

УДК 577.112.083

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ HU-БЕЛКОВ ИЗ *S. MELLIFERUM* И *M. GALLISEPTICUM* И ИХ КОМПЛЕКСОВ С ДЦДНК ДЛЯ СТРУКТУРНЫХ ЯМР-ИССЛЕДОВАНИЙ

Д.А. Алтухов¹, Ю.К. Агапова¹, А.В. Власкина¹, Д.А. Корженевский¹,
А.Ю. Николаева^{1**}, А.М. Франк-Каменецкая¹, Э.В. Бочаров², Т.В. Ракитина^{1,2*}

¹Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»; ²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН;
*e-mail: taniarakitina@yahoo.com)

Создана высокоэффективная система бактериальной экспрессии и протокол очистки рекомбинантных HU-белков, меченных изотопами ¹³C и ¹⁵N, из микоплазм *S. Melliferum* (HUSpm) и *M. gallisepticum* (HUMgal), пригодных для структурных исследований с помощью ЯМР-спектроскопии высокого разрешения, а также подобраны условия проведения ЯМР-экспериментов и получены обзорные двумерные гетероядерные ЯМР-спектры ¹H/¹⁵N-HSQC и ¹H/¹³C-HSQC-СТ свободных форм HU-белков (HUSpm и HUMGal), а также спектр ¹H/¹⁵N-HSQC HUSpm в присутствии ДНК-дуплекса. Разработанные методики универсальны, применимы для других представителей семейства HU-белков, позволяют проводить структурно-динамические исследования белков в свободной форме и изучение их конформационных перестроек при образовании комплексов с различными видами ДНК-дуплексов или ингибиторами ДНК-связывания.

Ключевые слова: ДНК-связывание, гистоноподобные HU-белки, бактериальная система экспрессии, ЯМР-спектроскопия.

Список использованных в статье сокращений: NAP – белок, ассоциированный с нуклеоидом; HU – гистоноподобный белок; HUSpm – гистоноподобный белок из *Spiroplasma melliferum*; HUMgal – гистоноподобный белок из *Mycoplasma gallisepticum*; PCA – рентгеноструктурный анализ, ЯМР – ядерный магнитный резонанс; TEV – вирус гравировки табака; ИПТГ – изопропилтиогаляктозид; ДСН-ПААГ – полиакриламидный гель с додецилсульфатом натрия; МХАХ – металл-хелатная аффинная хроматография, Ni-NTA – никель-нитрилотриацетат.

ДНК-связывающие гистоноподобные HU-белки – это небольшие (молекулярная масса мономеров около 10 кДа) положительно заряженные белки, относящиеся к классу белков, ассоциированных с бактериальным нуклеоидом (nucleoid associated protein, NAP), которые участвуют в поддержании суперскрученности и компактизации геномной ДНК прокариотической клетки [1, 2] (H означает гистоноподобные, U – U13, штамм *E. coli*, из которого белок был первоначально выделен) [3].

HU-белки присутствуют во всех бактериях и регулируют разнообразные ДНК-зависимые процессы, включая репликацию, транскрипцию, рекомбинацию, репарацию и адаптацию [4–7]. В зависимости от качественного и количественного состава других NAP спектр функций и роль HU-белков у разных микроорганизмов может

существенно различаться [8]. Например, нокаут генов HU-белка существенно нарушает способность к росту и адаптации *E. coli*, но не убивает эту бактерию [9, 10], тогда как для ряда других бактерий, например *B. subtilis*, потеря HU-белка летальна [11].

Важность HU-белка для нормального функционирования бактериальной клетки была установлена довольно давно, однако принципиальная возможность использования этого белка в качестве мишени для фармакологической интервенции была впервые продемонстрирована только в 2014 г., когда Bhowmick и соавторы показали, что полученные с помощью молекулярного докинга низкомолекулярные ингибиторы ДНК-связывающей способности HU-белка из *M. tuberculosis* нарушают структуру нуклеоида и жизнеспособность бактерии [12]. С учетом того, что в

**Аспирант Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН.

геноме *M. tuberculosis* присутствуют гены нескольких NAP [13, 14], продукты которых могут компенсировать отсутствие HU-белка, можно предположить, что влияние ингибиторов на бактерии, в которых HU-белок является единственным представителем класса NAP, будет более эффективным. К таким бактериям относятся микоплазмы (Mollicutes) – паразитические микроорганизмы, редуцированный геном и ограниченные биосинтетические возможности которых делают потерю HU-белка летальной [15].

Известно, что для рационального дизайна низкомолекулярных ингибиторов с помощью молекулярного докинга необходима пространственная структура белка-мишени. Причем точность расчетов существенно повышается с увеличением разрешения структурных данных [16]. Методом рентгеноструктурного анализа (РСА) нами получена пространственная структура HU-белка из микоплазмы *S. melliferum* (код PDB 5CVX) с максимальным для HU-белков разрешением (1,36 Å) [17]. Нам также удалось получить кристаллы HU-белка из микоплазмы *M. gallisepticum* с пределом дифракции 2,91 Å [18], однако полученные данные не позволили определить структуру белка. Для исследования структуры HUMgal был использован метод спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) [19].

Для исследования белков методом ЯМР-спектроскопии используют препараты рекомбинантных белков, меченные изотопами, для получения которых экспрессию проводят на «минимальных» средах, в которых в качестве источника азота используют соли аммония, содержащие изотоп ^{15}N , а в качестве источника углерода – глюкозу или глицерин, содержащие изотоп ^{13}C . В связи с высокой стоимостью изотопных меток при переходе на минимальные среды проводят дополнительную оптимизацию условий экспрессии в целях подбора условий, позволяющих получить максимальное количество рекомбинантного белка с минимального объема среды.

Следует отметить, что после проведения гетероядерной ЯМР-спектроскопии высокого разрешения для HU-белка в свободной форме, меченного ^{13}C , ^{15}N -изотопами, можно в дальнейшем исследовать его комплексы с ДНК и/или ингибиторами, используя препарат, меченный только относительно недорогим ^{15}N -хлоридом аммония. Результаты подобных экспериментов позволят выявить аминокислотные остатки белка, участвующие в образовании комплекса с ДНК или ингибитором, что поможет в уточнении механизма действия и оптимизации ингибиторов.

В настоящей работе подобраны условия бактериальной экспрессии двух рекомбинантных HU-белков, меченных изотопами, из микоплазм *S. melliferum* (HUSpm) и *M. gallisepticum* (HUMgal), а также оптимальные условия проведения ЯМР-экспериментов с белками в свободной форме и комплексом HUSpm с ДНК. Продемонстрировано, что получаемые белки и их комплексы с двухцепочечной ДНК (дцДНК) могут быть успешно использованы для структурно-динамических исследований с помощью ЯМР-спектроскопии высокого разрешения.

Материалы и методы

Получение рекомбинантных белков

Создание штаммов продуцентов на основе клеток *E. coli* BL21(DE3) RIPL (Stratagene) для экспрессии рекомбинантных белков HUSpm и HUMgal на богатой среде LB было описано в [17] для HUSpm и в [18] для HUMgal. Для введения изотопных меток ^{15}N , ^{13}C использованы реагенты фирмы «CIL» (США). Подбор оптимальных условий экспрессии проводили на минимальной среде в отсутствие изотопных меток, при этом использовали автоиндукцию [20] в течении 24, 48 и 72 ч, а также химическую индукцию в течение ночи (примерно 16 ч) с помощью ИПТГ (0,02; 0,2 и 1 мМ). Индукцию (автоиндукцию) проводили при температуре 18, 25 и 32°C и качении (180 об/мин). Для препаративной наработки белков, меченных изотопами, штаммы-продуценты сначала высевали в богатую среду LB, содержащую 100 мкг/мл ампициллина и 50 мкг/мл хлорамфеникола, и наращивали при 37°C в течение ночи. Затем культуры разводили в 50 раз минимальной средой M9 (6 г Na_2HPO_4 , 3 г KH_2PO_4 , 0,5 г NaCl на 1 л), содержащей 100 мкг/мл ампициллина, 2 мМ MgSO_4 , 0,1 мМ CaCl_2 , 0,001% тиамин-хлорида, 0,0002% дрожжевого экстракта, а также 0,2 мг/мл $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ и 0,4% небогащенной глюкозы (^{15}N -мечение) или 0,2 мг/мл $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ и 0,4% [U- ^{13}C]-глюкозы (^{15}N и ^{13}C -мечение), и культивировали при 37°C до $\text{OD}_{600} = 0,8$ о.е. После этого снижали температуру культивирования до 25°C и добавляли ИПТГ до концентрации 0,4 мМ. После 16 ч индукции клетки собирали центрифугированием и хранили при –70°C. Выделение рекомбинантных белков HUSpm и HUMgal, меченных изотопами, проводили, как описано соответственно в [17] и [18]. Выделенный белок переводили в 50 мМ NH_4CO_3 (pH 7,5), используя обессоливающие колонки РД10 (GE healthcare), после чего образцы белка замораживали и лиофилизировали на центрифуге «SpeedVac». Уровень экспрессии,

результаты каждой стадии выделения белка и чистоту полученных препаратов контролировали с помощью электрофореза в 15%-м ДСН-ПААГ по методу Laemmli [21].

Получение комплекса HUSpm с диДНК

Для получения ДНК-дуплекса JgA25/JgD22 эквимольные количества олигонуклеотидов JgA25 (5'-CGTAGCAAGAAAGACTCAACTGCAC-3', подчеркнута трехнуклеотидная вставка) и JgD22 (5'-GTGCAGTTGAGTCCTTGCTACG-3') («Синтол», Москва) смешивали в буфере для проведения ЯМР (25 мМ Na₂HPO₄/NaH₂PO₄; pH 7,5). Смесь прогревали в течение 5 мин на водяной бане при температуре 90°C, понижали температуру до 60°C в течении 30 мин, после чего олигонуклеотидный дуплекс быстро охлаждали во льду. Затем 50 пмоль дуплекса смешивали с разным количеством димера HUSpm, (0, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400 пмоль) в буфере для ЯМР в объеме 5 мкл. После инкубации в течение 5 мин при комнатной температуре полученные образцы наносили на 2%-й агарозный гель, приготовленный на 1×TAE-буфере. Разделение комплекса белок–ДНК и свободной ДНК проводили с помощью горизонтального электрофореза при напряжении 80 В. Визуализацию проводили путем окрашивания геля бромистым этидием с последующим фотографированием в УФ-свете с помощью системы гель-документации («Bio-Rad»).

ЯМР-спектроскопия

ЯМР-спектроскопию высокого разрешения НУ-белков, меченных изотопами ¹³C и ¹⁵N, проводили при температуре 308°K на спектрометре «Varian NMR-system 700 МГц» («Varian-Agilent», США), оснащенном градиентным ¹H/¹³C/¹⁵N-датчиком (оборудование предоставлено РЦ МКБ Курчатковского комплекса НБИКС-технологий). В ЯМР-ампулу (5 мм) помещали 500 мкл 1 мМ раствора НУ-белка в 25 мМ Na₂HPO₄/NaH₂PO₄; pH 7,5 (HUSpm) или pH 6,7 (HUMgal), содержащего 9/1 H₂O/D₂O (v/v) и 0,1 мМ NaN₃. Для получения комплекса HUSpm с ДНК белок предварительно смешивали с ДНК-дуплексом JgA25/JgD22 при 20%-м молярном избытке последнего по отношению к димеру белка. Для образцов НУ-белков были накоплены двумерные гетероядерные ЯМР-спектры ¹H/¹⁵N-HSQC и ¹H/¹³C-HSQC-СТ [19].

Результаты и обсуждение

Получение меченных изотопами рекомбинантных НУ-белков

Клонирование генов, создание экспрессирующих конструкций на основе модифицированных

плазмидных векторов серии pET и получение штаммов продуцентов кратко описаны в работе [17] для HUSpm и [18] для HUMgal. Модифицированные векторы позволяли экспрессировать целевые белки, содержащие на N-конце последовательности 6-гистидиновых тагов, слитые с сайтами расщепления TEV-протеазы. В таблице приведено сравнение плазмид, созданных для экспрессии рекомбинантных НУ-белков микоплазм. В случае HUSpm сайт расщепления TEV-протеазы следовал непосредственно за 6-гистидиновым кластером, тогда как в случае HUMgal между этими последовательностями были введены 7 дополнительных аминокислотных остатков DYDIPTT. Разделение N-концевого шестигистидинового тага и сайта TEV-протеазы данной аминокислотной последовательностью было рекомендовано компанией Invitrogen – основным производителем коммерчески-доступной TEV-протеазы.

В рамках данной работы требовалось подобрать условия экспрессии рекомбинантных белков, меченных изотопами, позволяющие получать максимальное количество целевого продукта с минимального объема ростовой среды, а также оптимизировать условия выделения рекомбинантных белков.

В предыдущих работах при наработке микоплазменных НУ-белков (HUSpm и HUMgal) на богатой среде LB использовали следующие условия индукции рекомбинантной экспрессии: культивация клеток при 37°C до OD₆₀₀ = 0,8 и индукция 1 мМ ИПТГ при 25°C в течение ночи (16 ч). При переходе на экспрессию белков на минимальной среде штаммы-продуценты сначала наращивали на богатой среде LB при 37°C, затем культуры разводили средой M9, содержащей 0,0002% дрожжевого экстракта, что способствовало более эффективному синтезу целевого белка, практически без снижения уровня включения изотопных меток (¹⁵N и ¹³C).

При подборе условий индукции рекомбинантных белков в минимальной среде использовали химическую индукцию с помощью ИПТГ в концентрации от 0,02 до 1 мМ. В этом случае клетки сначала культивировали при 37°C до OD₆₀₀ = 0,8, а перед добавлением индуктора температуру снижали до 18, 25 или 32°C и проводили индукцию в течение 16 ч, после чего уровень экспрессии целевых белков оценивали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза (рис. 1).

Кроме того, был использован альтернативный метод – автоиндукция. При автоиндукции в среде изначально присутствуют глюкоза, лактоза и гли-

**Сравнение экспрессионных векторов созданных для получения рекомбинантных
HU-белков микоплазм**

Особенности экспрессионных векторов	HUSpm	HUMgal
Коммерческие плазмиды, в которые были введены модификации.	pET21d	pET22b
N-концевая последовательность рекомбинантного белка (коммерческий вектор, с таким же бхгис-TEV тагом)	MGSDKINNNNNH <i>ENLYFQ*GHM...</i> (pSpeedET)	MSYYNNNNNNHDYD <i>IPTTENLYFQ*GAM...</i> (pFAST-BacHT A,B,C)
Сайт рестрикции, использованный для клонирования в рамку с бхгис-TEV тагом	Nde1	Nco1

Сайт TEV-протеазы выделен курсивом, место расщепления TEV-протеазы отмечено знаком (*), дополнительные аминокислоты, остающиеся на N-конце после обработки TEV-протеазой подчеркнуты.

перин в специально подобранных соотношениях, обеспечивающих небольшую, но постоянную активацию lac-промотора. Мы использовали комбинацию 5052 (0,5%-й глицерин, 0,05%-я глюкоза и 0,2%-я лактоза), разработанную Studier [21]. Автоиндукцию проводили при тех же температурах, что и индукцию с помощью ИПТГ. Через 24, 48 и 72 ч автоиндукции уровень экспрессии целевых белков анализировали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза (рис. 2).

Результаты экспериментов по подбору оптимальных условий индукции HU-белков (на примере HUSpm), представленные на рис. 1, 2, показывают, что при понижении температуры индукции (автоиндукции) до 18°C во всех случаях наблюдалось явное снижение уровня экспрессии целевого белка, тогда-как при 32°C уровень экспрессии был примерно таким же, как при 25°C (автоиндукция в течение 24 и 72 ч) или слегка пониженным (химическая индукция и автоиндукции в течение 48 ч). Наилучший выход рекомбинантных белков наблюдался при химической индукции или автоиндукции в течение 24 ч. При сравнимых выхо-

дах целевых белков для препаративной наработки белка была выбрана индукция при помощи ИПТГ, так как в этом случае для введения ¹³C-изотопной метки можно было использовать только [U-¹³C]-глюкозу, тогда как при автоиндукции потребовались бы и [U-¹³C]-глюкоза, и более дорогой [U-¹³C]-глицерин.

Оценка влияния величины концентрации ИПТГ на уровень экспрессии показала, что максимальный уровень индукции HUSpm достигается при концентрации ИПТГ в диапазоне 0,2–1,0 мМ, а при уменьшении концентрации ИПТГ до 0,02 мМ уровень экспрессии целевого белка падает (рис. 1). Аналогичные результаты были получены при оптимизации условий экспрессии белка HUMgal (данные не приведены).

Таким образом, были подобраны оптимальные условия для препаративной наработки HU-белков (HUSpm и HUMgal), меченных изотопами. Установлено, что HU-белки имеют высокий уровень экспрессии на минимальной среде в достаточно широком диапазоне условий. Хорошая «экспрессируемость» данного класса белков определяется

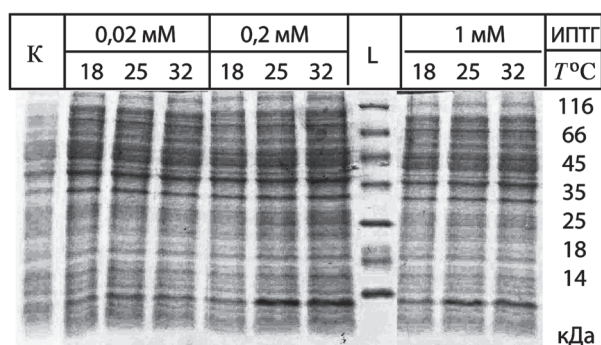


Рис. 1. Экспрессия HUSpm в штамме *E. coli* BL21(DE3) RIPL через 16 ч индукции с помощью ИПТГ (результаты разделения в 15%-м ДСН-ПААГ). Сверху приведены концентрация ИПТГ и температура индукции, справа – маркеры молекулярных весов (К – контроль)

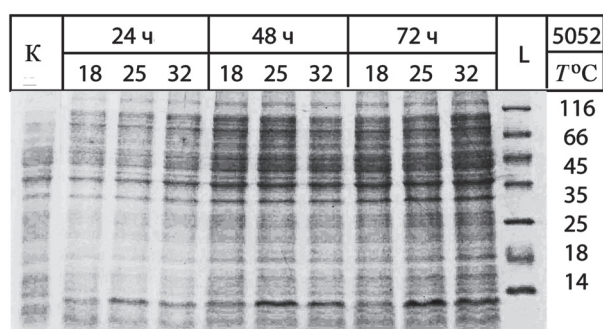


Рис. 2. Экспрессия HUSpm в штамме *E. coli* BL21(DE3) RIPL при автоиндукции смесью 5052 [21] (результаты разделения в 15%-м ДСН-ПААГ). Сверху приведены время и температура индукции, справа – маркеры молекулярных весов

тем, что HU-белки не обладают токсичностью в отношении клеток *E. coli*, более того, эти маленькие положительно заряженные белки помогают бактериальным клеткам адаптироваться к стрессовым условиям [7].

Общая схема выделения рекомбинантных HU-белков (HUSpm [17] и HUMgal [18]) сводилась к последовательному проведению двух металлохелатных аффинных хроматографий (МХАХ), разделенных обработкой TEV-протеазой, в результате чего при проведении второй МХАХ целевой продукт был не способен сорбироваться на Ni-NTA-агарозе. При проведении первой МХАХ после нанесения осветленного бактериального лизата на колонку проводили дополнительную промывку буферным раствором, содержащим 1 М NaCl. Данная модификация стандартного протокола способствовала полному удалению фрагментов бактериальной ДНК, выделяющихся с HU-белками. Известно, что гистоноподобные белки связывают разные виды нуклеиновых кислот с константами связывания K_d от 10^{-6} до 10^{-9} [22], поэтому в стандартных условиях лизиса бактериальных клеток, несмотря на присутствие 0,5 М NaCl и 0,5% (v/v) Тритона X100, а также обработку ультразвуком, HU-белки присутствуют в виде комплексов с ДНК. Результаты основных этапов выделения HU-белков (на примере HUSpm) приведены на рис. 3. Сравнение препаратов HUSpm

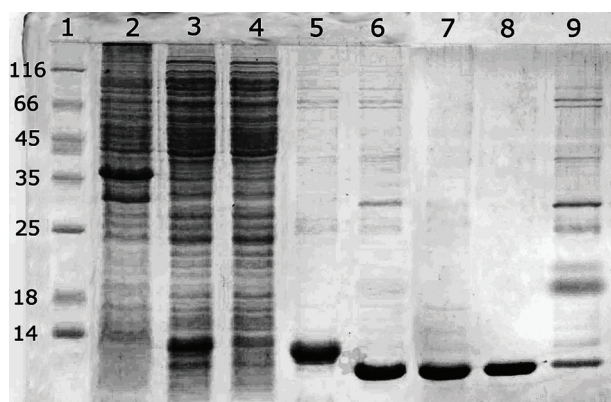


Рис. 3. Электрофоретический анализ (по Лэмбли) препаратов HUSpm, получаемых на разных стадиях выделения рекомбинантного белка. Дорожки: 1 – стандарты молекулярных масс (Fermentas SM0431, указана приблизительная мол. масса в кДа); 2 – остатки клеток после лизиса; 3 – осветленный лизат, нанесенный на колонку Ni-NTA; 4 – проскок через колонку; 5 – элюированный белок; 6 – смесь элюированного белка и TEV-протеазы после 24 ч инкубации; 7, 8 – HU-белок с удаленным гистидиновым тагом, не связавшийся с Ni-NTA агарозой; 9 – белки, связавшиеся с Ni-NTA агарозой, включая TEV-протеазу и отщепленный 6-гистидиновый таг

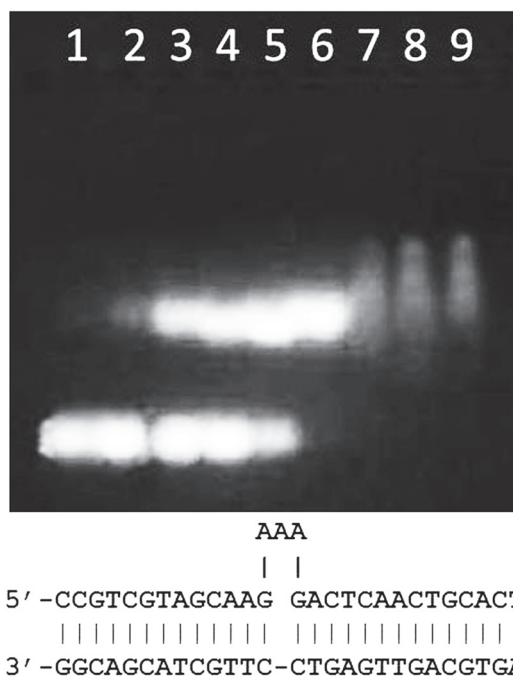


Рис. 4. Электрофоретический анализ в 2%-м агарозном геле подвижности олигонуклеотидного дуплекса JtA25/JtD22 (дорожка 1) и комплексов JtA25/JtD22 (50 пмоль на дорожку) с увеличивающимися количествами HUSpm: 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300 и 400 пмоль на дорожки 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9 соответственно. Структура дуплекса приведена под электрофореграммой

до и после обработки TEV-протеазой (дорожки 5 и 6 электрофореграммы) показывает, что наблюдается полное отщепление тага, несмотря на отсутствие рекомендованной компанией «Invitrogen» аминокислотной последовательности DYDIPTT, разделяющей N-концевой 6-гистидиновый таг и сайт TEV-протеазы. Кроме того, сравнение препаратов HUSpm, полученных после первой МХАХ (дорожки 5 и 6) с препаратами белка после второй МХАХ (дорожки 7 и 8, HUSpm, не связавшийся с колонкой), демонстрирует, что в результате второй МХАХ происходит освобождение целевого белка не только от отщепленного 6-гистидинового тага и содержащей 6-гистидиновый таг TEV-протеазы, но и от большинства белков, выделяющихся вместе с целевым продуктом за счет неспецифической сорбции на Ni-NTA-агарозе.

Таким образом, степень чистоты HUSpm, выделенного описанным выше способом, позволяла использовать белок для структурных исследований даже без дополнительной очистки с помощью гель-фильтрации. Второй микоплазменный HU-белок (HUMgal) выделяли аналогично (данные не приведены). Финальные выходы рекомбинантных белков с 1 л культуры составляли 5,5 и 6,0 мг со-

ответственно для HUSpm и HUMgal при чистоте более 95%.

Подбор условий получения комплекса HUSpm с дцДНК для ЯМР-экспериментов

ДНК-связывающие способности белков традиционно исследуют с помощью метода торможения в геле, основанного на том, что белок, связываясь с ДНК, тормозит ее миграцию сквозь полиакриламидный гель в процессе электрофореза в нативных условиях [23]. Визуализация результатов с помощью олигонуклеотидов, меченных радиоактивно или флуоресцентно, позволяет использовать в таких экспериментах пикомолярные или субмикромольные концентрации ДНК и белка. При структурных исследованиях с помощью ЯМР-спектроскопии используются препараты белков, имеющие миллимолярные концентрации, поэтому для подбора оптимальных условий получения комплекса HUSpm с дцДНК можно использовать электрофорез в агарозном геле с последующей визуализацией свободной и связанной с белком ДНК с помощью окрашивания бромистым этидием. HU-белки не имеют специфичности к какой-то определенной нуклеотид-

ной последовательности [24], но обладают повышенной специфичностью к дцДНК, содержащей какие-либо дефекты (неспаренные нуклеотиды, одноцепочечные разрывы и т.п. [22]). Использован олигонуклеотидный дуплекс, содержащий в одной цепи вставку из трех неспаренных нуклеотидов (рис. 4). Анализ электрофоретической подвижности образцов ДНК, смешанных с разными количествами HUSpm, представленный на рис. 4, показал, что при добавлении эквимольного количества белка примерно половина ДНК находится в виде комплекса, а при более чем двукратном избытке белка появляются высокомолекулярные агрегаты, формирование которых во время проведения ЯМР-экспериментов было бы нежелательно. Поэтому при получении комплекса HUSpm с олигонуклеотидным дуплексом JgA25/JrD22 использовали 20%-й молярный избыток ДНК по отношению к димеру белка.

Гетероядерная ЯМР-спектроскопия рекомбинантных HU белков из *S. melliferum* (HUSpm) и *M. gallisepticum* (HUMgal)

Для контроля эффективности разработанной процедуры экспрессии и очистки рекомбинант-

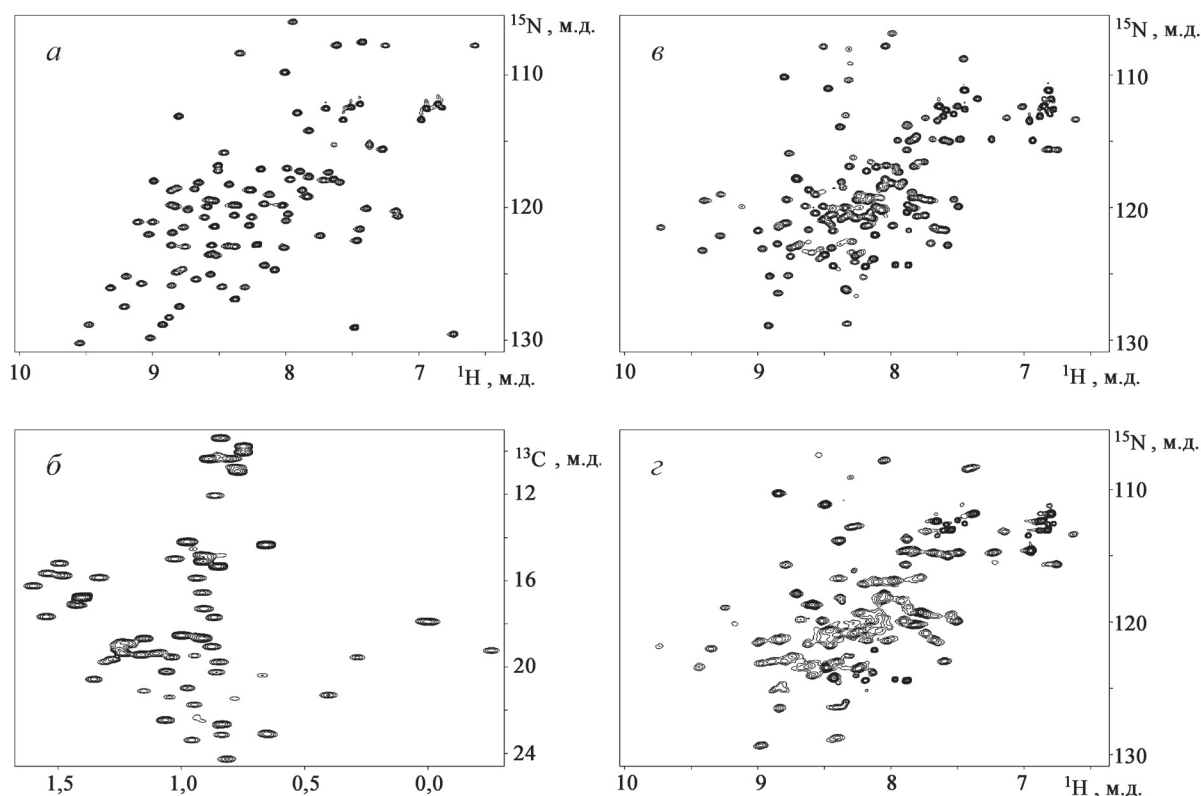


Рис. 5. Гетероядерные ЯМР-спектры рекомбинантных HU-белков, меченных изотопами ^{13}C и ^{15}N , из *S. Melliferum* (HUSpm) и *M. gallisepticum* (HUMGal): а – $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC (с сигналами от групп ^{15}NH и $^{15}\text{NH}_2$), б – $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC-CT (область с сигналами от $^{13}\text{CH}_3$ -групп) (HUMgal, pH 6,7; 35°C); в – $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC (HUSpm, pH 7,2; 35°C) в свободном состоянии; г – с добавлением ДНК-дуплекса JgA25/JrD22

ных HU-белков, меченных изотопами ^{13}C и ^{15}N (HUSpm и HUMgal), накоплены обзорные двумерные гетероядерные ЯМР-спектры $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC и $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC-CT (рис. 5), позволяющие подтвердить аминокислотный состав и свернутость белков, а также их гомогенность и чистоту. Наблюдаемое число $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -кросс-пиков в ЯМР-спектрах обоих HU-белков (рис. 5 а, в) соответствовало ожидаемому с учетом аминокислотной последовательности и медленных обменных процессов (возможной cis/trans изомерии пептидных связей Xxx-Pro). Спектры свидетельствовали о наличии не более 5 мол.% примеси пептидной природы, что свидетельствует о высокой степени чистоты полученных белковых препаратов. Характерная дисперсия химических сдвигов $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -кросс-пиков от амидных групп основной цепи (рис. 5 а, в), а также $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -кросс-пиков от метильных боковых групп (рис. 5 б) указывает на то, что белки HUMgal и HUSpm структурированы и имеют в составе как α -спиральные участки, так и β -тяжи, что соответствует характерному строению HU-белков [2, 8]. Для HUSpm наблюдалось существенное уширение сигналов от ряда амидных групп основной цепи, что указывает на наличие медленных (в микро-миллисекундном диапазоне) обмен-

ных процессов, происходящих в структуре белка. Сдвиг положения и уширения ряда $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -кросс-пиков в спектре $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC белка HUSpm (рис. 5, з) свидетельствует о том, что при добавлении ДНК-дуплекса (при соотношении белок/дуплекс, равном $\sim 2/1$) конформация и динамика белка претерпевают изменения и происходит формирование функционального комплекса димера HUSpm с ДНК-дуплексом JrA25/JrD22.

Таким образом, создана высокоэффективная система бактериальной экспрессии и протокол очистки рекомбинантных HU-белков, меченных изотопами ^{13}C и ^{15}N , из микоплазм *S. melliferum* (HUSpm) и *M. gallisepticum* (HUMgal), которые пригодны для структурных исследований с помощью ЯМР-спектроскопии высокого разрешения, а также подобраны условия проведения ЯМР-экспериментов и получены обзорные двумерные гетероядерные ЯМР-спектры $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC и $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC-CT свободных форм HU-белков (HUSpm и HUMgal), а также спектр $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC HUSpm в присутствии ДНК-дуплекса. Поскольку HU-белки из разных организмов имеют сходное строение, разработанные методики универсальны и применимы для всех представителей данного семейства.

Работа выполнена при поддержке РФФ (проект № 15-14-00063).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Drlica K., Rouviere-Yaniv J. // Microbiol. Rev. 1987. Vol. 51. P. 301.
2. Dame R.T. // Mol. Microbiol. 2005. Vol. 56. P. 858.
3. Rouviere-Yaniv J., Gros F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1975. Vol. 72. P. 3428.
4. Bensaid A., Almeida A., Drlica K., Rouviere-Yaniv J. // J. Mol. Biol. 1996. Vol. 256. P. 292.
5. Dorman C.J. // Nat. Rev. Microbiol. 2013. Vol. 11. P. 349.
6. Kamashev D., Rouviere-Yaniv J. // EMBO J. 2000. Vol. 19. P. 6527.
7. Oberto J., Nabti S., Jooste V., Mignot H., Rouviere-Yaniv J. // PLoS One 2009. 4:e4367.
8. Grove A. // Curr. Issues Mol. Biol. 2010. Vol. 13. P. 1.
9. Huisman O., Faelen M., Girard D., Jaffé A., Toussein A., Rouviere-Yaniv J. // J. Bacteriol. 1989. Vol. 171. P. 3704.
10. Dri A. M., Rouviere-Yaniv J., Moreau P.L. // J. Bacteriol. 1991. Vol. 173. P. 2852.
11. Fernandez S., Rojo F., Alonso J.C. // Molecular microbiology. 1997. Vol. 23. P. 1169.
12. Bhowmick T., Ghosh S., Dixit K., Ganesan V., Ramagopal U.A., Dey D., Sarma S.P., Ramakumar S., Nagaraja V. // Nature communications. 2014. Vol. 5. P. 4124.
13. Zhang R., Lin Y. // Nucleic. Acids. Res. 2009. Vol. 37. P. 455.
14. Dillon S. C., Dorman C.J. // Nat Rev Microbiol. 2010. Vol. 8. P. 185.
15. Glass J.I., Assad-Garcia N., Alperovich N., Yooseph S., Lewis M.R., Maruf M., Hutchison C.A., Smith H.O., Venter J.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. Vol. 103. P. 425.
16. Anderson A. // Chem. Biol. 2003. Vol. 10. P. 787.
17. Boyko K., Gorbacheva M., Rakitina T., Korzhenevskiy D., Vanyushkina A., Kamashev D., Lipkin A., Popov V. // Acta Cryst. F. 2015. Vol. 71. P. 24.
18. Николаева А.Ю., Тимофеев В.И., Бойко К.М., Корженевский Д.А., Ракитина Т.В., Дороватовский П.В., Липкин А.В. // Кристаллография. 2015. Vol. 60. С. 922.
19. Cavanagh J., Fairbrother W.J., Palmer A.G., Skelton N.J. Protein NMR spectroscopy: principles and practice. San Diego, 2006.
20. Studier F.W. // Protein Expr Purif. 2005. Vol. 41. P. 207.
21. Laemmli U.K. // Nature. 1970. Vol. 227 (5259). P. 680.
22. Balandina A., Kamashev D., Rouviere-Yaniv J. // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277. P. 27622.
23. Garner M.M., Revzin A.A. // Nucleic. Acids Res. 1981. Vol. 9. P. 3047.
24. Kamashev D.E., Esipova N.G., Ebralidse K.K., Mirzabekov A.D. // FEBS Lett. 1995. Vol. 375. P. 27.

PREPARATION OF THE RECOMBINANT HU-PROTEINS FROM
S. MELLIFERUM AND *M. GALLISEPTICUM* AND OF THEIR
COMPLEXES WITH DS-DNA FOR STRUCTURAL NMR EXPERIMENTS

D.A. Altukhov¹, Y.K. Agapova¹, A.V. Vlaskina¹, D.A. Korzhenevskiy¹,
A.Y. Nikolaeva¹, A.M. Frank-Kamenetskaya¹, E.V. Bocharov², T.V. Rakitina^{1,2,*}

¹National research centre «Kurchatov Institute», Moscow, Russia; ²Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» RAS, Moscow, Russia, Shemyakin Institute of Bioorganic chemistry RAS, Moscow, Russia; *e-mail: taniarakitina@yahoo.com

We created a high-performance system for expression of ¹³C, ¹⁵N-double-labeled recombinant HU-proteins from mycoplasmas *S. melliferum* (HUSpm) and *M. gallisepticum* (HUMgal), and a purification protocol that yields protein samples suitable for structure studies by high-resolution NMR. Using these proteins we optimized the conditions of NMR experiments and obtained two-dimensional heteronuclear ¹H/¹⁵N-HSQC and ¹H/¹³C-HSQC-CT NMR spectra of free HU-proteins (HUSpm and HUMGal), and ¹H/¹⁵N-HSQC spectrum of a complex between HUSpm and a double-stranded DNA (ds-DNA). The techniques we created are applicable for the studies of HU-proteins from other organisms. They allow analyzing structure and dynamics of free proteins and of their conformational changes induced by binding of various ds-DNAs or of DNA binding inhibitors.

Key words: DNA binding, histone-like HU-proteins, bacterial expression system, NMR.

Сведения об авторах: Алтухов Дмитрий Алексеевич – инженер-исследователь Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (altuhovd@mail.ru); Агапова Юлия Константиновна – лаборант-исследователь Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (agapova.jk@gmail.com); Власкина Анна Валентиновна – ст. науч. сотр. Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», канд. хим. наук (annavlaskina@yandex.ru); Корженевский Дмитрий Андреевич – науч. сотр. Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», канд. биол. наук (igra-voina@yandex.ru); Николаева Алена Юрьевна – инженер-исследователь Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (aishome@mail.ru); Франк-Каменецкая Анастасия Михайловна – лаборант-исследователь Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (a_frank93@mail.ru); Боcharов Эдуард Валерьевич – ст. науч. сотр. отдела структурной биологии Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, канд. хим. наук (edvbon@mail.ru); Ракитина Татьяна Владимировна – нач. лаб. Белковая фабрика Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», ст. науч. сотр. Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, канд. хим. наук (taniarakitina@yahoo.com).