

СТРУКТУРА И МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА TTP49

© А. С. Афанасьева,^{1,2,*} А. П. Якимов,^{1,2} М. Ю. Григорьев,³ М. Г. Петухов^{1,2}

¹Институт нанобиотехнологий С.-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, 195251,

²Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова

НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, 188300, и

³UMR 5099; CNRS; LBME; F-31000 Тулуза, Франция;

* электронный адрес: arina.afan@gmail.com

В настоящей работе представлен обзор имеющихся данных о структуре и свойствах белков семейства TTP49, являющихся центральным элементом нескольких клеточных комплексов человека: INO80, SWR1, p400 и TTP60, играющих ключевую роль в процессинге ДНК. Белки этого семейства (TTP49a и TTP49b) высококонсервативны и принимают участие во множестве важных клеточных функций различных организмов. Например, эти белки играют ключевую роль в канцерогенезе, а селективные ингибиторы их АТФазной активности являются перспективными лекарственными средствами в борьбе с несколькими видами рака, например гепатокарциномой (Rousseau et al., 2007). Поэтому исследования свойств и молекулярных механизмов действия этих белков имеют как фундаментальное, так и практическое значение и позволяют прояснить механизмы развития заболеваний, связанных с нарушением функционирования белков TTP49.

Ключевые слова: TTP49, Pontin/Reptin, Rvb1, Rvb2, AAA+ АТФаза, геликаза, INO80, SWR1, TTP60.

Принятые сокращения: АЦ — активный центр, МД — молекулярная динамика, SnoRNP — small nucleolar ribonucleoprotein.

Белки семейства TTP49 имеют две гомологичные формы — TTP49a и TTP49b, принадлежащие к суперсемейству AAA+ АТФаз (АТФазы, участвующие в различных клеточных процессах) (Neuwald et al., 1999), и экспрессируются во всех эукариотических клетках (Baueg et al., 1998). Ферменты этого класса АТФаз часто являются шаперонами и протеазами или участвуют в процессинге нуклеиновых кислот. Кроме того, белки класса AAA+ склонны к формированию гексамерных кольцевых структур и содержат консервативные структурные мотивы, необходимые для связывания и гидролиза АТФ, такие как мотивы Уолкер А (GXXXXGKT) и Уолкер Б (DEXH/H) (Walker et al., 1982), а также так называемые аргининовые пальцы — сенсорные остатки, участвующие в конформационных перестройках в активном центре белка при связывании АТФ. Все белки семейства AAA+ используют энергию гидролиза АТФ для совершения механической работы, для белков TTP49a и TTP49b также показано, что подавление гидролиза АТФ приводит к нарушению биологических функций, связанных с этими белками (Wood et al., 2000; Feng et al., 2003; Jonsson et al., 2004).

Белки TTP49a и TTP49b человека содержат 456 и 463 аминокислотных остатка соответственно, в клетке локализованы преимущественно в ядре, однако также обнаружены в цитозоле (Holzmann et al., 1998; Salzer et al., 1999; Lim et al., 2000; Kim et al., 2006). Белки TTP49a и TTP49b

обладают высокой степенью гомологии первичной структуры (степень идентичности по последовательности ~43 %, степень сходства ~65 %). Поскольку эти белки характеризуются множеством функций, изначально они идентифицированы независимо несколькими группами исследователей с помощью совершенно различных экспериментальных подходов и в литературе используют несколько их названий (см. таблицу).

По первичной структуре белки TTP49a и TTP49b обладают высокой степенью гомологии с бактериальной ДНК-зависимой АТФазой и транслоказой RuvB (идентичность ~30 %) (Putnam et al., 2001; Yamada et al., 2001). RuvB является моторным белком, участвующим в направленной миграции структуры Холлидея в присутствии RuvA и RuvC в процессе гомологичной рекомбинации и рекомбинационной репарации поврежденной ДНК (Tsaneva et al., 1993). При этом известно, что гены *ruvA*, *ruvB* и *ruvC* бактерий необходимы для нормального уровня их резистентности к действию ультрафиолетового или ионизирующего облучения (Muzard et al., 1999). RuvB в клетке выполняет ДНК- и РНК-геликазную функции, используя энергию гидролиза АТФ для раскручивания энергетически стабильной формы двойной спирали ДНК и РНК и перемещения вдоль спирали (рис. 1). Поскольку механизм функционирования белков TTP49 в клетке остается неизвестным, на основании высокого уровня гомо-

Различные названия TBP49a и TBP49b

Другое название TBP49a	Другое название TBP49b	Пояснение
		TBP-interacting protein (Kanemaki et al., 1999)
TBP49	IP48	ТАТА-связывающий белок (TBP-interacting protein) (Makino et al., 1998; Wood et al., 2000)
Pontin52	Reptin52	Pontin52 — 52-kDa белок, вызывающий одновременно β -катенин и TBP, мостиковый («pons» — мост, лат.). Reptin52 — репрессия Pontin52 (repressing Pontin52) (Bauer et al., 1998, 2000)
TAP54 α	TAP54 β	Белок, связывающийся с TBP60 (TBP60-associated protein) (Ikura et al., 2000)
ТИН1	ТИН2	Гомолог (TBP49a/b homolog) (Lim et al., 2000)
ECP54	ECP51	Белок цитозоля эритроцитов (erythrocyte cytosolic protein) (Salzer et al., 1999)
NMP238	---	Белок ядерного матрикса (nuclear matrix protein) (Holzmann et al., 1998)
Rvb1(RuvBL1)	Rvb2(RuvBL2)	Гомолог RuvB (RuvB-like) (Jynsson et al., 2001)
p50	p47	Белок (protein) (Gohshi et al., 1999)

логичности с RuvB сделано предположение о том, что TBP49a и TBP49b могут также выступать в качестве моторных белков в процессе ДНК-транслокации (Kanemaki et al., 1997; Gohshi et al., 1999; Makino et al., 1999). Однако данные о ДНК-геликазной активности TBP49a (Makino et al., 1999) и TBP49b (Kanemaki et al., 1999) не удалось воспроизвести в экспериментах с очищенными белками TBP49 дикого типа (Qiu et al., 1998; Ikura et al., 2000); таким образом, на данный момент вопрос о наличии геликазной активности белков TBP49a и TBP49b по-прежнему остается открытым.

Участие TBP49a и TBP49b в ремоделировании хроматина

Обнаружено, что белки TBP49a и TBP49b в составе нескольких белковых комплексов принимают участие в процессе ремоделирования хроматина. Структура хроматина является основным определяющим фактором в транскрипции и в других ДНК-зависимых процессах в клетках эукариот. Этот фактор регулирует доступ белков к ДНК. В ядре эукариот ДНК свернута вокруг октамера из четырех ядер гистонов примерно на два спиральных

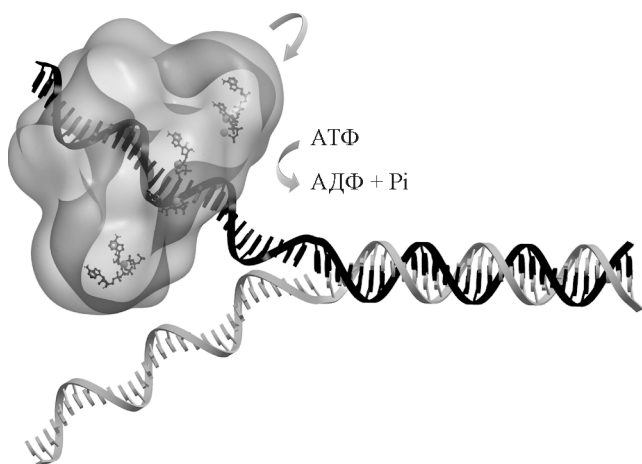


Рис. 1. Механизм геликазной активности.

Гексамерная форма геликазы в комплексе с АТФ, энергия гидролиза АТФ используется для раскручивания двухцепочечной ДНК и перемещения вдоль одной из цепей ДНК.

оборота, формируя, таким образом, нуклеосому. Нуклеосомы в свою очередь плотно укладываются, формируя структуры более высокого порядка и образуя хроматин (рис. 2). Упаковка генов в хроматин подавляет базальную транскрипцию, и требуется несколько многокомпонентных комплексов для регуляции генной экспрессии путем изменения топологии нуклеосом. Определены два пути изменения хроматина, которые регулируют его структуру и имеют существенное значение для процессинга ДНК в клетке (рис. 2).

Белки TBP49a и TBP49b найдены в составе группы хроматинремоделирующих комплексов 1-го типа, расщепляющих АТФ. В частности, они присутствуют в двух похожих комплексах, содержащих p400. Белковый комплекс p400 в клетках животных играет важную роль, например выступает в роли мишени для связывания белка E1A (онкогенный аденовирусный белок, вызывающий различные аномальные биологические эффекты в клетке) и влияет, таким образом, на его активность, а также принимает участие в апоптозе (Fuchs et al., 2001; Samuelson et al., 2005) и репарации ДНК (Kusch et al., 2004) и проявляет АТФазную и геликазную активность. Показано, что эти функции, по крайней мере частично, осуществляются белками TBP49a/b в составе комплекса (Fuchs et al., 2001). Другой p400-содержащий комплекс TBP60 содержит гистон-ацетилтрансферазу Tbp60 (НАТ), откуда и получил свое название. Он выполняет ряд функций в различных клеточных процессах, включая активацию транскрипции, репарацию разрывов двухнитевой ДНК и апоптоз (Ikura et al., 2000). TBP49a и TBP49b также являются компонентами комплекса SWR1 в дрожжах и соответствующего комплекса в клетках человека SRCAP (Jin et al., 2005b), функция которого заключается в ремоделировании хроматина АТФ-зависимым образом, путем замещения димеров гистонов H2A-H2B в нуклеосомах димерами, содержащими H2A.Z-вариант гистона (Mizuguchi et al., 2004; Jin et al., 2005a). TBP49a и TBP49b также обнаружены в составе комплекса INO80, который есть в клетках дрожжей и высших эукариот. Этот комплекс инициирует перемещение нуклеосом вдоль ДНК АТФ-зависимым образом и участвует в репарации двухнитевых разрывов ДНК и в регуляции транскрипции (Shen et al., 2000; Jynsson et al., 2001; Jonsson et al., 2004; Jin et al., 2005b). Показано, что белки TBP49 АТФ-зависимым образом участвуют в сборке и функционировании хроматинремоделирующего комплекса INO80 (Jonsson et al., 2004). TBP49a/b в комплексе

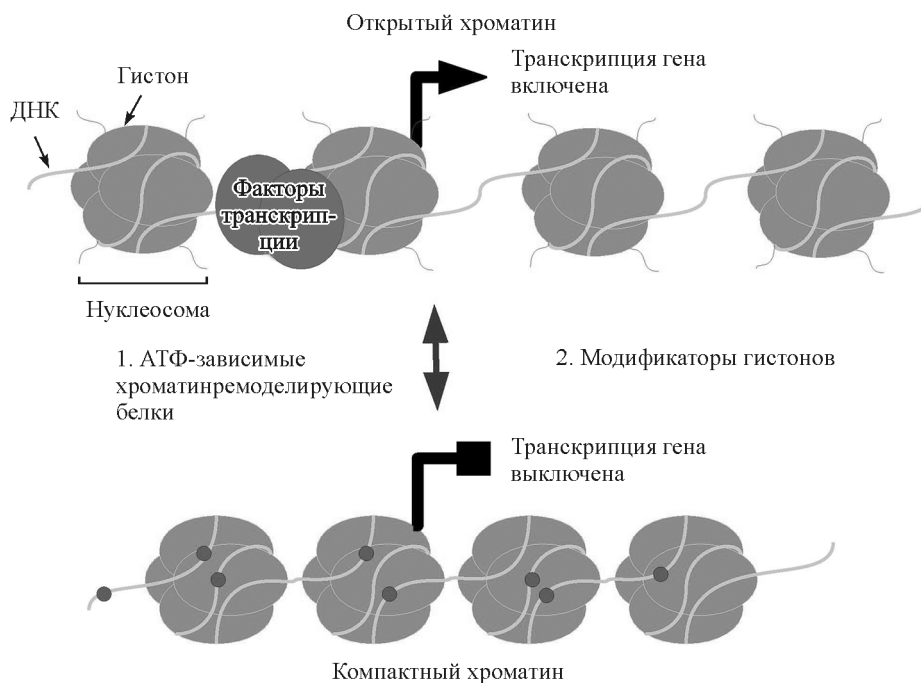


Рис. 2. Регуляция структуры хроматина. Упаковка генов в хроматин подавляет базальную транскрипцию.

Два типа хроматинредеформирующих комплексов регулируют структуру хроматина: 1 — АТФ-зависимые комплексы используют энергию гидролиза АТФ для изменения организации нуклеосом и обеспечивают доступ к ДНК; 2 — модификаторы гистонов добавляют/удаляют ковалентные модификации для изменения компактного состояния хроматина либо собирают гистонсвязывающие белки.

с АТФ находится в правильной конформации для связывания с комплексом INO80 и инициации процесса поиска актино-подобных субъединиц Aрг5, необходимых для сборки полнофункционального хроматинредеформирующего комплекса.

Таким образом, белки TIP49a и TIP49b входят в состав ряда макромолекулярных комплексов, таких как TIP60, SWR1, INO80 и др., участвующих в ремоделировании хроматина, при этом функция гидролиза АТФ в белках TIP49a и TIP49b необходима для функционирования этих комплексов.

Участие TIP49a и TIP49b в транскрипции

TIP49a и TIP49b участвуют в регуляции транскрипции не только в ассоциации с хроматинредеформирующими комплексами, но также посредством взаимодействия с различными факторами транскрипции и холоферментным комплексом РНК-полимеразы II. Впервые TIP49a и TIP49b были обнаружены благодаря взаимодействию с ТАТА-связывающим белком (Капетакис et al., 1997, 1999) и большим холоферментным комплексом РНК-полимеразы II (Qiu et al., 1998), который содержит более 50 компонентов и отвечает за транскрипцию кодирующих белки генов. Позже белки TIP49 были идентифицированы благодаря их взаимодействию с белком β-катенином, ассоциированным с транскрипцией (Bauer et al., 1998, 2000), и с транскрипционными факторами с-Мус (Wood et al., 2000), E2F1 (только TIP49a; Dugan et al., 2002) и ATF2 (только RuvBL2; Cho et al., 2001). С тех пор для гомологов TIP49 у млекопитающих определены по крайней мере два онкогенных пути: первый связан с с-Мус, второй — с β-катенином. Среди транскрипционных факторов с онко-

генным потенциалом с-Мус является одной из наиболее популярных мишеней для мутаций в противораковых исследованиях (Cole, 1986). N-концевой фрагмент с-Мус содержит два высококонсервативных участка — Мус гомологичный бокс I (MbI) и II (MbII). MbII-домен необходим практически для всех видов биологической активности с-Мус, включая онкогенную трансформацию, апоптоз и способность блокировать дифференциацию и стимулировать клеточную пролиферацию (Stone et al., 1987; Penn et al., 1990; Evan et al., 1992; Li et al., 1994). Показано, что этот участок связывает TIP49a и TIP49b (Wood et al., 2000). Мус-связывающий мотив в белках TIP49a и TIP49b включает в себя участок 136—187 (Wood et al., 2000). Миссенс-мутация в АТФазном структурном мотиве TIP49a приводит к доминантному ингибированию онкогенной активности с-Мус, но не нарушает нормального роста клеток, что указывает на необходимость функционирования TIP49a в процессе онкогенной трансформации с-Мус (Wood et al., 2000; Dugan et al., 2002). TIP49a также идентифицировали в качестве ключевого модулятора апоптотической активности как для с-Мус, так и для E2F1. Несмотря на то что для TIP49b не обнаружено никакой функциональной роли в этих системах (с-Мус и E2F1), предполагается, что N-концевой участок с-Мус предназначен для связывания как TIP49a, так и TIP49b для осуществления контроля транскрипции генов-мишеней, участвующих в клеточной трансформации.

Из этих данных можно сделать вывод о том, что белки TIP49a и TIP49b играют важную роль в процессах регуляции транскрипции в результате взаимодействия с различными транскрипционными факторами, такими как с-Мус, E2F1, холоферментный комплекс РНК-полимеразы II, при этом для TIP49a показано, что его функциональность необходима для функционирования комплексов с-Мус и E2F1.

Участие TIP49a и TIP49b в сборке snoRNP и митозе

SnoRNP (small nucleolar ribonucleoprotein) — комплексы, состоящие из небольших фрагментов ядерной РНК (snoRNA) и ассоциированных с ними белков. Функции snoRNP заключаются в модификации и процессинге пре-рибосомной РНК (Filipowicz, Pogacic, 2002). Имеются данные о том, что TIP49a и TIP49b участвуют в сборке snoRNP и последующем созревании snoRNP в нуклеоплазме (King et al., 2001; Watkins et al., 2004). При этом показано, что TIP49b связывается исключительно с прекурсорным комплексом snoRNP (Watkins et al., 2004), в то время как TIP49a связывается со snoRNP на стадии созревания. Взаимодействие с TIP49b представляет собой промежуточные ассоциации на ранних стадиях биогенеза, связывая синтез snoРНК со сборкой и локализацией snoRNP. Возможно, TIP49a выступает в качестве ремоделирующего фактора, приводящего к структурным изменениям в ходе финальной стадии созревания snoRNP в нуклеоплазме. Однако TIP49a не связывается со зрелой формой комплекса в ядре. Эти данные позволяют предположить, что TIP49a и TIP49b могут напрямую взаимодействовать с РНК, что, однако, требует дополнительной экспериментальной проверки.

Число предполагаемых функций TIP49a и TIP49b дополнительно возросло благодаря наблюдаемой ассоциации этих белков с центросомами и элементами митотического аппарата в ходе митоза (Gartner et al., 2003; Sigala et al., 2005). Для TIP49a показано, что эти ассоциации происходят за счет взаимодействия с тубулином (Gartner et al., 2003). Характерно различие локализации TIP49a и TIP49b в клетке на этапах телофазы и цитокинеза (Sigala et al., 2005). На основании этих данных предполагают, что TIP49a и TIP49b могут иметь различающиеся функции в процессе митоза, которые отличаются от их функций в транскрипции и ремоделировании хроматина. Вместе и по отдельности белки TIP49a и TIP49b участвуют во

многих жизненно важных клеточных процессах, однако механизм их функционирования до сих пор неясен.

Структурные особенности белков TIP49

Белки AAA+ содержат консервативные домены, способные к связыванию и гидролизу АТФ в олигомерном состоянии от димеров до додекамеров (Ikura et al., 2000). Связывание и гидролиз АТФ вызывают конформационные изменения, необходимые для транслокации или реконфигурации субстратов. TIP49a и TIP49b формируют таксономическую группу, отличающуюся от других членов семейства белков AAA+, и это позволяет предполагать, что данные белки обладают какими-то уникальными свойствами (Ammelburg et al., 2006).

Неполную пространственную структуру олигомерного комплекса белка TIP49a определили методами рентгеноструктурного анализа (Matias et al., 2006). Анализ кристаллической структуры мономера белка человека TIP49a показал, что свернутый белок имеет три структурных домена — D1, D2 и D3 (рис. 3). Структура содержит типичный AAA+-модуль, который образован структурными участками доменов D1 и D3. При этом домен D1 содержит Р-петлю и центр связывания АТФ и состоит из типичного пятичленного β-листа, расположенного между α-спиралями. Конформация домена D3 также подобна многим другим белкам группы AAA+ и состоит из связки α-спиралей. В этой кристаллической структуре белок TIP49 находится в комплексе с АДФ, что позволяет прояснить механизмы связывания и гидролиза АТФ этими белками. Недавно получены сходные неполные кристаллические структуры гексамерного кольцевого комплекса белков TIP49b, а также смешанного комплекса белков TIP49a/TIP49b с удаленным доменом D2 (Gribun et al., 2008; Petukhov et al., 2012). В работе Петухова с соавторами (Petukhov et al., 2012) проводили моделирование гексамерных комплексов TIP49a, TIP49b, а также TIP49a/b

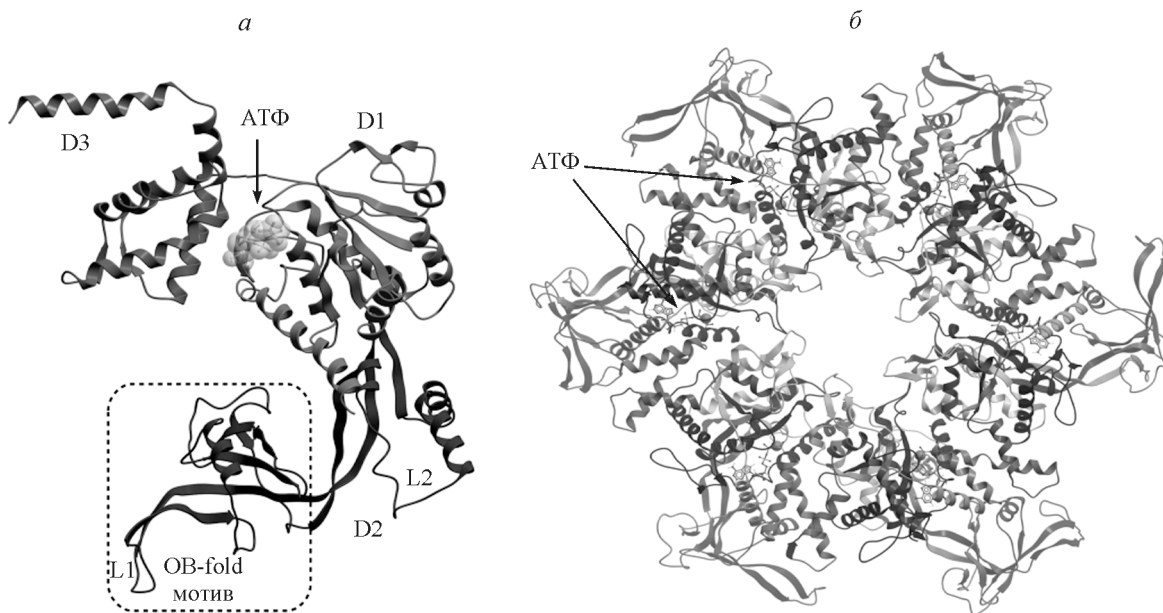


Рис. 3. Структура белка TIP49 в мономерной форме с обозначением основных структурных доменов и АТФазного центра (а) и в гексамерной форме (вид сверху на гексамерное кольцо) (б).

Пунктирной рамкой выделен OB-fold — структурный мотив, предназначенный для связывания олигонуклеотидов.

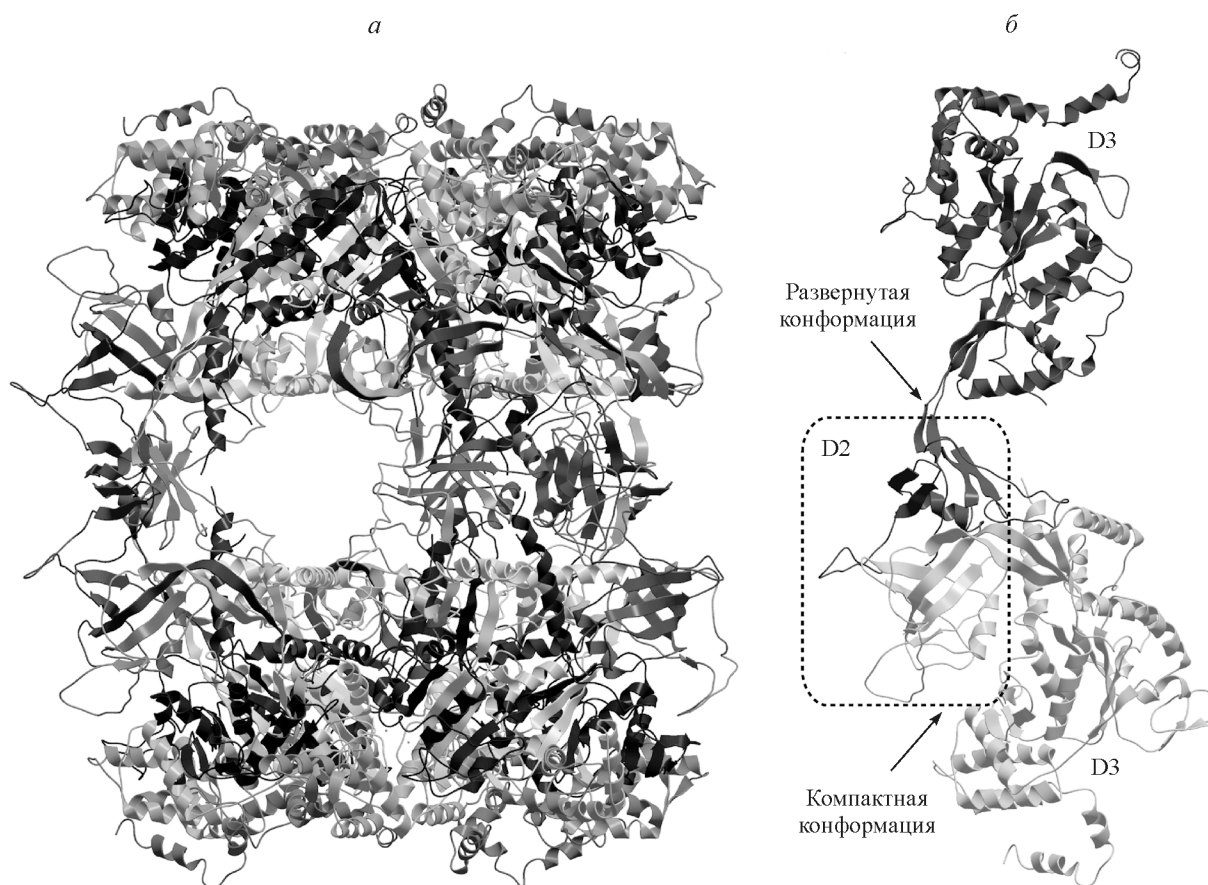


Рис. 4. Структура смешанного додекамера TIP49a/b (вид сбоку, PDB код: 4WVY) (а) и взаимодействие субъединиц, расположенных друг напротив друга в разных гексамерах (б).

Показаны компактная и развернутая конформации D2 доменов, формирующих интерфейс взаимодействия гексамеров в додекамерном комплексе (выделен пунктирной рамкой).

периодическом водном боксе. На основании анализа методом молекулярной динамики (МД) продемонстрирована высокая подвижность структурного домена D2, содержащего мотив OB-fold (структурный мотив, предназначенный для связывания олигонуклеотидов), который может принимать свернутые и развернутые конформации в зависимости от состава и последовательности белков TIP49a и TIP49b. Эти данные согласуются с полученными конформациями D2-доменов в структуре додекамерного комплекса смешанного TIP49a/b, опубликованного в работе Лакоmek и соавторов (Lakomek et al., 2015).

Белки TIP49 склонны к формированию гексамерных комплексов, как уже сообщалось ранее. Гексамер TIP49 представляет собой кольцо с диаметром центрального канала около 24 Е. В нашей работе методами молекулярного докинга и МД продемонстрировано, что размер центрального канала позволяет осуществлять связывание двухнитевой ДНК в классической В-форме (диаметр 20.3 Е). Полученную модель комплекса hsTIP49 с фрагментом днДНК в центральном канале исследовали методом МД. Показано, что данный комплекс достаточно стабилен на протяжении всей траектории МД (50 нс), при этом молекула ДНК претерпевает значительные структурные изменения в процессе МД, вызванные взаимодействием с боковыми остатками белковых петель, торчащих внутрь центрального канала и обогащенных положительно заряженными остатками аргинина и лизина. Также показано влияние присутствия АТФ в связанном

состоянии в активном центре белка на конечную структуру молекулы ДНК. Спираль днДНК в значительной степени разворачивается внутри центрального канала гексамерного комплекса TIP49, при этом в присутствии АТФ в комплексе наблюдается разрыв части комплементарных связей между парами оснований ДНК, чего не наблюдается при моделировании МД комплекса без АТФ (Afanasyeva et al., 2016).

АТФазная активность — одно из ключевых свойств белков семейства TIP49. Однако, несмотря на присутствие всех важных структурных мотивов, которые характеризуют «классический» член суперсемейства АТФаз AAA+, скорость гидролиза АТФ в белках TIP49 необычно мала (Papin et al., 2010; Afanasyeva et al., 2014). Механизм гидролиза АТФ в этих белках предполагает протекание нуклеофильной атаки активированных молекул воды на γ -фосфат АТФ и образование пятикоординированного переходного состояния (Afanasyeva et al., 2014). Отрицательный заряд, накапливающийся вблизи γ -фосфата, компенсируется зарядом иона Mg^{2+} и зарядами доноров водородных связей из окружающих аминокислотных остатков боковых цепей активного центра (АЦ) белка. Поэтому АЦ этих АТФаз включают в себя аминокислотные остатки, способные к нуклеофильной активации воды, электрофильные группы для стабилизации отрицательно заряженного переходного состояния, а также группы, осуществляющие координацию иона Mg^{2+} , который является необходимым кофактором. АЦ этих АТФаз,

как правило, содержат один или несколько «сенсоров», которые могут участвовать в связывании АТФ, однако основная их функция заключается в получении информации о наличии или отсутствии γ -фосфата и в передаче сигнала к удаленным АЦ белка путем ряда конформационных перестроек.

АТФ-связывающий карман белка находится в интерфейсе субъединиц в гексамерном комплексе и является композитным, т. е. включает в себя структурные элементы из двух соседних субъединиц. Моделирование МД гексамерного комплекса TIP49 в водном окружении показало, что структурные элементы соседнего протомера в составе активного сайта белка в гексамерном комплексе могут играть роль акцепторов протона молекулы воды, атакующей АТФ, при протекании гидролиза АТФ по ассоциативному механизму. Предложенные точечные мутации аминокислот в АЦ, принимающих участие в этом процессе, подтвердили этот факт, а также и сам механизм гидролиза АТФ в белках TIP49 (Афанасьева et al., 2014).

Недавно две независимые группы кристаллографов опубликовали полные кристаллические структуры додекамерных комплексов TIP49a/b *Chaetomium thermophilum* (рис. 4, а) (Lakomek et al., 2015; Silva-Martin et al., 2016).

В додекамерном комплексе TIP49a и TIP49b образуют два гексамерных кольца из чередующихся протомеров TIP49a и TIP49b, формируя стабильный интерфейс взаимодействия между ними. Этот интерфейс формируется главным образом за счет взаимодействия ДII-доменов, содержащих OB-fold из субъединиц, расположенных друг напротив друга в соседних гексамерах, при этом ДII-домены занимают разное положение относительно АТФазного домена белка. В TIP49a ДII-домен занимает развернутую конформацию, в то время как в протомерах TIP49b ДII-домен поворачивается наружу, формируя водородные связи с АТФазным доменом.

Предполагается, что структурная пластичность комплекса TIP49a/b может быть связана с различными видами его функциональной активности. АТФазная активность повышается в додекамерных комплексах TIP49a/b (Niewiarowski et al., 2010), в то время как геликазная активность, судя по всему, увеличивается при удалении ДII-доменов (Gorynia et al., 2011). Кроме того, связывание с нуклеосомами показано для гомогексамерных комплексов TIP49a и TIP49b (Queval et al., 2014), а также для додекамеров TIP49a/b в составе комплекса INO80, но не для изолированных додекамеров TIP49a/b (Tosi et al., 2013).

Таким образом, белки семейства TIP49 склонны к образованию гетерокомплексов (TIP49a/b), в которых они действуют совместно, участвуя в различных клеточных процессах, однако известно, что они также могут функционировать независимо друг от друга. TIP49a и TIP49b найдены в составе группы хроматинремоделирующих комплексов, расщепляющих АТФ, таких как p400, TIP60, INO80 и др. Кроме того, белки семейства TIP49 участвуют в регуляции транскрипции не только путем ассоциации с хроматинремоделирующими комплексами, но также посредством взаимодействия с различными факторами транскрипции и холоферментным комплексом РНК-полимеразы II. Есть данные о том, что TIP49a и TIP49b участвуют в сборке spoRNP и ее последующем созревании в нуклеоплазме. Наряду с этим они принимают участие в митозе, при этом, вероятнее всего, TIP49a и TIP49b имеют различающиеся индивидуальные функции в процессе митоза, отличные от их роли в транскрипции и ремоделировании хроматина.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-34-00023).

Список литературы

- Afanasyeva A., Hirtreiter A., Schreiber A., Grohmann D., Pobeagalov G., McKay A. R., Tsaneva I., Petukhov M., Kas E., Grigoriev M., Werner F. 2014. Lytic water dynamics reveal evolutionarily conserved mechanisms of ATP hydrolysis by TIP49 AAA+ ATPases. *Structure*. 22 : 549—559.
- Afanasyeva A. S., Yakimov A. P., Grigoriev M. Y., Petukhov M. G. 2016. Dynamics and mechanisms of interactions between ring-shaped heterohexameric TIP49a/b protein complexes and double-stranded DNA. *Cell Tissue Biol*. 10 (1) : 47—54.
- Ammelburg M., Frickey T., Lupas A. N. 2006. Classification of AAA+ proteins. *J. Struct. Biol*. 156 : 2—11.
- Bauer A., Chauvet S., Huber O., Usseglio F., Rothbacher U., Aragnol D., Kemler R., Pradel J. 2000. Pontin52 and Reptin52 function as antagonistic regulators of β -catenin signalling activity. *EMBO J*. 19 : 6121—6130.
- Bauer A., Huber O., Kemler R. 1998. Pontin52, an interaction partner of beta-catenin, binds to the TATA box binding protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 95 : 14 787—14 792.
- Cho S. G., Bhoumik A., Broday L., Ivanov V., Rosenstein B., Ronai Z. 2001. TIP49b, a regulator of activating transcription factor 2 response to stress and DNA damage. *Mol. Cell. Biol*. 21 : 8398—8413.
- Cole M. D. 1986. The *myc* oncogene: its role in transformation and differentiation. *Ann. Rev. Genet*. 20 : 361—384.
- Dugan K. A., Wood M. A., Cole M. D. 2002. TIP49, but not TRRAP, modulates c-Myc and E2F1 dependent apoptosis. *Oncogene*. 21 : 5835—5843.
- Evan G. I., Wyllie A. H., Gilbert C. S., Littlewood T. D., Land H., Brooks M., Waters C. M., Penn L. Z., Hancock D. C. 1992. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-Myc protein. *Cell*. 69 : 119—128.
- Feng Y., Lee N., Fearon E. R. 2003. TIP49 regulates beta-catenin-mediated neoplastic transformation and T-cell factor target gene induction via effects on chromatin remodeling. *Cancer Res*. 63 : 8726—8734.
- Filipowicz W., Pogacic V. 2002. Biogenesis of small nucleolar ribonucleoproteins. *Curr. Opin. Cell Biol*. 14 : 319—327.
- Fuchs M., Gerber J., Drapkin R., Sif S., Ikura T., Ogrzyzko V., Lane W. S., Nakatani Y., Livingston D. M. 2001. The p400 complex is an essential E1A transformation target. *Cell*. 106 : 297—307.
- Gartner W., Rossbacher J., Zierhut B., Daneva T., Base W., Weissel M., Waldhauser W., Pasternack M. S., Wagner L. 2003. The ATP-dependent helicase RUVBL1/TIP49a associates with tubulin during mitosis. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 56 : 79—93.
- Gohshi T., Shimada M., Kawahire S., Imai N., Ichimura T., Omata S., Horigome T. 1999. Molecular cloning of mouse p47, a second group mammalian RuvB DNA helicase-like protein: homology with those from human and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem*. 125 : 939—946.
- Gorynia S., Bandejas T. M., Pinho F. G., McVey C. E., Vornrhein C., Round A., Svergun D. I., Donner P., Matias P. M., Carondo M. A. 2011. Structural and functional insights into a dodecameric molecular machine — the RuvBL1/RuvBL2 complex. *J. Struct. Biol*. 176 : 279—291.
- Gribun A., Cheung K. L., Huen J., Ortega J., Houry W. A. 2008. Yeast Rvb1 and Rvb2 are ATP-dependent DNA helicases that form a heterohexameric complex. *J. Mol. Biol*. 376 : 1320—1333.
- Holzmann K., Gerner C., Korosec T., Poltl A., Grimm R., Sauerermann G. 1998. Identification and characterization of the ubiquitously occurring nuclear matrix protein NMP 238. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 252 : 39—45.
- Ikura T., Ogrzyzko V. V., Grigoriev M., Groisman R., Wang J., Horikoshi M., Scully R., Qin J., Nakatani Y. 2000. Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell*. 102 : 463—473.

- Jin J., Cai Y., Li B., Conaway R. C., Workman J. L., Conaway J. W., Kusch T. 2005a. In and out: histone variant exchange in chromatin. *Trends Biochem. Sci.* 30 : 680—687.
- Jin J., Cai Y., Yao T., Gottschalk A. J., Florens L., Swanson S. K., Gutierrez J. L., Coleman M. K., Workman J. L., Mushegian A., Washburn M. P., Conaway R. C., Conaway J. W. 2005b. A mammalian chromatin remodeling complex with similarities to the yeast INO80 complex. *J. Biol. Chem.* 280 : 41 207—41 212.
- Jynsson Z. O., Dhar S. K., Narlikar G. J., Auty R., Wagle N., Pellman D., Pratt R. E., Kingston R., Dutta A. 2001. Rvb1p and Rvb2p are essential components of a chromatin remodeling complex that regulates transcription of over 5 % of yeast genes. *J. Biol. Chem.* 276 : 16 279—16 288.
- Jonsson Z. O., Jha S., Wohlschlegel J. A., Dutta A. 2004. Rvb1p/Rvb2p recruit Arp5p and assemble a functional Ino80 chromatin remodeling complex. *Mol. Cell.* 16 : 465—477.
- Kanemaki M., Kurokawa Y., Matsu-ura T., Makino Y., Masani A., Okazaki K.-I., Morishita T., Tamura T.-A. 1999. TIP49b, a new RuvB-like DNA helicase, is included in a complex together with another RuvB-like DNA helicase, TIP49a. *J. Biol. Chem.* 274 : 22 437—22 444.
- Kanemaki M., Makino Y., Yoshida T., Kishimoto T., Koga A., Yamamoto K., Yamamoto M., Moncollin V., Egly J.-M., Muramatsu M. 1997. Molecular cloning of a rat 49-kDa TBP-interacting protein (TIP49) that is highly homologous to the bacterial RuvB. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235 : 64—68.
- Kim J. H., Choi H. J., Kim B., Kim M. H., Lee J. M., Kim I. S., Lee M. H., Choi S. J., Kim K. I., Kim S. I., Chung C. H., Baek S. H. 2006. Roles of sumoylation of a reptin chromatin-remodelling complex in cancer metastasis. *Nat. Cell Biol.* 8 : 631—639.
- King T. H., Decatur W. A., Bertrand E., Maxwell E. S., Fournier M. J. 2001. A well-connected and conserved nucleoplasmic helicase is required for production of box C/D and H/ACA snoRNAs and localization of snoRNP proteins. *Mol. Cell. Biol.* 21 : 7731—7746.
- Kusch T., Florens L., Mac Donald W. H., Swanson S. K., Gasser R. L., Yates J. R., Abmayr S. M., Washburn M. P., Workman J. L. 2004. Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions. *Science.* 306 : 2084—2087.
- Lakomek K., Stoehr G., Tosi A., Schmailzl M., Hopfner K. P. 2015. Structural basis for dodecameric assembly states and conformational plasticity of the full-length AAA+ ATPases Rvb1 / Rvb2. *Structure.* 23 : 483—495.
- Li L. H., Nerlov C., Prendergast G., Mac Gregor D., Ziff E. B. 1994. c-Myc represses transcription *in vivo* by a novel mechanism dependent on the initiator element and Myc box II. *EMBO J.* 13 : 4070—4079.
- Lim C. R., Kimata Y., Ohdate H., Kokubo T., Kikuchi N., Horigome T., Kohno K. 2000. The *Saccharomyces cerevisiae* RuvB-like protein, Tih2p, is required for cell cycle progression and RNA polymerase II-directed transcription. *J. Biol. Chem.* 275 : 22 409—22 417.
- Makino Y., Kanemaki M., Kurokawa Y., Koji T., Tamura T.-A. 1999. A rat RuvB-like protein, TIP49a, is a germ cell-enriched novel DNA helicase. *J. Biol. Chem.* 274 : 15 329—15 335.
- Makino Y., Mimori T., Koike C., Kanemaki M., Kurokawa Y., Inoue S., Kishimoto T., Tamura T.-A. 1998. TIP49, homologous to the bacterial DNA helicase RuvB, acts as an autoantigen in human. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245 : 819—823.
- Matias P. M., Gorynia S., Donner P., Carrondo M. A. 2006. Crystal structure of the human AAA+ protein RuvBL1. *J. Biol. Chem.* 281 : 38 918—38 929.
- Mizuguchi G., Shen X., Landry J., Wu W. H., Sen S., Wu C. 2004. ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science.* 303 : 343—348.
- Mizard C., George H., Davies A. A., van Gool A. J., Zerbib D., West S. C., Stasiak A. 1999. *Escherichia coli* RuvBL268S: a mutant RuvB protein that exhibits wild-type activities *in vitro* but confers a UV-sensitive *ruv* phenotype *in vivo*. *Nucl. Acids Res.* 27 : 1275—1282.
- Neuwald A. F., Aravind L., Spouge J. L., Koonin E. V. 1999. AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.* 9 : 27—43.
- Niewiarowski A., Bradley A. S., Gor J., McKay A. R., Perkins S. J., Tsaneva I. R. 2010. Oligomeric assembly and interactions within the human RuvB-like RuvBL1 and RuvBL2 complexes. *Biochem. J.* 429 : 113—125.
- Papin C., Humbert O., Kalashnikova A., Eckert K., Morera S., Kas E., Grigoriev M. 2010. 3'- to 5' DNA unwinding by TIP49b proteins. *FEBS J.* 277 : 2705—2714.
- Penn L. J., Brooks M. W., Laufer E. M., Land H. 1990. Negative autoregulation of *c-myc* transcription. *EMBO J.* 9 : 1113—1121.
- Petukhov M., Dagkessamanskaja A., Bommer M., Barrett T., Tsaneva I., Yakimov A., Queval R., Shvetsov A., Khodorkovskiy M., Kas E., Grigoriev M. 2012. Large-scale conformational flexibility determines the properties of AAA+ TIP49 ATPases. *Structure.* 20 : 1321—1331.
- Putnam C. D., Clancy S. B., Tsuruta H., Gonzalez S., Wetmur J. G., Tainer J. A. 2001. Structure and mechanism of the RuvB Holliday junction branch migration motor. *J. Mol. Biol.* 311 : 297—310.
- Qiu X. B., Lin Y. L., Thome K. C., Pian P., Schlegel B. P., Wermowicz S., Parvin J. D., Dutta A. 1998. An eukaryotic RuvB-like protein (RUVBL1) essential for growth. *J. Biol. Chem.* 273 : 27 786—27 793.
- Queval R., Papin C., Dalvai M., Bystricky K., Humbert O. 2014. Reptin and Pontin oligomerization and activity are modulated through histone H3 N-terminal tail interaction. *J. Biol. Chem.* 289 : 33 999—34 012.
- Rousseau B., Munard L., Haurie V., Taras D., Blanc J. F., Moreau Gaudry F., Metzler P., Hugues M., Boyault S., Lemiere S., Cannon X. 2007. Overexpression and role of the ATPase and putative DNA helicase RuvB-like 2 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 46 : 1108—1118.
- Salzer U., Kubicek M., Prohaska R. 1999. Isolation, molecular characterization, and tissue-specific expression of ECP-51 and ECP-54 (TIP49), two homologous, interacting erythroid cytosolic proteins. *Biochim. biophys. acta.* 1446 : 365—370.
- Samuelson A. V., Narita M., Chan H.-M., Jin J., de Stanchina E., McCurrach M. E., Narita M., Fuchs M., Livingston D. M., Lowe S. W. 2005. p400 is required for E1A to promote apoptosis. *J. Biol. Chem.* 280 : 21 915—21 923.
- Shen X. T., Mizuguchi G., Hamiche A., Wu C. 2000. A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature.* 406 : 541—544.
- Sigala B., Edwards M., Puri T., Tsaneva I. R. 2005. Relocalization of human chromatin remodeling cofactor TIP48 in mitosis. *Exp. Cell Res.* 310 : 357—369.
- Silva-Martin N., Dauden M. I., Glatt S., Hoffmann N. A., Kast-ritis P., Bork P., Beck M., Muller C. W. 2016. The combination of X-ray crystallography and cryo-electron microscopy provides insight into the overall architecture of the dodecameric Rvb1/Rvb2 complex. *PLoS ONE.* 11 : e0146457.
- Stone J., De Lange T., Ramsay G., Jakobovits E., Bishop J., Varmus H., Lee W. 1987. Definition of regions in human *c-myc* that are involved in transformation and nuclear localization. *Mol. Cell. Biol.* 7 : 1697—1709.
- Tosi A., Haas C., Herzog F., Gilmozzi A., Berninghausen O., Ungewickell C., Gerhold C. B., Lakomek K., Aebersold R., Beckmann R., Hopfner K. P. 2013. Structure and subunit topology of the INO80 chromatin remodeler and its nucleosome complex. *Cell.* 154 : 1207—1219.
- Tsaneva I. R., Muller B., West S. C. 1993. RuvA and RuvB proteins of *Escherichia coli* exhibit DNA helicase activity *in vitro*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 90 : 1315—1319.
- Walker J. E., Saraste M., Runswick M. J., Gay N. J. 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1 : 945—951.
- Watkins N. J., Lemm I., Ingelfinger D., Schneider C., Hossbach M., Urlaub H., Luhrmann R. 2004. Assembly and maturation of the U3 snoRNP in the nucleoplasm in a large dynamic multiprotein complex. *Mol. Cell.* 16 : 789—798.

Wood M. A., McMahon S. B., Cole M. D. 2000. An ATPase/helicase complex is an essential cofactor for oncogenic transformation by c-Myc. *Mol. Cell.* 5 : 321—330.

Yamada K., Kunishima N., Mayanagi K., Ohnishi T., Nishino T., Iwasaki H., Shinagawa H., Morikawa K. 2001. Crystal struc-

ture of the Holliday junction migration motor protein RuvB from *Thermus thermophilus* HB8. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 98 : 1442—1447.

Поступила 6 V 2016

STRUCTURE AND MECHANISMS OF ACTION OF MULTIFUNCTIONAL TIP49 PROTEINS

A. S. Afanasyeva,^{1,2,*} A. P. Yakimov,^{1,2} M. Yu. Grigoriev,³ M. G. Petukhov^{1,2}

¹ Institute of Nanobiotechnologies, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251,

² Petersburg Nuclear Physics Institute, B. P. Konstantinov NRC «Kurchatov Institute», Gatchina, 188300,

and ³ UMR 5099; CNRS; LBME; F-31000 Toulouse; France;

* e-mail: arina.afan@gmail.com

In this paper reviewed available data on the structure and properties of the TIP49 family proteins, which are the central elements of many important cellular complexes, such as INO80, SWR1, p400 and TIP60. TIP49a and TIP49b are highly related and involved in essential cellular functions conserved from yeast to human. These proteins play a key role in cancerogenesis and therefore, selective inhibition of their ATPase activity can be considered as a promising therapeutic strategy targeting several types of cancer. Thus, detailed studies of the properties and molecular functions of the TIP49 proteins have both fundamental and practical importance, and will clarify molecular mechanisms of the diseases that are associated with their dysfunctions.

Key words: TIP49, Pontin/Reptin, Rvb1 and Rvb2 AAA+ ATPase, helicase, INO80, SWR1 and TIP60.