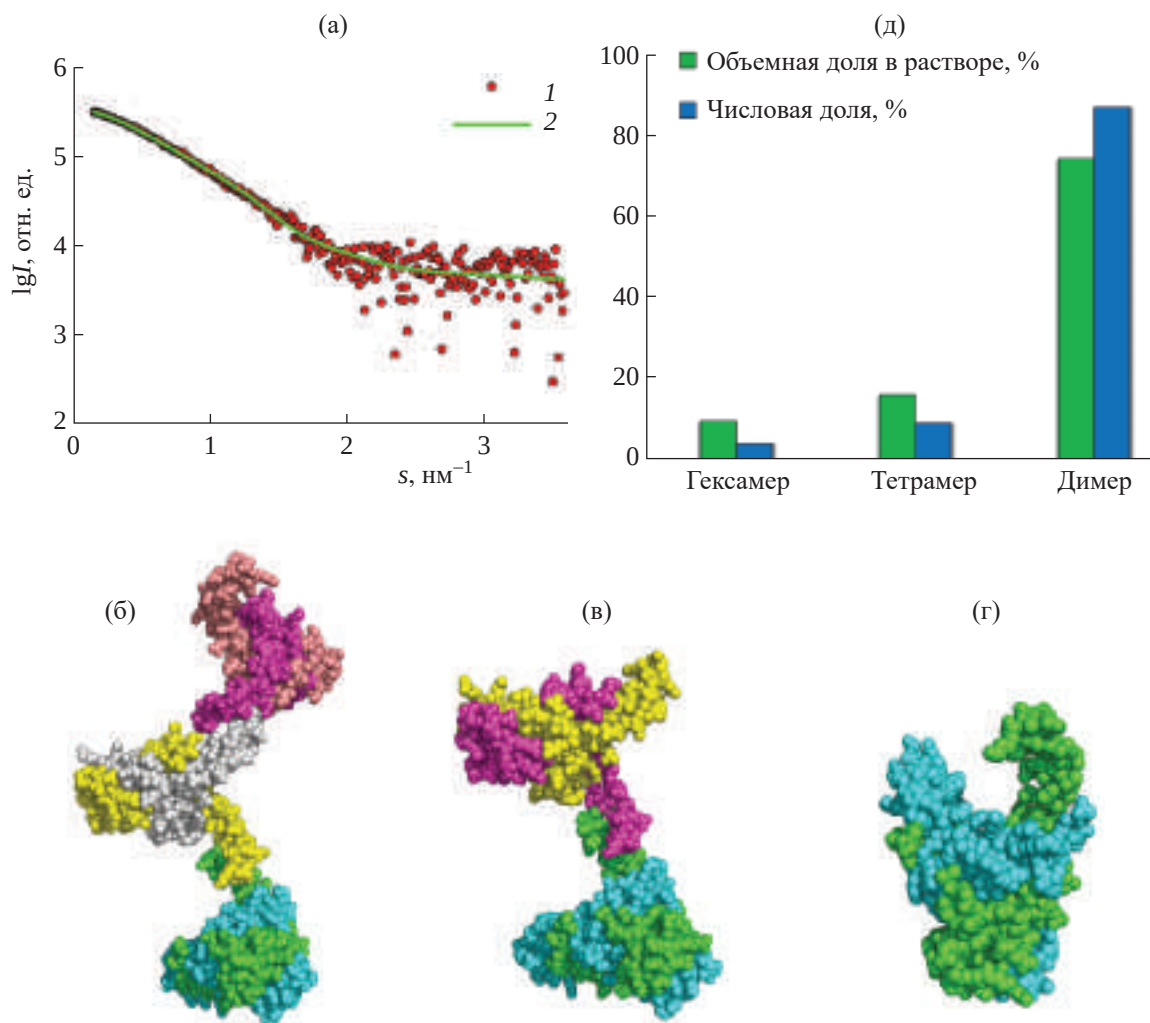


Рис. 3. Приближение экспериментальных данных МУРР равновесными смесями от ИНФ в буфере II: а — при концентрации 10 мг/мл, 1 — экспериментальные данные, 2 — расчетная кривая рассеяния, полученная в программе OLIGOMER от смеси димеров, тетрамеров и гексамеров, полученных в NEMIX ($\chi^2 = 1.7$); б — модель гексамера ИНФ, в — модель тетрамера ИНФ, г — модель димера ИНФ; д — гистограмма объемных и числовых долей олигомеров в равновесной смеси.

с экспериментальными данными (рис. 2а, 2б) дала равновесная смесь гексамеров и димеров для образца с концентрацией 4.8 мг/мл, додекамеров, тетрамеров и димеров для образца с концентрацией 10 мг/мл. Результаты анализа с помощью программы OLIGOMER наглядно представлены в виде гистограмм (рис. 2д, 2з). Однако важно учесть, что полученные объемные доли тетрамеров и гексамеров больше, чем их числовые доли в смеси. По сравнению с димером числовые доли снижаются в 2 и 3 раза для тетрамера и гексамера соответственно. Таким образом, в числовом выражении присутствие высоких олигомеров достаточно ограничено. Молекулярные массы, усредненные по всем компонентам, оказались равны 39.6 и 65.3 кДа для образца с концентрацией 4.8

и 10 мг/мл соответственно, что хорошо согласуется с массами, полученными в результате анализа полной кривой рассеяния (табл. 2).

Следующим этапом работы было определение структуры белка ИНФ в присутствии ионов магния и калия в растворе. Так как концентрационной зависимости в интервале концентраций 4.8–10 мг/мл в данном растворе не наблюдалось, для дальнейшего структурного моделирования использовали кривую при концентрации 10 мг/мл как наиболее информативную согласно формализму Шеннона. Модели, построенные с помощью программы NEMIX, представлены на рис. 3б–3г. Таким образом, с помощью компьютерного моделирования продемонстрировано, что белок ИНФ в присутствии ионов магния и калия также образует олигомеры

в растворе, что подтверждает полученные при первичном анализе результаты. Однако в данном случае степень олигомеризации ниже, чем в буфере I. Наилучшее приближение к экспериментальным данным (рис. 3а) дала смесь гексамеров, тетрамеров и димеров (рис. 3б–3г).

Количественная оценка результата представлена на гистограмме (рис. 3д). Из анализа следует, что в растворе с ионами металлов присутствуют преимущественно димеры белка INF с небольшим количеством образовавшихся тетрамеров и гексамеров. Молекулярная масса, усредненная по всем компонентам, составляет 27 кДа, что согласуется с массой, рассчитанной по полной кривой расщепления с помощью инварианта Порода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью МУРР изучены особенности процессов олигомеризации геном-ассоциированного белка INF в различных условиях. Получены кривые МУРР от растворов белка в присутствии одно- и двухзарядных металлических катионов и без них. Анализ полученных кривых и структурное моделирование позволили сделать два важных вывода: во-первых, наличие катионов Mg^{2+} и K^{+} заметно тормозит формирование крупных олигомеров, во-вторых, олигомеризация INF всегда идет по пути образования длинных белковых цепочек, а не, например, компактных глобулярных или клубковых структур. Последнее важно с точки зрения формирования структур-предшественников в процессе возникновения устойчивого кристаллического комплекса Dps–ДНК, ответственного за бактериальную резистентность к неблагоприятным внешним условиям. Цепочки INF, стягивая отдельные молекулы ДНК, способствуют их параллельной укладке, и в дальнейшем при продолжении стрессовых воздействий и лавинообразном продуцировании бактерией белка Dps происходит замена INF на Dps, что приводит к защитной кристаллизации бактериального генома. Здесь важно отметить, что этот процесс, как показало данное исследование, можно лимитировать введением катионов Mg^{2+} и K^{+} . Полученные данные будут полезны для исследования поведения и взаимодействия нуклеоид-ассоциированных белков в живых бактериальных клетках, что поможет приблизиться к решению проблемы устойчивости бактерий к лекарственным препаратам.

Авторы выражают благодарность Г. Петерсу за проведение экспериментов по МУРР.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 18-74-10071) в части получения образцов и их первичной характеристики, в рамках выполнения работ государственного задания НИЦ “Курчатовский институт” в части моделирования структуры белка.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dame R.T., Rashid F.-Z.M., Grainger D.C. // Nat. Rev. Genet. 2020. V. 21. P. 227. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0185-4>
2. Rohs R., West S., Sosinsky A. et al. // Nature. 2009. V. 461. P. 1248. <https://doi.org/10.1038/nature08473>
3. Shahul Hameed U.F., Liao C., Radhakrishnan A.K. et al. // Nucl. Acids Res. 2019. V. 47. P. 2666. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1299>
4. Bai L., Morozov A.V. // Trends Genet. 2010. V. 26. P. 476. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.08.003>
5. Wang W., Li G.W. Chen C. et al. // Science. 2011. V. 333. P. 1445. <https://doi.org/10.1126/science.1204697>
6. Frenkiel-Krispin D., Ben-Avraham I., Englander J. et al. // Mol. Microbiol. 2004. V. 51. P. 395. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03855.x>
7. Rice P.A., Yang S., Mizuuchi K. et al. // Cell. 1996. V. 87. P. 1295. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81824-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81824-3)
8. Grant R., Filman D., Finkel S. et al. // Nat. Struct. Mol. Biol. 1998. V. 5. P. 294. <https://doi.org/10.1038/nsb0498-294>
9. Luijsterburg M.S., Noom M.C., Wuite G.J. et al. // J. Struct. Biol. 2006. V. 156. P. 262. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2006.05.006>
10. Frenkiel-Krispin D., Minsky A. // J. Struct. Biol. 2006. V. 156. P. 311. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2006.05.014>
11. Дадинова Л.А., Петухов М.В., Гордиенко А.М. et al. // Биохимия. 2023. Т. 88. № 5. С. 785. <https://doi.org/10.31857/S032097252305007X>
12. Lee S.Y., Lim C.J., Droge P. et al. // Sci. Rep. 2016. V. 5. P. 18146. <https://doi.org/10.1038/srep18146>
13. Nash H.A., Robertson C.A. // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. P. 9246. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52537-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52537-6)
14. Hales L.M., Gumpert R.I., Gardner J.F. // J. Bacteriol. 1994. V. 176. P. 2999. <https://doi.org/10.1128/jb.176.10.2999-3006.1994>
15. Lin J., Chen H., Dröge P. et al. // PLoS One. 2012. V. 7. № 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049885>
16. Holbrook J.A., Tsodikov O.V., Saecker R.M. et al. // J. Mol. Biol. 2001. V. 310. № 2. P. 379. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4768>
17. Feigin L.A., Svergun D.I. Structure analysis by small-angle x-ray and neutron scattering. New York: Plenum Press, 1987. 335 p.
18. Peters G.S., Zakharchenko O.A., Konarev P.V. et al. // Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A. 2019. V. 945.

- P. 162616.
<https://doi.org/10.1016/j.nima.2019.162616>
19. *Peters G.S., Gaponov Y.A., Konarev P.V. et al. // Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A. 2022. V. 1025. P. 166170.*
<https://doi.org/10.1016/j.nima.2021.166170>
 20. *Hammersley A.P. // J. Appl. Cryst. 2016. V. 49. P. 646.*
<https://doi.org/10.1107/S1600576716000455>
 21. *Konarev P.V., Volkov V.V., Sokolova A.V. et al. // J. Appl. Cryst. 2003. V. 36. P. 1277.*
<https://doi.org/10.1107/S0021889803012779>
 22. *Manalastas-Cantos K., Konarev P.V., Hajizadeh N.R. et al. // J. Appl. Cryst. 2021. V. 54. P. 343.*
<https://doi.org/10.1107/S1600576720013412>
 23. *Konarev P.V., Svergun D.I. // IUCr J. 2015. V. 2. P. 352.*
<https://doi.org/10.1107/S2052252515005163>
 24. *Svergun D.I. // J. Appl. Cryst. 1992. V. 25. P. 495.*
<https://doi.org/10.1107/S0021889892001663>
 25. *Porod G. Small-Angle X-Ray Scattering ed O Glatter and O Kratky. London: Academic, 1982.*
 26. *Petoukhov M.V., Franke D., Shkumatov A.V. et al. // J. Appl. Cryst. 2012. V. 45. № 2. P. 342.*
<https://doi.org/10.1107/S0021889812007662>
 27. *Svergun D.I., Barberato C., Koch M.H.J. // J. Appl. Cryst. 1995 V. 28. P. 768.*
<https://doi.org/10.1107/S0021889895007047>
 28. *Konarev P.V., Volkov V.V., Sokolova A.V. et al. // J. Appl. Cryst. 2003. V. 36. P. 1277.*
<https://doi.org/10.1107/S0021889803012779>
 29. *Свергун Д.И., Фейгин Л.А. Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние. М.: Наука, 1986. 278 с.*
 30. *Jacques D.A., Guss J.M., Svergun D.I. et al. // Acta Cryst. D. 2012. V. 68. P. 620.*
<https://doi.org/10.1107/S0907444912012073>
 31. *Guinier A. // Ann. Phys. 1939. V. 12. P. 161.*

OLIGOMERIZATION OF IHF PROTEIN IN THE PRESENCE OF METAL CATIONS

© 2024 A. M. Gordienko^{1,*}, L. A. Dadinova¹, M. V. Petoukhov^{1,2,3},
 A. A. Mozhaev^{1,2}, V. A. Manuvera^{4,5}, V. N. Lazarev^{4,5}, E. V. Shtykova¹

¹*Shubnikov Institute of Crystallography of Kurchatov Complex of Crystallography and Photonics of NRC "Kurchatov Institute," Moscow, Russia*

²*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

³*A.N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

⁴*Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia*

⁵*Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russia*

* Correspondence to: alex.gor99@mail.ru

The oligomeric state of the nucleoid-associated protein IHF (integration host factor) plays a significant role in organizing and compacting bacterial nucleoids, as well as in the process of bacterial resistance to adverse environmental conditions, including antibiotics. Although IHF was identified more than 25 years ago, the molecular mechanisms of its involvement in such processes remain poorly understood. In this study, using small-angle X-ray scattering, various oligomeric forms of IHF were first identified in aqueous solution depending on the presence of metal cations. It was found that the presence of Mg²⁺ and K⁺ ions inhibits the formation of high-order oligomers. The obtained data can be useful in developing strategies to overcome bacterial resistance to drugs.