

ИССЛЕДОВАНИЕ ОКТАМЕРИЗУЮЩИХСЯ ВТВ-ДОМЕНОВ ГРУППЫ TRAMTRACK МЕТОДОМ МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЙНИЯ РЕНТГЕНОВСКИХ ЛУЧЕЙ (SAXS)

Бончук А.Н.¹, Бойко К.М.^{2,3}, Качалова Г.С.², Георгиев П.Г.¹, Максименко О.Г.¹

¹Институт биологии гена РАН

ул. Вавилова, 34/5, г. Москва, 119334, РФ; e-mail: errinaceus@rambler.ru

²ФИЦ Биотехнологии РАН

Ленинский проспект, 33, г. Москва, 119071, РФ

³Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

пл. Академика Курчатова, 1, г. Москва, 123098, РФ

Поступила в редакцию: 28.06.2018

Аннотация. В геноме *Drosophila* присутствует несколько десятков транскрипционных факторов, содержащих ВТВ-домены, формирующие октамеры (группа ТТК). При помощи метода малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (SAXS) получены первые данные о пространственной структуре доменов данного типа двух белков – CG6765 и CG32121. Данные SAXS подтверждают способность доменов этого типа к октамеризации. Построены модели низкого разрешения, позволяющие сделать выводы о пространственной организации октамеров.

Ключевые слова: мультимеризация, малоугловое рассеяние рентгеновских лучей, хроматин.

Белковые домены ВТВ (bric-a-brac, tramtrack and broad complex) являются одними из широко распространенных белковых мотивов, участвующих в различных белок-белковых взаимодействиях [1]. Данные домены обнаружены на N-концах многих транскрипционных факторов [2]. Согласно литературным данным, ВТВ-домены способны образовывать димеры [3, 4] или олигомеры более высокого порядка [2, 5]. Так, у *Drosophila* было описано обширное семейство октамеризующихся ВТВ-доменов (группа ТТК, характеризующаяся уникальным мотивом FxRWN на N-конце, где x- гидрофобная аминокислота [2, 6]). На сегодняшний день данные о структуре октамеризующихся ВТВ-доменов группы ТТК полностью отсутствуют, несмотря на то, что известно более 10 кристаллических структур димеризующихся ВТВ-доменов. Помимо специфического взаимодействия между ВТВ-доменами различных архитектурных белков, показано также, что ВТВ-домены способны привлекать другие белки, не содержащие такие домены [4]. Также ВТВ-домены группы ТТК способны к избирательному взаимодействию друг с другом, однако механизм такого взаимодействия остается неясным [2].

Нами был проведен широкий скрининг возможности экспрессии разных представителей доменов семейства ТТК с целью исследования структурных особенностей ВТВ-доменов этой группы. 21 домен был клонирован в экспрессионный вектор в рамке с Тиоредоксином, который может быть отрезан при помощи TEV-протеазы. Была протестирована эффективность экспрессии, растворимость полученных конструкций и их стабильность после очистки и отрезания Тиоредоксина. В результате для нескольких доменов были получены белковые препараты высокой степени чистоты и гомогенности, однако попытки их кристаллизации были неудачными. Было проведено исследование двух ВТВ-доменов семейства ТТК (CG6765 и CG32121) при помощи метода малоуглового рассеяния рентгеновского излучения (SAXS). Эксперимент проводился на источнике рентгеновского излучения BM29 BioSAXS в ESRF (Гренобль, Франция). Измерения проводились при длине волны 0,099 нм, концентрация белка варьировалась от 1 до 6 мг/мл. Радиус гирации (R_g) белковой молекулы в растворе был рассчитан при помощи аппроксимации Гинье при малых углах ($s < 1.3/R_g$, $s = 4\pi\sin\theta/\lambda$, где 2θ – угол рассеяния), интенсивность $I(s)$ принималась равной $I_0 \exp(-(sR_g)^2/3)$. Для оценки максимального размера частиц D_{max} , функция парных расстояний $P(r)$ была рассчитана при помощи алгоритма GNOM из программного пакета ATSAS). Молекулярный вес молекул был рассчитан исходя из исключенного объема гидратированных белковых молекул по закону Поро для гомогенных частиц. Рассчитанные характеристики частиц ВТВ-доменов в растворе приведены в Таблице 1. В результате эксперимента в зависимости от концентрации образца для ВТВ-домена CG6765 были получены следующие значения: $R_g = 3,82-4,42$ нм, $D_{max} = 15,89-18,03$ нм, что соответствует молекулярной массе 88-117 кДа при концентрации 1.5мг/мл и 106-141 при 6.0 мг/мл подтверждает формирование октамеров (молекулярная масса мономера составляет 15,3 кДа). В случае ВТВ-домена белка CG32121 ситуация была менее однозначной: в процессе очистки выяснилось, что олигомеры медленно диссоциируют на частицы более низкого порядка, поэтому исследуемый препарат вероятнее всего представляет собой смесь частиц разного размера, особенно при низких концентрациях, когда равновесие смещается в сторону диссоциации. По данным малоуглового рассеяния рентгеновских лучей функция парных расстояний имеет несколько пиков, что также говорит о том, что в данном случае образец является смесью олигомеров разного порядка.

Таблица 1. Рассчитанные по данным малоуглового рассеяния рентгеновских лучей характеристики частиц ВТВ-доменов белков CG6765 и CG32121 в растворе

Полипептид	Концентрация, мг/мл	Rg, нм	Dmax, нм	Vp, нм ³	Молекулярная масса, кДа	Молекулярная масса мономера, кДа
CG6765 1-133	1,5	3,82	15,89	175,39	87,70-116,93	15,3
CG6765 1-133	3,0	4,23	18,03	191,43	95,72-127,62	15,3
CG6765 1-133	6,0	4,42	15,24	212,58	106,3-141,72	15,3
CG32121 1-147	1,06	5,78	17,93	436,18	218,1-290,79	17,4
CG32121 1-147	2,1	6,50	23,08	457,11	228,56-304,74	17,4
CG32121 1-147	4,2	6,10	20,21	449,63	224,82-299,75	17,4

Рассчитанные параметры для частиц данного домена в растворе соответствуют скорее олигомерам, содержащим 12-16 субъединиц (рассчитанная по экспериментальным данным масса 218-304 кДа при молекулярной массе мономера 17,4 кДа). В то же время, по данным гель-фильтрации и химической сшивки, данный ВТВ-домен является октамером, как и другие представители семейства ТТК. При моделировании формы частиц были использованы данные, полученные для ВТВ-домена CG6765.

Как видно из рассчитанных характеристик частиц в растворе – максимальный линейный размер частиц Dmax существенно превосходит радиус гирации Rg, что говорит о том, что частицы, скорее всего, имеют вытянутую форму, график функции парных расстояний показан на рисунке 1А. Поскольку олигомеры по всей видимости имеют четное число субъединиц, и большинство известных структур ВТВ-доменов являются симметричными димерами, мы предположили, что октамер состоит из четырех димеров, при моделировании также учитывалась возможная симметрия частиц, были рассмотрены варианты симметрии P2, P4₂. *Ab initio* модели низкого разрешения были получены при помощи алгоритмов DAMMIN, DAMMIF и GASBOR из программного пакета ATSAS. Достоверность построения моделей оценивалась при помощи онлайн-сервиса AMBIMETER, рассматривались модели со значением индекса достоверности менее 2.

Большинство моделей имело вытянутую форму, часто с полостью в центре, одна из таких моделей показана на рис. 1Б. При такой форме молекулы можно предположить, что тетрамеры молекул связываются друг с другом при помощи обращенных внутрь N-концевых участков, содержащих последовательность FxRWN. Однако некоторые модели имели правильную шарообразную форму, либо форму шара с несколькими выступающими частями или с полостью внутри. На основании имеющихся данных невозможно однозначно определить форму исследуемых белковых молекул, наиболее вероятной представляется форма, представленная на рисунке 1Б. Таким образом, данные малоуглового рассеяния рентгеновских лучей в растворе, полученные для ВТВ-домена белка CG6765 подтверждают формирование октамеров, наиболее вероятной представляется форма частицы в виде правильного эллипсоида с полостью в центре.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект РНФ 14-24-00166).

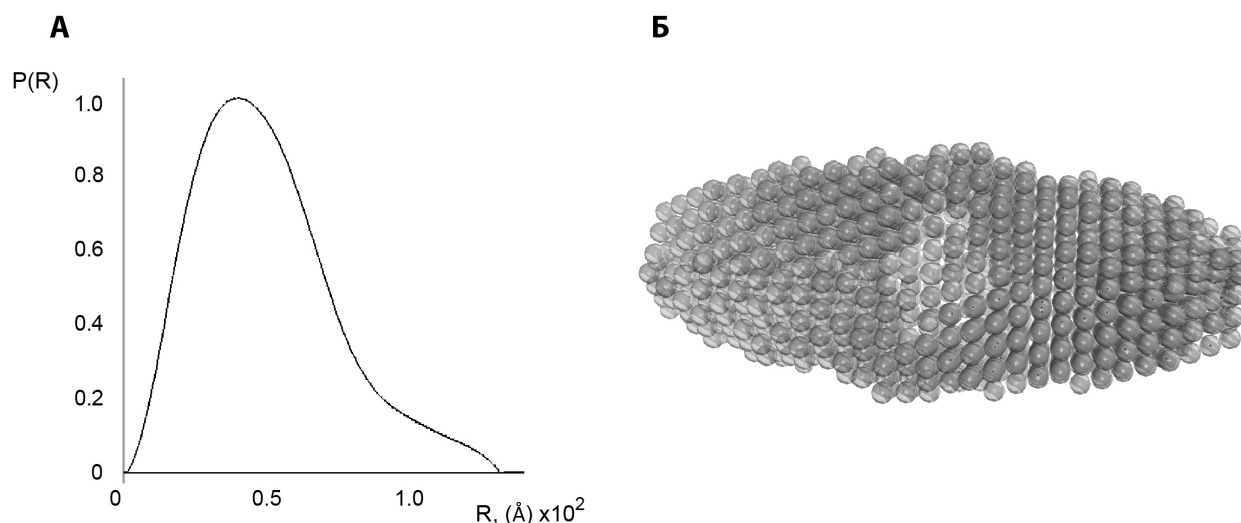


Рисунок 1. Исследование структуры ВТВ-домена белка CG6765 в растворе. А) График функции парных расстояний, Б) Одна из наиболее вероятных *ab initio* моделей низкого разрешения ВТВ-домена белка CG6765

Список литературы / References:

1. Stogios P.J., Downs G.S., Jauhal J.J., Nandra S.K., Prive G.G. Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome Biol.*, 2005, vol. 6, no. 10, p. R82, epub.
2. Bonchuk A., Denisov S., Georgiev P., Maksimenko O. Drosophila BTB/POZ domains of "ttk group" can form multimers and selectively interact with each other. *J Mol Biol.*, 2011, vol. 412, pp. 423-436.
3. Ahmad K.F., Engel C.K., Prive G.G. Crystal structure of the BTB domain from PLZF. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, vol. 95, pp. 12123-12128.
4. Ahmad K.F., Melnick A., Lax S., Bouchard D., Liu J., [et al.] Mechanism of SMRT corepressor recruitment by the BCL6 BTB domain. *Mol Cell*, 2003, vol. 12, pp. 1551-1564.
5. Stead M.A., Trinh C.H., Garnett J.A., Carr S.B., Baron A.J., [et al.] A beta-sheet interaction interface directs the tetramerisation of the Miz-1 POZ domain. *J Mol Biol.*, 2007, vol. 373, pp. 820-826.
6. Zollman S., Godt D., Prive G.G., Couderc J.L., Laski F.A. The BTB domain, found primarily in zinc finger proteins, defines an evolutionarily conserved family that includes several developmentally regulated genes in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, vol. 91, pp. 10717-10721.

**STUDIES OF OCTAMERIC TRAMTRACK GROUP BTB-DOMAINS USING
SMALL-ANGLE X-RAY SCATTERING (SAXS)****Bonchuk A.N.¹, Boyko K.M.^{2,3}, Kachalova G.S.², Georgiev P.G.¹, Maksimenko O.G.¹**¹Institute of gene biology RASVavilova str., 34/5, Moscow, 119334, Russia; e-mail: errinaceus@rambler.ru²Research Center of Biotechnology RAS

Leninsky prospekt, 33, Moscow, 119071, Russia

³National Research Center "Kurchatov Institute"

Academic Kurchatov square, 1, Moscow, 123098, Russia

Abstract. Drosophila genome contains near 30 transcription factors containing BTB-domains able to form octamers (TTK group). Spatial structure of two domains of this group – CG6765 and CG32121 was studied using small-angle X-ray scattering (SAXS). SAXS data confirm that these domains are able to form octamers and provide insight into the structure of such octamers.

Key words: multimerization, small-angle X-ray scattering, chromatin.