

DOI: 10.7868/S0041377118100193

## МЕХАНИЗМ СВОРАЧИВАНИЯ ТРАНСАКТИВАЦИОННОГО ДОМЕНА Е-БЕЛКОВ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С KIX-ДОМЕНОМ КОАКТИВАТОРА ТРАНСКРИПЦИИ СВР

**© A. B. Фонин,<sup>1,\*</sup> Н. Шарма,<sup>2</sup> С. А. Силонов,<sup>1</sup> О. Г. Штиронок,<sup>1</sup>  
К. К. Туроверов,<sup>1</sup> В. Н. Уверский,<sup>3</sup> Р. Гири,<sup>2</sup> И. М. Кузнецова<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064,

<sup>2</sup> Индийский технологический институт Манди, Химачал-Прадеш, 175005, Индия, и

<sup>3</sup> Университет Флориды, Тампа, США;

\* электронный адрес: alexfonin@incras.ru

Внутренне неупорядоченные белки, неспособные образовывать компактную упорядоченную структуру за счет самоорганизации, могут подвергаться компактизации при взаимодействии с партнерами, если свободная энергия возникающего комплекса меньше свободной энергии белка и партнера до взаимодействия. В частности, при комплексообразовании неупорядоченного трансактивационного домена белков Е-семейства с KIX-доменом коактиватора транскрипции СВР TAD претерпевает конформационный переход типа неупорядоченный клубок-спираль. В настоящей работе охарактеризованы конформационные изменения TAD и его мутантной формы L20P в различных растворителях. Это позволило установить механизм упорядочивания структуры этого домена. Показано, что условия макромолекулярного краудинга, создаваемого высококонцентрированными растворами полиэтиленгликоля, изменение pH, ионной силы раствора, а также присутствие осмоловиков (саркозина и таурина) не вызывают компактизации структуры TAD. В то же время существенное упорядочивание структуры TAD было зарегистрировано в растворах ТМАО и в растворах спиртов — TFE, этианола и HFIP. Полученные данные позволили заключить, что упорядочивание TAD обусловлено его дегидратацией. Соответственно мы предположили, что приобретение TAD альфа-спиральной структуры при связывании с KIX также обусловлено вытеснением воды из ближайшего окружения TAD. Для проверки этой гипотезы была исследована структура мутантной формы TAD с заменой L20P в различных растворителях. Известно, что эта замена ослабляет взаимодействие белков Е-семейства с KIX. Показано, что структура мутантной формы TAD/L20P практически не изменяется в растворах спиртов. Эти данные подтвердили наше предположение об упорядочивании TAD при взаимодействии с KIX вследствие дегидратации TAD.

**Ключевые слова:** внутренне неупорядоченные белки, дегидратация, комплексообразование, компактизация

**Принятые сокращения:** HFIP — гексаизофторопропанол, IDPs — внутренне неупорядоченные белки, СВР — белок, связывающийся с транскрипционным фактором CREB, KIX — домен белка СВР, взаимодействующий с киназа-индуциальным доменом CREB, PEG — полиэтиленгликоль, TAD — трансактивационный домен, TFE — 2,2,2-трифторэтанол, ТМАО — trimethylaminokсид.

Внутренне неупорядоченные белки (ID-белки), составляющие около 40 % протеома эукариот (Uversky, Dunker, 2010), интенсивно изучаются последние 10—15 лет. Неупорядоченные полипептидные цепи, неспособные организовать компактную упорядоченную структуру за счет самоорганизации, могут образовывать компактную структуру при взаимодействии с партнерами, если свободная энергия возникающего комплекса меньше свободной энергии белка и партнера до взаимодействия (Turoverov et al., 2010). Способность ID-белков к взаимодействию с партнерами является основой для выполнения нативными неупорядоченными белками их

функций — специфического взаимодействия с различными белками, молекулами ДНК и лигандами.

Взаимодействие KIX-домена транскрипционного коактиватора СВР со своими партнерами, являющимися ID-белками, может рассматриваться как модель для изучения комплексообразования и фолдинга нативных частично и (или) полностью неупорядоченных белков (Dyson, Wright, 2016). СВР и его паралог p300 взаимодействуют более чем с 400 транскрипционными факторами и регуляторными белками, многие из которых имеют частично или полностью неупорядоченную структуру (Bedford et al., 2010). KIX-домен СВР является одним из меди-

аторов таких взаимодействий. В число партнеров KIX входят CREB, c-Myb, c-Jun, MLL, p53, E2A, FOXO3, STAT1, HIV1 и многие другие белки (Thakur et al., 2014). KIX имеет два сайта связывания со своими партнерами — c-Myb и MLL, названные по взаимодействующим с KIX специфическим белкам (Goto et al., 2002). Известно, что структура ряда IDPs подвергается компактизации при их комплексообразовании с KIX (Gianni et al., 2012).

В частности, структура трансактивационного домена белков Е-семейства транскрипционных факторов претерпевает переход неупорядоченный клубок—спираль при взаимодействии с KIX (Denis et al., 2012). KIX непосредственно связывается с так называемой PCET-последовательностью TAD, состоящей из двух консервативных последовательностей Leu-x-x-Leu-Leu (LXXLL) и Leu-Asp-Phe-Ser (LDFS), идентифицированных в ряде белков, взаимодействующих с активаторами транскрипции. Взаимодействие KIX с PCET-последовательностями активаторов транскрипции может играть существенную роль в различных клеточных процессах. Например, связывание KIX с PCET-последовательностью активационного домена онкобелка E2A-PBX1 способствует лейкозной трансформации первичных гемопоэтических клеток (Bayly et al., 2004).

## Материал и методика

**Материалы.** Сарказин, таурин, TMAO, TFE, HFIP, PEG, KCl, HCl, лимонная кислота, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, глицин и NaOH (Sigma, США) использовали без дополнительной очистки. Трансактивационный домен Е-белков, состоящий из 19 аминокислотных остатков (11—28) (NH<sub>2</sub>-GSGTDKELSDLDFSAMFS-COOH) был синтезирован компанией АТГ Сервис Ген (Россия). Препараты KIX были выделены, получены и очищены согласно описанию (Gianni et al., 2012).

**Спектроскопия кругового дихроизма.** Спектры кругового дихроизма (КД) получали с использованием спектрополяриметра J-810 (Jasco, Япония). Спектры КД в дальней УФ-области регистрировали в области 260—190 нм с шагом 0.1 нм, используя кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 мм. Для улучшения соотношения сигнал/шум каждый спектр регистрировался 3 раза, полученные данные усредняли.

Молярную эллиптичность рассчитывали, исходя из экспериментально полученных значений эллиптичности  $\theta$ :

$$[\theta]_{\lambda} = \frac{\theta_{\lambda} M}{10dcN}, \quad (1)$$

где  $\theta$  — эллиптичность, миллиградусы,  $c$  — концентрация, мг/мл;  $d$  — длина оптического пути, см;  $M$  — молярная масса полимера, г/моль;  $N$  — число остатков в полимере.

## Результаты и обсуждение

TAD в водных растворах представляет собой неупорядоченный пептид. Анализ данных КД свидетельствует о том, что в структуре трансактивационного домена E2A-PBX1 практически нет упорядоченных участков. Однако анализ первичной структуры TAD свидетельству-

ет о высокой вероятности образования альфа-спиральной структуры PCET-мотивом TAD. Это позволяет предположить, что формирование водородных связей между молекулами воды и молекулами TAD препятствует образованию TAD альфа-спиральной структуры.

Взаимодействие TAD с KIX сопровождается существенным увеличением упорядоченности структуры TAD. На основании предположения о том, что при взаимодействии KIX с TAD структура KIX-домена не изменяется, мы определили спектр КД TAD в составе комплекса TAD с KIX путем вычитания из спектра комплекса KIX с TAD спектра KIX-домена. Анализ данных КД-спектра TAD в комплексе с KIX показал, что доля альфа-спиральных участков в структуре TAD в этих условиях составляет 20—30 % (рис. 1, *a*). Эти данные свидетельствуют о том, что приобретение TAD альфа-спиральной структуры при его взаимодействии с TAD можно охарактеризовать в рамках модели «сворачивание после связывания».

Для того чтобы подтвердить отсутствие изменений в структуре KIX при взаимодействии с TAD, мы исследовали взаимодействие мутантной формы KIX/Y658W с TAD. Мутантная форма KIX содержит замену тирозинового остатка 658 на триптофановый в так называемом c-Myb-сайте KIX. TAD связывается с MLL-сайтом KIX. Как правило, взаимодействие партнера KIX с одним из сайтов этого белка аллостерически вызывает структурные изменения в другом сайте KIX. Поэтому отсутствие изменений характеристик собственной УФ-флуоресценции мутантной формы KIX/Y658W при увеличении концентрации TAD в исследуемых растворах при одновременном увеличении упорядоченности TAD подтверждает наше предположение. Для того чтобы определить причины, вызывающие упорядочивание структуры TAD, нами была исследована структура этого домена в различных растворителях. Показано, что структура TAD практически одинакова в растворах с pH 1—12 (рис. 1, *b*). Это свидетельствует о том, что взаимодействие TAD с KIX не обусловлено ионными взаимодействиями.

Как известно, биомакромолекулы функционируют в клетке в условиях ограниченного свободного объема (условия макромолекулярного краудинга). Это ограничивает число конформаций, которые может принять полипептидная цепь, что в свою очередь может вызывать как сворачивание полипептидной цепи в компактную структуру, так и нарушение фолдинга белков и (или) их агрегацию. Условия макромолекулярного краудинга *in vitro* создают с помощью высококонцентрированных растворов инертных полимеров — полизиленгликоля различной молекулярной массы, декстрана, фиколла и др. Концентрированные растворы этих полимеров используются для имитации эффекта исключенного объема, т. е. создания условий, при которых объем, занимаемый краудинг-агентами, недоступен для других макромолекул. Вследствие взаимной непроницаемости макромолекул растворенного вещества в таких условиях существенно возрастают стерические взаимодействия между исследуемым биологическим объектом и молекулами растворителя. Нами было исследовано влияние PEG различной молекулярной массы и концентрации на структуру TAD. Установлено, что используемые краудинг-агенты в независимости от их молекулярной массы и концентрации не оказывают существенного влияния на структуру домена (рис. 1, *c*). Это свидетельствует о том, что уменьшение свободного объема не вызывает увеличения упорядоченности TAD.

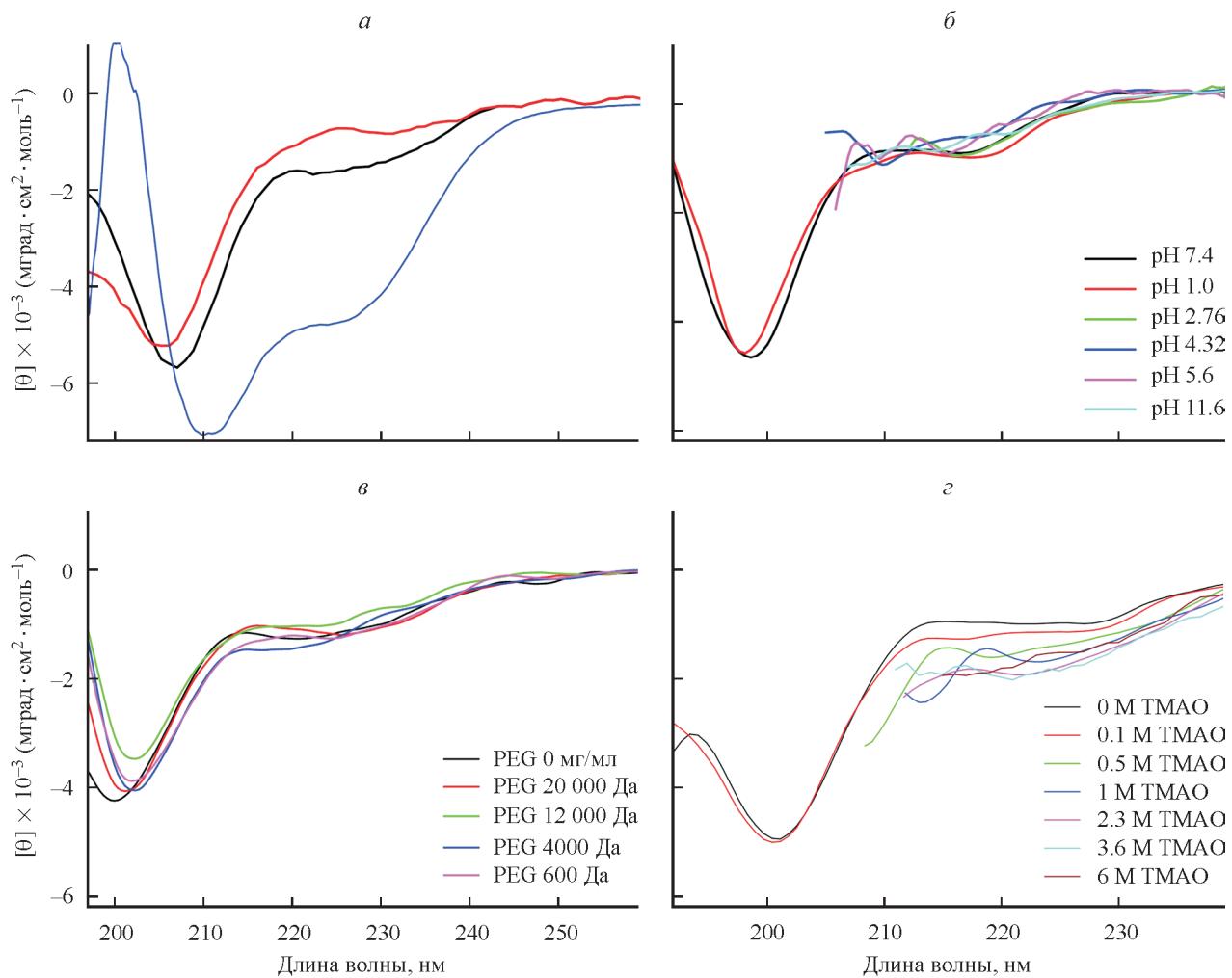


Рис. 1. Спектры кругового дихроизма (КД) трансактивационного домена Е-белков в дальней УФ-области спектра.

*а* — спектры КД дикого типа TAD (черная кривая), мутантной формы TAD/L20P (красная кривая) и дикого типа TAD после взаимодействия с KIX (синяя кривая); *б* — КД-спектры TAD в растворах с различным уровнем pH; *в* — КД-спектры TAD в растворах PEG (200 мг/мл) различной молекулярной массы; *г* — КД-спектры TAD в растворах с различной концентрацией TMAO.

Условия молекулярного краудинга в клетке создаются не только высокомолекулярными веществами (белками, нуклеиновыми и рибонуклеиновыми кислотами), но и низкомолекулярными соединениями. В частности, клетки ряда организмов, обитающих в экстремальных условиях, содержат высокие (до 2.5 М) концентрации осмолитов. Осмолиты — небольшие органические вещества, основной функцией которых является выравнивание гидростатического давления между внутри- и внеклеточным пространством. Эти низкомолекулярные соединения накапливаются в клетке в ответ на стресс (осмотический, температурный, вызванный изменением pH и концентрации солей) и способны увеличивать стабильность и функциональную активность нативных белков и способствовать фолдингу развернутых белков. Поэтому осмолиты часто называют химическими шаперонами. Было проанализировано влияние различных осмолитов (сарказина, таурина и TMAO) на структуру TAD. Установлено, что TMAO способствует существенному увеличению упорядоченности структуры TAD, в то время как в других исследуемых растворах не наблюдается изменений структуры этого домена (рис. 1, *г*). TMAO известен как один из наиболее сильных осмолитов, способствующий фолдин-

гу различных белков. Считается, что влияние TMAO на структуру и стабильность белков обусловлено так называемым осмоФобным эффектом — исключением воды из приповерхностного слоя белка.

Соединение 2,2,2-трифторэтанол (TFE), способствующее стабилизации альфа-спиральных участков, и другие спирты, так же как и TMAO, способствуют дегидратации белков. Нами было исследовано влияние TFE, этанола и HFIP на структуру TAD. Установлено, что увеличение концентрации спиртов в исследуемых растворах способствует приобретению TAD альфа-спиральной структуры (рис. 2, *а*, *в*). Обнаруженный переход неупорядоченный клубок—спираль структуры TAD в растворах спиртов и TMAO позволяет предположить, что именно дегидратация этого домена способствует упорядочиванию его структуры.

Анализ структуры комплекса KIX с TAD (Denis et al., 2012) свидетельствует о низкой доступности растворителю PCET-мотива TAD в этих условиях. Кроме того, сайт связывания TAD образован почти исключительно гидрофобными остатками. На основании полученных экспериментальных данных можно заключить, что приобретение TAD альфа-спиральной структуры при его связывании с

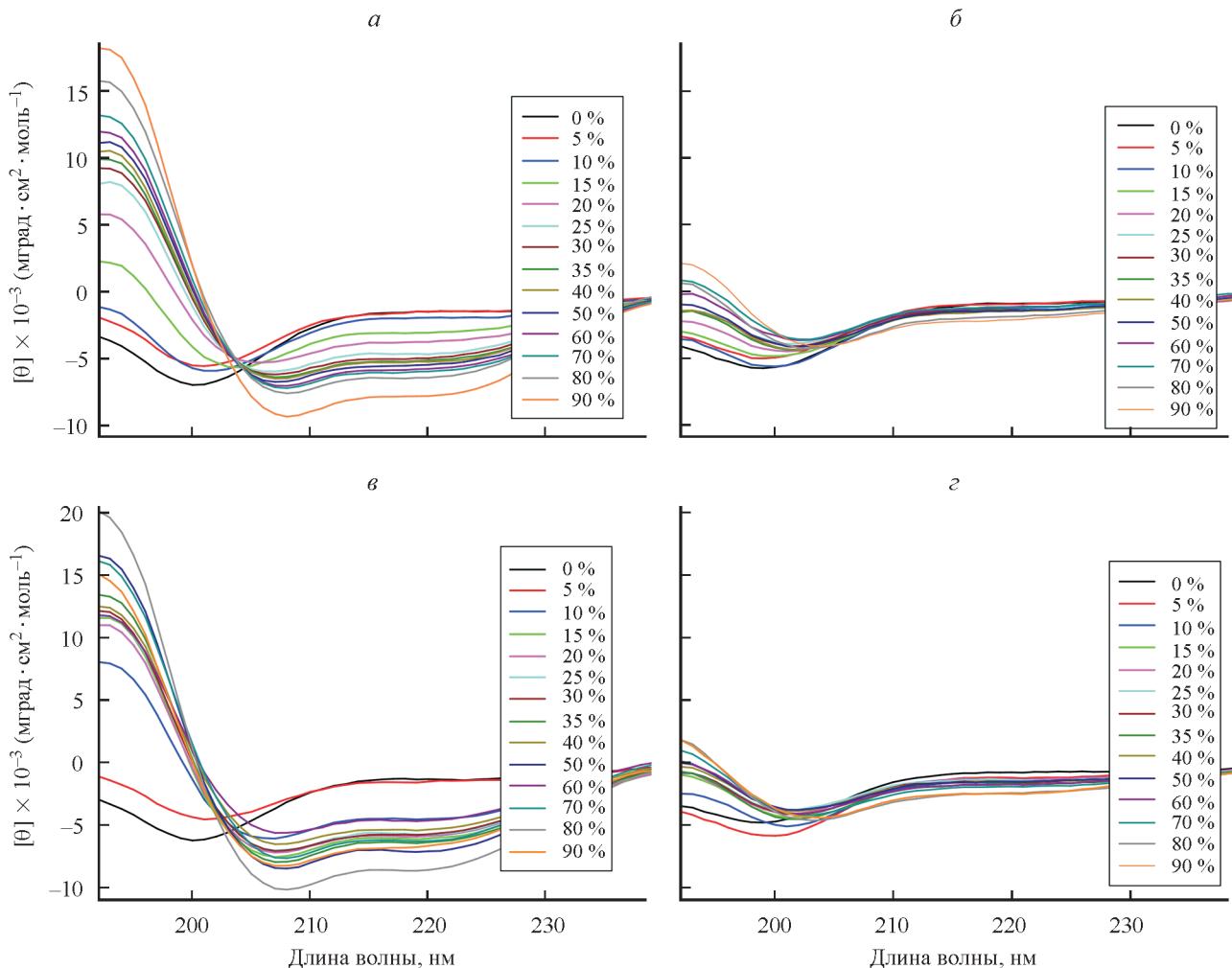


Рис. 2. Спектры КД дикого типа TAD (*a*, *c*) и мутантной формы TAD/L20P (*b*, *d*) в растворах с различной концентрацией TFE (*a*, *b*) и HFIP (*c*, *d*).

KIX обусловлено вытеснением воды из ближайшего окружения PCET-мотива TAD.

Для проверки этой гипотезы была исследована структура мутантной формы TAD с заменой L20P. Известно, что замена лейцина на стыке последовательностей Leu-x-x-Leu-Leu и Leu-Asp-Phe-Ser ослабляет взаимодействие E2A-PBX1 с KIX-доменом и индукцию лейкоза костного мозга мышей *in vitro*. Показано, что структура мутантной формы L20P практически не изменяется в растворах спиртов (рис. 2, *b*, *c*). Эти данные подтвердили нашу гипотезу об упорядочивании TAD при взаимодействии с KIX вследствие дегидратации PCET-мотива TAD.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 17-54-45169 ИНД\_а) и стипендии Президента РФ (СП-3665.2018.4).

#### Список литературы

Bayly R., Chuen L., Currie R. A., Hyndman B. D., Casselman R., Blobel G. A., LeBrun D. P. 2004. E2A-PBX1 interacts directly with the KIX domain of CBP/p300 in the induction of prolif-

eration in primary hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* 279 : 55 362—55 371.

Bedford D. C., Kasper L. H., Fukuyama T., Brindle P. K. 2010. Target gene context influences the transcriptional requirement for the KAT3 family of CBP and p300 histone acetyltransferases. *Epidemiology*. 5 : 9—15.

Denis C. M., Chitayat S., Plevin M. J., Wang F., Thompson P., Liu S., Spencer H. L., Ikura M., LeBrun D. P., Smith S. P. 2012. Structural basis of CBP/p300 recruitment in leukemia induction by E2A-PBX1. *Blood*. 120 : 3968—3977.

Dyson H. J., Wright P. E. 2016. Role of intrinsic protein disorder in the function and interactions of the transcriptional coactivators CREB-binding protein (CBP) and p300. *J. Biol. Chem.* 291 : 6714—6722.

Gianni S., Morrone A., Giri R., Brunori M. 2012. A folding-after-binding mechanism describes the recognition between the transactivation domain of c-Myb and the KIX domain of the CREB-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 428 : 205—209.

Goto N. K., Zor T., Martinez-Yamout M., Dyson H. J., Wright P. E. 2002. Cooperativity in transcription factor binding to the coactivator CREB-binding protein (CBP). The mixed lineage leukemia protein (MLL) activation domain binds to an allosteric site on the KIX domain. *J. Biol. Chem.* 277 : 43 168—43 174.

Thakur J. K., Yadav A., Yadav G. 2014. Molecular recognition by the KIX domain and its role in gene regulation. *Nucleic Acids Res.* 42 : 2112—2125.

Turoverov K. K., Kuznetsova I. M., Uversky V. N. 2010. The protein kingdom extended: ordered and intrinsically disordered proteins, their folding, supramolecular complex formation, and aggregation. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 102 : 73—84.

Uversky V. N., Dunker A. K. 2010. Understanding protein non-folding. *Biochim. Biophys. acta.* 1804 : 1231—1264.

Поступила 16 VII 2018

FOLDING MECHANISM OF E-PROTEINS TRANSACTIVATION DOMAIN  
AFTER ITS INTERACTION WITH KIX DOMAIN OF CBP TRANSCRIPTION COACTIVATOR

A. V. Fonin,<sup>1,\*</sup> N. Sharma,<sup>2</sup> S. A. Silonov,<sup>1</sup> O. G. Shpironok,<sup>1</sup> K. K. Turoverov,<sup>1</sup>  
V. N. Uversky,<sup>3</sup> R. Giri,<sup>2</sup> I. M. Kuznetsova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064,

<sup>2</sup> Indian Institute of Technology Mandi, Himachal Pradesh, 175005, India, and

<sup>3</sup> University of South Florida, Tampa, FL, USA;

\* e-mail: alexfonin@incras.ru

Intrinsically disordered proteins, incapable to form tight ordered structure due to self-organization, could form compact structure with interaction with partners, if free energy of occurring complex is less than free energy of protein and partner before interaction. In particular, intrinsically disordered transactivation domain of E-family proteins undergoes a conformational transition coil-helix after its interaction in with the KIX domain of the CBP transcription coactivator. In this paper, the conformational changes of TAD and its L20P mutant form were characterized in various solvents. This allowed us to establish a folding mechanism of this domain. It was shown that macromolecular crowding conditions, change in pH ionic strength of the solution, and the presence of osmolytes (sarcosine, taurine) does not cause compaction of the TAD structure. At the same time, a significant ordering of the TAD structure was detected in solutions of TMAO and alcohols. These data allowed us to conclude that the TAD ordering is due to its dehydration. Accordingly, we assumed that TAD folding after its binding to binding to KIX is also due to the displacement of water from the TAD environment. To test this hypothesis, the structure of the L20P TAD mutant form was studied in different solvents. It is known that this mutation weakens the interaction of E-family proteins with KIX. It was shown that the L20P structure does not practically change in solutions of alcohols. These data confirmed our assumption about the ordering of TAD after its interacting with KIX due to the dehydration of the TAD.

Key words: intrinsically disordered proteins, self-organization, compact structure, dehydratation