

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.73

КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ И ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ZAD-ДОМЕНА БЕЛКА Serendipity-d ИЗ *Drosophila melanogaster*

© 2020 г. К. М. Бойко^{1,*}, А. Ю. Николаева², А. Н. Бончук³, П. Г. Георгиев³, В. О. Попов^{1,2}

¹Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”, Москва, Россия

²Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

³Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

*E-mail: kmb@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 03.03.2020 г.

После доработки 03.03.2020 г.

Принята к публикации 04.03.2020 г.

Пространственная организация генома контролируется особым классом архитектурных белков, к числу которых относятся белки, содержащие гомо- и гетеро-димеризующиеся ZAD-домены. Такие домены являются уникальными для членистоногих и присутствуют на N-конце многих белков, имеющих в своем составе цинковые пальцы типа C2H2. Несмотря на постоянно растущий интерес к исследованию архитектурных белков, имеется очень мало данных об их структуре (структуре их функциональных доменов), которые могли бы пролить свет на механизмы регуляции процессов установления и поддержания пространственной организации хроматиновых доменов. Так, к настоящему моменту установлены лишь две структуры ZAD-доменов. Проведена кристаллизация не описанного ранее ZAD-домена белка Serendipity-d из *Drosophila melanogaster* и предварительное рентгеноструктурное исследование полученных кристаллов.

DOI: 10.31857/S0023476120040050

ВВЕДЕНИЕ

Пространственная организация генома имеет критическое значение в регуляции процессов, связанных с реализацией генетической информации. Известно, что в процесс регуляции транскрипции у эукариот вовлечены многочисленные элементы генома, зачастую расположенные на значительном расстоянии друг от друга [1]. В последние несколько лет была сформирована концепция, согласно которой существует особый класс архитектурных белков, участвующих в организации общей архитектуры хромосом, а также в локальном контроле энхансер-промоторных взаимодействий [2–5].

Предполагается, что данные белки способны устанавливать дистанционные взаимодействия, а также привлекать различные белковые многокомпонентные комплексы, которые, в частности, могут менять статус окружающего хроматина, однако соответствующие механизмы действия архитектурных белков до сих пор не выяснены [6, 7].

Исходя из этого, особый интерес для изучения представляют архитектурные белки, способные напрямую или путем привлечения других белков-партнеров формировать белковые комплексы. За счет такого свойства возможно специфичное и

эффективное сближение дистанционно разделенных регуляторных элементов генома либо выпетливание хроматиновых доменов.

К числу таких архитектурных белков относятся, в частности, широко распространенные у членистоногих мультидоменные транскрипционные факторы, содержащие на N-конце ZAD-домены (*Zinc-finger Associated Domain*). Несмотря на широкое распространение ZAD-доменов в составе транскрипционных факторов (в геноме дрозофилы аннотированы 95 различных ZAD-доменов), их функциональная роль остается почти неизученной, хотя и показано, что они играют ключевую роль в организации специфических дистанционных взаимодействий в трансгенной модельной системе [8]. Несмотря на достаточно большой объем молекулярно-биологических данных в этой области, к настоящему моменту имеется существенный недостаток структурных данных, которые могли бы способствовать идентификации структурных мотивов, обеспечивающих некоторым представителям ZAD-доменов способность образовывать как гомо-, так и гетеродимеры. Так, к настоящему моменту известны лишь две пространственные структуры ZAD-домена белков Grauzone (код PDB – 1PZW) и CG2712

Таблица 1. Кристаллографические данные и параметры съемки кристалла ZAD-домена белка Serendipity-d

Пр. гр.	$P4_12_12$
$a, b, c, \text{Å}$;	97.79, 97.79, 92.69
$\alpha = \beta = \gamma$, град	90
T , К	100
λ , Å	1.0
Разрешение, Å	97.79–3.67 (4.02–3.67)*
Число независимых рефлексивов	5202 (1206)
Повторяемость	5.2 (5.0)
Полнота набора, %	98.90 (99.0)
$I/\sigma(I)$	5.4 (2.3)
R_{meas} , %	17.0 (50.8)
$CC_{1/2}$, %	99.2 (94.5)

* В скобках приведены значения для последнего слоя.

(6FP5). Показано, что эти домены имеют атипичный фолд, содержащий две альфа-спирали и подвижные петли, координированные атомом цинка.

В настоящей работе получены кристаллы не описанного ранее ZAD-домена белка Serendipity-d из *Drosophila melanogaster*. Проведено предварительное рентгеноструктурное исследование полученных кристаллов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Очистка и выделение ZAD-домена белка Serendipity-d из *D. melanogaster*, получение кристаллов. ZAD-домен белка Serendipity-d (1–90 ак), слитый с GST, экспрессировали в клетках *E. coli* штамма BL21 (DE3) в течение ночи при +18°C. Клетки *E. coli*, содержащие рекомбинантный ZAD-домен белка Serendipity-d, разрушали ультразвуком в буфере: 20 мМ Tris, pH 7.5, 150 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂, 0.1% NP40, 0.1 мМ ZnCl₂, 1 мМ DTT. Лизат центрифугировали при 20000 g в течение 1 ч при +4°C и наносили на предварительно уравновешенную 2 мл колонку с глутатион-агарозой. Затем колонку промывали 20 мл буфера: 20 мМ Tris, pH 7.5, 500 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂, 0.1% NP40, 0.1 мМ ZnCl₂, 1 мМ DTT, а затем 20 мл буфера: 20 мМ Tris, pH 7.5, 200 мМ NaCl, 0.1 мМ ZnCl₂, 5 мМ цитрата натрия, 1 мМ DTT. Белок элюировали с колонки, отрезая от GST, для этого добавляли 0.5 мг TEV-протеазы в 10 мл буфера: 20 мМ Tris, pH 7.5, 200 мМ NaCl, 0.1 мМ ZnCl₂, 5 мМ цитрата натрия, 1 мМ DTT, колонку закрывали и инкубировали на ротаторе в течение ночи при +4°C. Фракцию проскока собирали и переводили в предварительно дегазированный буфер: 20 мМ Tris, pH 7.4, 0.1 мМ ZnCl₂,

1 мМ DTT, при помощи колонки HiPrep Desalting (GE Healthcare). Полученный препарат наносили на предварительно уравновешенную тем же буфером колонку Source 15Q (GE Healthcare) и собирали проскок, содержащий белок, концентрировали до 10 мг/мл при помощи концентраторов Millipore для последующей кристаллизации.

Предварительный скрининг условий кристаллизации проводили с использованием роботизированной системы кристаллизации Rigaku (США) [9] и стандартных наборов для кристаллизации глобулярных белков компании Hampton Research (США): Crystal Screen HT, Crystal Screen Cryo HT, Index HT, PEG/Ion HT, PEGRx HT и SaltRx HT. Кристаллизацию проводили в 96-луночных пластиковых планшетах Art Robbins Instruments (США) при температуре 15°C. Использовали белковый препарат с концентрацией 10 мг/мл. Кристаллы белка появились в ряде условий, а для последующей оптимизации были выбраны условия, в которых кристаллы имели наилучший внешний вид (отдельные кристаллы призматической формы) и наибольшие размеры — порядка 50 × 50 × 50 мкм. В этих условиях кристаллы росли в течение 5–7 дней. Оптимизацию кристаллов ZAD-домена проводили методом диффузии в парах (вариант “висячая капля”) с использованием ранее найденных предварительных условий кристаллизации. В процессе оптимизации варьировались концентрации осадителя и белка, а также температура кристаллизации. Финальные условия кристаллизации содержали: 0.1 М хлорида натрия, 0.1 М ХЕПЕС, pH 7.5, 1.5 М сульфата лития. Кристаллы максимального размера росли в течение 7 дней.

Сбор и обработка дифракционных данных. Решение структуры. Перед сбором рентгенодифракционных данных кристаллы ZAD-домена вылавливали петлей и переносили в криораствор, содержащий кроме компонентов, входящих в противораствор, 25% глицерина, после чего кристалл в петле замораживали в парах азота. Дифракционные наборы собирали при температуре 100 К на станции BL41XU синхротронного источника SPring-8 (Япония). Дифракционную картину фиксировали детектором Pilatus6M-F. Для расчета стратегии сбора данных использована программа HKL2000 [10], предложившая следующие параметры: длина волны 1.0 Å, угол вращения 720°, угол качания 0.5°, расстояние кристалл–детектор 700 мм. Набор дифракционных данных обработан с использованием программы iMosflm [11]. Характеристики кристалла и статистика набора данных приведены в табл. 1.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Использованные в рентгеноструктурном эксперименте кристаллы ZAD-домена белка Seren-

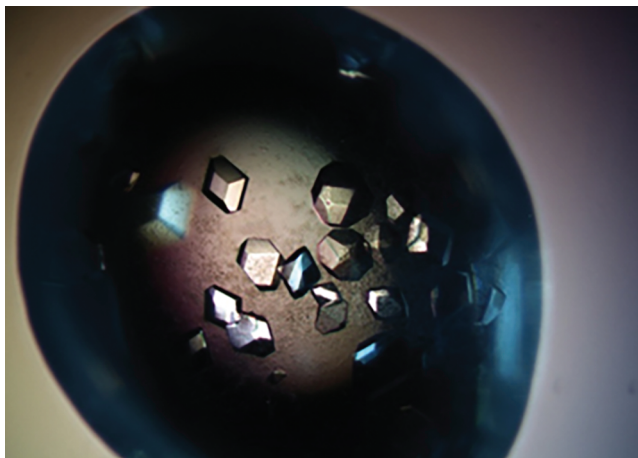


Рис. 1. Кристаллы ZAD-домена белка Serendipity-d из *D. melanogaster*, выросшие в оптимизированных условиях.

dipity-d из *D. melanogaster* имели форму призмы (рис. 1) и размеры порядка $200 \times 200 \times 300$ мкм.

Кристаллы дифрагировали до разрешения 3.67 \AA (рис. 2) и принадлежали пр. гр. $P4_12_12$ с параметрами ячейки $a = b = 97.79$, $c = 92.69 \text{ \AA}$. Оценка содержания растворителя в элементарной ячейке по методу Мэттьюса [12], проведенная с помощью программы из пакета CCP4 [13], показала, что в независимой части содержатся две субъединицы белка.

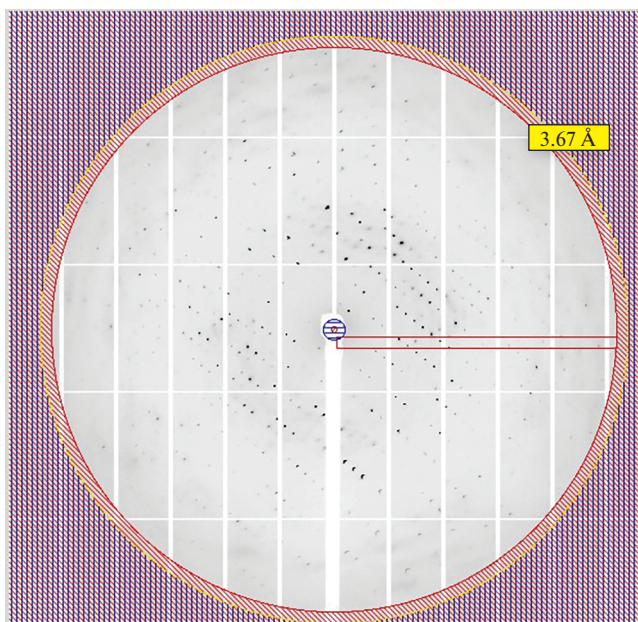


Рис. 2. Дифракционная картина от кристаллов ZAD-домена белка Serendipity-d из *D. melanogaster*, визуализированная в iMosflm.

Решение структуры методом молекулярного замещения (программа MOLREP [14]) с использованием в качестве модели известных структур ZAD-доменов (коды PDB – 6FP5, 1PZW), а также их фрагментов, не дало результата. Возможной причиной является относительно низкое разрешение полученных структурных данных. В дальнейшем планируется провести оптимизацию других условий кристаллизации, полученных для данного белка, с целью улучшения качества кристаллов и снять набор данных для аномального рассеяния на атоме цинка, входящем в состав данного белка, для решения структуры методом аномального рассеяния.

Работы по экспрессии и выделению белка выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-74-10099), кристаллизация и рентгеноструктурный эксперимент выполнены при поддержке Федерального космического агентства (проект КЭ (ЦР) “Кристаллизатор”), работы по анализу полученных данных выполнены при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Szabo Q., Bantignies F., Cavalli G. // Sci. Adv. 2019. V. 5. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw1668>
2. Dekker J., Mirny L. // Cell. 2016. V. 164. P. 1110.
3. Maksimenko O., Georgiev P. // Front Genet. 2014. V. 5. P. 28.
4. Maksimenko O., Kyrchanova O., Klimenko N. et al. // Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech. 2020. V. 1863. P. 194446.
5. Zolotarev N., Maksimenko O., Kyrchanova O. et al. // Nucleic Acids Research. 2017. V. 45. P. 12285.
6. Fedotova A.A., Bonchuk A.N., Mogila V.A. et al. // Acta Naturae. 2017. V. 9. P. 47.
7. Zheng H., Xie W. // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2019. V. 20. P. 535.
8. Zolotarev N., Fedotova A., Kyrchanova O. et al. // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. P. 7228.
9. Boyko K.M., Lipkin A.V., Popov V.O. et al. // Crystallography Reports. 2013. V. 58. P. 442.
10. Otwinowski Z., Minor W. // Macromolecular Crystallography. Pt. A. 1997. V. 276. P. 307.
11. Batty T.G.G., Kontogiannis L., Johnson O. et al. // Acta Cryst. D. 2011. V. 67. P. 271.
12. Matthews B.W. // J. Mol. Biol. 1968. V. 33. P. 491.
13. Winn M.D., Ballard C.C., Cowtan K.D. et al. // Acta Cryst. D. 2011. V. 67. P. 235.
14. Vagin A.A., Isupov M.N. // Acta Cryst. D. 2001. V. 57. P. 1451.