

УДК 577.3

Д.В. Лебедев, М.Л. Соколова, Я.В. Федорова, Г.Е. Побегалов,
Д.Б. Червякова, С.Б. Ланда, М.А. Ходорковский

НАДМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СТРУКТУРЫ, ОБРАЗУЕМЫЕ IN VITRO БЕЛКОМ ТИР49А

D.V. Lebedev¹, M.L. Sokolova², Ya.V. Fedorova³, G.E. Pobegalov⁴,
D.B. Chervyakova⁵, S.B. Landa⁶, M.A. Khodorkovskiy⁷

^{1, 5, 6} V.P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute,
Orlova Roscha, Gatchina, 188300, Russia

^{2, 3, 4, 7} St. Petersburg State Polytechnical University,
29 Politekhnikeskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia

SUPRAMOLECULAR STRUCTURES FORMED BY TIP49A PROTEIN IN VITRO

Белки ТИР49А входят в ряд комплексов, ремодулирующих хроматин человека, и легко олигомеризуются *in vitro* с образованием различных агрегатов размером в десятки и сотни нанометров. В работе показано, что неспецифическая агрегация белка может быть значительно ослаблена в присутствии детергента Triton-X100 в концентрациях 0,05–0,10 %. Кроме того, добавление детергента разрушает уже имеющиеся агрегаты, что позволяет выделить олигомерные формы белка, вероятно обладающие биологической активностью. Представленные данные малоуглового рентгеновского рассеяния и динамического светорассеяния позволяют предположить, что агрегация белков ТИР49А, наблюдаемая *in vitro*, носит обратимый характер; при этом в результате олигомеризации этот белок может образовывать два различных типа устойчивых филаментных структур.

БЕЛКИ СЕМЕЙСТВА ТИР49. МАЛОУГЛОВОЕ РЕНТГЕНОВСКОЕ РАССЕЙНИЕ. СВЕТО-РАССЕЙНИЕ.

Tip49a, a human protein isolated with several chromatin-remodulating complexes, is readily oligomerized *in vitro* forming polydisperse aggregates of the size of tens and hundreds of nanometers. In this work we show that the non-specific aggregation of the protein can be effectively countered by 0.05–0.10 % concentrations of a detergent Triton-X100. We also show that addition of the detergent destroys aggregates formed already that allows us to isolate oligomeric forms of the protein which may have biological significance. When combined, the results of small angle X-ray scattering and dynamic light scattering experiments suggest that TIP49A aggregation observed *in vitro* is reversible with the protein oligomerization in two different types of stable filamentous structures.

TIP49 PROTEINS. SMALL ANGLE X-RAY SCATTERING. LIGHT SCATTERING.

ТИР49А представляет собой ядерный белок эукариот, который выделяется в составе комплексов ремодуляции хроматина (INO80, Tip54 и др.). Предполагается, что этот белок участвует в ремодуляции хроматина в процессе репарации, в регуляции транскрипции и в процессе деления клеток. *In vitro* белок проявляет слабую АТФазную

и геликазную активность, при этом связь структуры и функции не установлена [1, 2]. Согласно структуре, полученной методом рентгеновской кристаллографии, мономер белка состоит из трех доменов: D1 и D3, формирующих модуль связывания и гидролиза АТФ, и ДНК-связывающего домена D2 [1, 4].

Белок TIR49A легко олигомеризуется в растворе. На основании данных рентгеновской кристаллографии можно предположить образование целого ряда олигомерных состояний белка от тримера до додекамера, часть из которых наблюдалась экспериментально [3]. Роль этих состояний во взаимодействии данного фермента с молекулой ДНК на настоящий момент не установлена. Можно предположить, что связывание белка с ДНК модулируется присоединением АТФ к белку, которое в свою очередь обусловлено подвижностью шарниров в области аминокислотных остатков 366 и 383.

In vitro белки Tir49 имеют сильную склонность к неспецифической агрегации, что значительно затрудняет исследование функциональных олигомерных комплексов этих белков. В настоящей работе исследованы олигомерные состояния и агрегация белка TIR49A дикого типа и мутантных белков Y366A и G383A.

Методики исследования

Рекомбинантные белки TIR49A дикого типа, а также точечные мутанты Y366A и G383A были экспрессированы в культуру клеток бактерии *E.coli* с использованием вектора pET3a-TIR49a, несущего ген белка TIR49a крысы с 6his-flag тэгами на N-конце белка. Вектор был получен от М.Ю. Григорьева, сотрудника Лаборатории молекулярной биологии эукариот университета г. Тулузы, Франция. Индукция синтеза белка осуществлялась добавлением реагента ИПТГ до концентрации 0,25 мМ в культуру клеток *E.coli* Rosetta (объем 600 мл). Клетки осаждали центрифугированием (приблизительно по 1,5 г клеточного осадка) и лизировали с помощью лизоцима. Растворимую часть клеточного лизата подвергали хроматографической очистке на Ni-NTA-агарозе согласно протоколу производителя (QIAGEN).

Очищенный белок переводили диализом в буфер 20 мМ Tris-HCl мМ, pH = 7,4 при 4 °С, содержащий 50 мМ KCl и (за исключением образцов, свободных от магния) 5 мМ MgCl₂. Для проверки качества очистки белка проводили электрофорез в полиакриламидном геле в денатурирующих усло-

виях. Выход белка из одного выделения составлял около 1 мг. Для экспериментов по динамическому светорассеянию белок подвергался дополнительной стадии хроматографии (гель-фильтрации) для разделения олигомеров белков по размерам. Непосредственно перед измерением часть образцов инкубировалась в буфере, содержащем 0,05 % детергента (Triton-X100) при комнатной температуре в течение 20 мин. Измерения производилось на приборе Malvern Zetasizer Nano (Malvern Instruments Ltd, Англия) в стандартной конфигурации.

Измерение спектров малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) белка TIR49A в растворе проводились на станции BM-29 источника синхротронного излучения ESRF (г. Гренобль, Франция) в диапазоне амплитуд векторов рассеяния от 0,04 до 3 нм⁻¹ при температуре 20 °С. Белок добавлялся в количестве, необходимом для получения конечной концентрации от 0,5 до 4,5 мг/мл, к 20 мМ Tris-HCl буферу (pH = 7,4 при 4 °С).

В соответствующих образцах к буферному раствору добавлялся хлорид магния (до 5 мМ) и двунитевая ДНК фага λ. С целью уменьшения степени агрегации белка в часть образцов с концентрацией белка около 1 мг/мл был добавлен Triton-X100 (0,05 %) с последующим увеличением концентрации белка путем центрифугирования на диализной мембране с молекулярным весом отсечки 10 кДа. Данные МУРР корректировались на фоновые спектры, полученные на соответствующих буферных растворах.

Питательная среда LB для выращивания клеток приготавливалась из готовой смеси фирмы Amresco. Реактивы для приготовления буферов, проведения электрофорезов и других процедур (Tris, ЭДТА, натрия додецилсульфат, акриламид, бисакриламид, β-меркаптоэтанол, изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ), фенолметилсульфонилфторид (ФМСФ), имидазол, АТФ, АТФ_γS) были приобретены в фирме Sigma-Aldrich, США. Остальные реактивы (HCl, ксиленианол, бромфеноловый синий, глицин, уксусная кислота, глицерин, изопропанол, NaH₂PO₄ и др.)

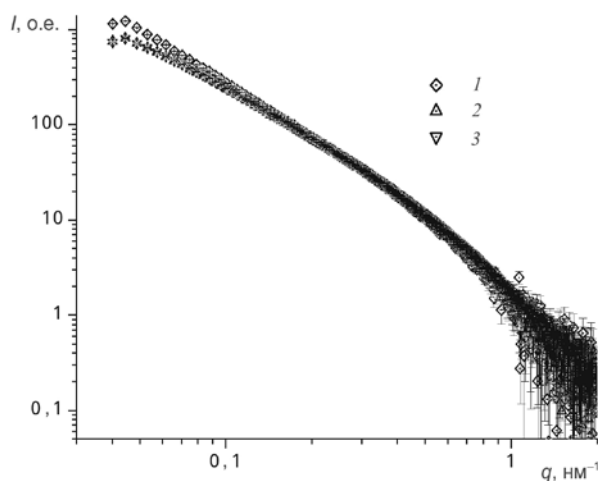


Рис. 1. Спектры малоуглового рентгеновского рассеяния белка TIR49A при различных концентрациях, мг/мл: 0,5 (3), 1,5 (2), 4,5 (1)

приобретались в российских компаниях. Лизоцим, белковый маркер и дитиотрейтол (ДТТ) приобрели в компании Fermentas (США). Хроматографический носитель — агарозу Ni-NTA Superflow получили из компании QIAGEN (США).

Результаты и их обсуждение

Анализ данных малоуглового рентгеновского рассеяния показал высокую склонность белка к агрегации (рис. 1), что выражалось в росте интенсивности в малых углах рассеяния и отсутствии области

Гинье в диапазоне векторов рассеяния до $0,04 \text{ nm}^{-1}$. Это указывает на образование аморфных полидисперсных агрегатов размером 25 нм и более. Для сравнения отметим, что максимальный диаметр гексамера белка, наблюдаемого в электронной микроскопии, составляет менее 12 нм [3]. Понижение концентрации белка с 4,5 до 0,5 мг/мл привело лишь к незначительному уменьшению агрегации и изменению спектров рассеяния (см. рис. 1). Аналогичные результаты были получены для мутантных белков Y366A и G383A.

Высокая склонность белка к агрегации подтверждается данными динамического светорассеяния (ДСР). В то же время анализ данных ДСР для мутантного белка Y366A (рис. 2, а) показал присутствие двух фракций частиц со средними размерами $15,5 \pm 2,3$ и 59 ± 17 нм. Массовая доля фракции с гидродинамическим диаметром 15 нм составляла около 70 %, что соответствует примерно 7 %-му вкладу в интенсивность рассеяния.

Следует отметить, что интенсивности рассеяния в малые углы для МУРР и интенсивности ДСР имеют одинаковую зависимость от размера рассеивающей частицы и пропорциональны квадрату ее объема, поэтому даже сравнительно небольшое количество крупных агрегатов может вносить основной вклад в спектры рассеяния.

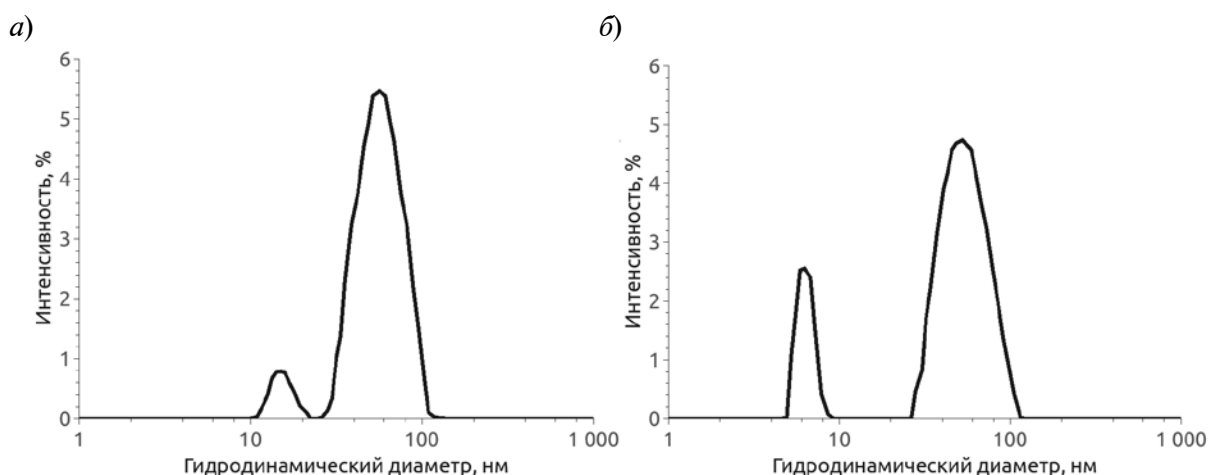


Рис. 2. Динамическое светорассеяние белка TIR49A Y366A в отсутствие детергента (а) и после инкубации с 0,05 % Triton-X100 (б)

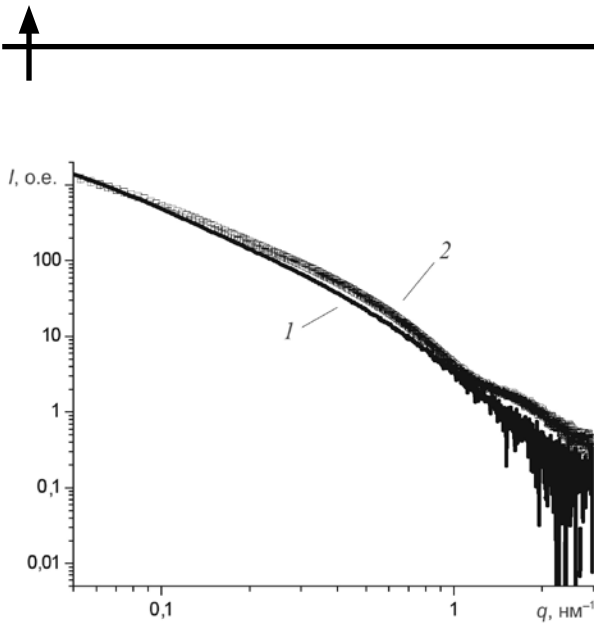


Рис. 3. Спектры малоуглового рентгеновского рассеяния белка TP49A, полученные в отсутствие детергента (1) и с применением методики концентрации этого белка в присутствии детергента Triton-X100 (2)

Инкубация белка в присутствии 0,05 % детергента привела к почти полному исчезновению крупных полидисперсных агрегатов белка и полному исчезновению фракции с размером агрегатов 15 нм (рис. 2, б).

Основная масса белка (более 98 %) имела олигомерную форму с гидродинамическим диаметром $6,4 \pm 0,7$ нм, что соответствует молекулярной массе 260 ± 80 кДа, близкой к массе пента- или гексамера белка. Полидисперсные агрегаты (52 ± 17 нм) составляли только 1,6 % общей массы белка, при этом их вклад в рассеяние составлял чуть более 80 %.

Спектры малоуглового рентгеновского рассеяния белка TP49A в присутствии детергента также показывают значительный вклад белковых агрегатов, однако при этом наблюдается заметное увеличение интенсивности малоуглового рассеяния в больших углах, что указывает на увеличение доли частиц небольшого размера (мономеров либо олигомеров белка) в растворе (рис. 3).

Поскольку по данным ДСР средний размер агрегатов в присутствии Triton-X100 менялся незначительно, мы использовали это наблюдение для интерпретации спектра МУРР белка, обработанного детергентом, в виде линейной комбинации спектра мало-

углового рассеяния в отсутствие детергента, и гауссовой функции, соответствующей области Гинье спектра монодисперсных частиц:

$$I_t(q) = aI_1(q) + I_0 \exp\left(-\frac{R_g^2 q^2}{3}\right), \quad (1)$$

где R_g – радиус гирации частицы; I_1 , I_t – интенсивности рассеяния до и после добавления детергента, соответственно.

Для модели вытянутых частиц (филаментов) использовалась аналогичная формула:

$$I_t(q) = a \cdot I_1(q) + I_{c0} \exp\left(-\frac{R_c^2 q^2}{2}\right), \quad (2)$$

где R_c – поперечный радиус гирации.

Коэффициенты a , I_0 (либо I_{c0}) и радиус гирации R_g (R_c) находились путем регрессии экспериментальных данных по формулам (1) или (2) методом наименьших квадратов в диапазоне малых углов, где и применимо приближение Гинье.

Как видно из рис. 4, спектры рассеяния мутантного белка Y366A в диапазоне амплитуд вектора рассеяния $0,05 - 0,25$ нм⁻¹ могут быть описаны функцией (1). Результаты МУРР согласуются с данными ДСР и

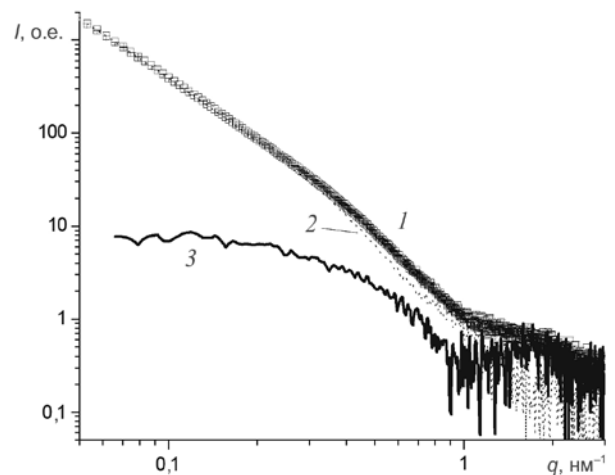


Рис. 4. Спектр малоуглового рентгеновского рассеяния мутантного белка TP49A Y366A (1); представлен в виде суммы интенсивностей рассеяния белком в агрегированном состоянии (2) и монодисперсными частицами (3) с радиусами инерции 4,7 нм.

Регрессия по формуле (1) в диапазоне $0,05 - 0,25$ нм⁻¹, $\chi^2 = 3,66$

указывают на присутствие частиц с радиусом инерции $4,7 \pm 0,4$ нм, что близко к расчетным значениям для пента- и гексамера белка ($5,1 - 5,4$ нм).

Обработка спектров малоуглового рассеяния белка дикого типа, аналогичная проведенной для мутанта G383A, дает значения радиуса гирации более 10 нм, что значительно больше, чем у известных олигомерных форм белка. Анализ данных

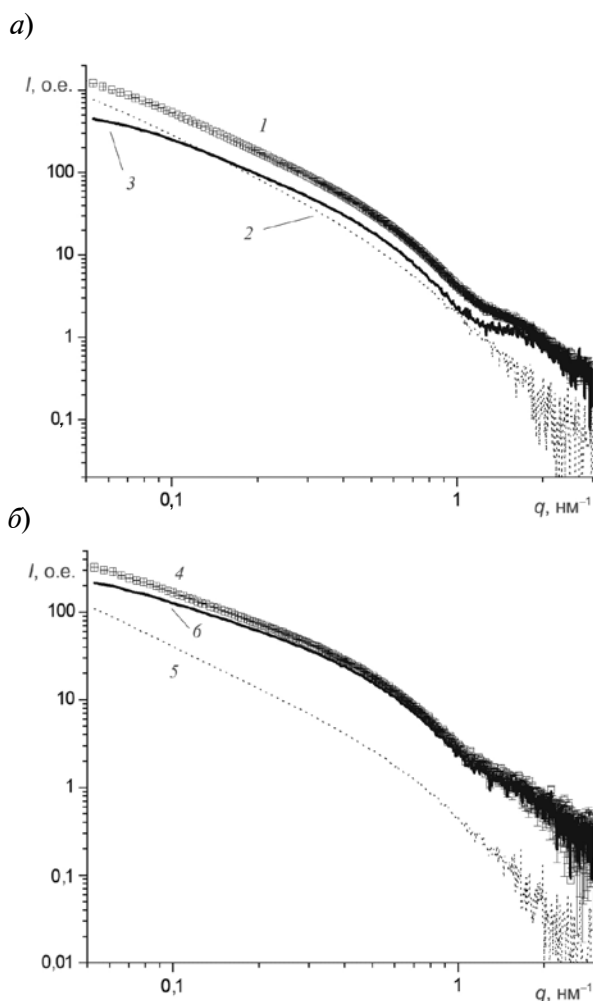


Рис. 5. Спектры малоуглового рентгеновского рассеяния (1, 4) белка TIR49A дикого типа в отсутствие магния (а) и комплекса этого белка с двухнитевой ДНК (б). Оба спектра представлены в виде суммы интенсивностей рассеяния объектами в агрегированном состоянии (2, 5) и монодисперсными филаментами (3, б) с различными поперечными радиусами инерции, нм: 4,7 (а), 1, 6 (б).

Регрессии проведены по формуле (2) в диапазоне $0,08 - 0,20$ нм⁻¹; $\chi^2 = 4,29$ (а) и $0,95$ (б)

МУРР показал, что, в отличие от мутантного белка Y366A, для этих белков агрегация в присутствии детергента в значительной степени зависит от содержания магния. Данные, полученные в отсутствие магния, хорошо описываются с использованием формулы (2) в диапазоне векторов рассеяния от $0,08$ до $0,2$ нм⁻¹. Результат регрессии данных для белка дикого типа приведен на рис. 5, а и дает поперечный радиус инерции $4,7 \pm 0,2$ нм. Подобная модель для мутанта G383A дает поперечный радиус гирации филамента $5,0 \pm 0,2$ нм. Анализ спектров, полученных в присутствии двунитевой ДНК, дает соответствующие параметры $R_c = 1,6 \pm 0,7$ нм для белка дикого типа (рис. 5, б) и $4,3 \pm 0,3$ нм для мутантного белка G383A.

Наши данные указывают на то, что агрегация белка TIR49A *in vitro* является обратимой. Аморфные агрегаты размером в несколько десятков нанометров стабилизируются магнием и разрушаются при добавлении 0,05 % детергента Triton-X100. По данным МУРР основной олигомерной формой белка дикого типа вероятнее всего являются филаменты с радиусом инерции, приблизительно соответствующим поперечному радиусу инерции белкового гексамера. Таким образом, наблюдаемые результаты могут указывать на образование непрерывных филаментов белка в конформации, близкой к наблюдаемой в гексамере, либо линейных структур из отдельных гексамеров.

Мутантный белок Y366A не образует филаментов в присутствии детергента. Однако в экспериментах по ДСР видна полидисперсная фракция белка с гидродинамическим диаметром около 15 нм, которая полностью исчезает после добавления 0,05 % Triton-X100. Можно предположить, что эта фракция также соответствует филаментным структурам длиной в 20 – 30 нм, которые менее стабильны, чем у дикого типа. Возможно, что за счет изменения конформационной подвижности этот белок не в состоянии образовывать непрерывный филамент, а формируемые вместо него линейные агрегаты разрушаются детергентом.

Взаимодействие белка дикого типа с ДНК приводит к значительному уменьшению толщины филамента, поперечный радиус инерции которого падает приблизительно до 2 нм. Такое изменение структуры филамента должно быть связано со значительными конформационными изменениями в мономере, возможно, в области, отвечающей за связывание АТФ, поскольку данный эффект не наблюдается в мутантном белке G383A.

Вопрос о функциональной роли белка TIP49A и ее молекулярных механизмах на настоящий момент остается открытым. Постулируемая геликазная активность этого фермента, основанная на принципе структурного сходства, по всей вероятности, может осуществляться гексамерной формой белка. В то же время для фермента, суб-

стратом которого является линейный полимер (ДНК), образование филаментов и их структурная реорганизация при взаимодействии с субстратом может указывать на другие механизмы участия TIP49A в процессе ремодуляции хроматина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК №. 11.519.11.2002 и Стипендия Президента РФ № СП-5651.2013.4) и РФФИ (грант № 12-02-12053 офи_м) с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр нанобиотехнологий ГОУ СПбГПУ» на базе ФГБОУ ВПО СПбГПУ. Также мы благодарим Европейский центр синхротронного излучения (ESRF, г. Гренобль, Франция) за предоставленную возможность использования синхротронного излучения, и персонально Андрею Мак-Карти за помощь в проведении эксперимента на станции BM29.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Matias, P.M.** Crystal structure of the human AAA+ protein RuvBL1 [Text] / P.M. Matias, S. Gorynia, P. Donner, M.A. Carrondo // J. Biol. Chem. – 2006. – Vol. 281. – № 50. – P. 38918–38929.
2. **Huen, J.** Rvb1-Rvb2: essential ATP-dependent helicases for critical complexes [Text] / J. Huen, Y. Kakiyama, F. Ugwu [et al.] // Biochem. Cell Biol. – 2010. – Vol. 88. – № 1. – P. 29–40.
3. **Niewiarowski, A.** Oligomeric assembly and interactions within the human RuvB-like RuvBL1 and RuvBL2 complexes [Text] / A. Niewiarowski, A.S. Bradley, J. Gor [et al.] // Biochem. J. – 2010. – Vol. 429. – № 1. – P. 113–125.
4. **Petukhov, M.** Large-scale conformational flexibility determines the properties of AAA+ TIP49 ATPases [Text] / M. Petukhov, A. Dagkessamanskaja, M. Bommer [et al.] // Structure. – 2012. – Vol. 20. – № 8. – P. 1321–1331.

ЛЕБЕДЕВ Дмитрий Витальевич – старший научный сотрудник НИЦ «Курчатовский институт» Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова.

188300, Ленинградская обл., г. Гатчина, Орлова роща
dtry@omrb.pnpi.spb.ru

СОКОЛОВА Мария Леонидовна – студентка Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.

195251, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
arimiora@gmail.com

ФЕДОРОВА Яна Витальевна – студентка Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.

195251, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
kedrovka126@rambler.ru

ПОБЕГАЛОВ Георгий Евгеньевич – аспирант кафедры биофизики Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.

195251, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
lwdrums@gmail.com

ЧЕРВЯКОВА Дарья Борисовна – научный сотрудник НИЦ «Курчатовский институт» Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова.

188300, Ленинградская обл., г. Гатчина, Орлова роща
darya.dcd@gmail.com

ЛАНДА Сергей Борисович – старший научный сотрудник НИЦ «Курчатовский институт» Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова.

188300, Ленинградская обл., г. Гатчина, Орлова роща
sergey.landa@gmail.com

ХОДОРКОВСКИЙ Михаил Алексеевич – кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник, директор НИК «Нанобиотехнологии» Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.

195251, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
khodorkovskii@mail.ru