

УДК 577.214

рН МОЖЕТ ИГРАТЬ РОЛЬ В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ РАН ДОМЕНОВ ПУТЕМ ИЗМЕНЕНИЯ ИХ СТРУКТУРЫ И ТЕРМОДИНАМИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ*

© 2015 Таухеед Хасан^{1#}, Машук Али^{1#}, Даман Салуя¹,
Лаишрам Раджендракумар Сингх^{1**}

*University of Delhi, Dr. B. R. Ambedkar Center for Biomedical
Research, India, Delhi-110-007; fax: +91(11)276-66248,
E-mail: directoracbr@gmail.com, director@acbr.du.ac.in*

Поступила в редакцию 19.08.14
После доработки 29.09.14

Регулятор транскрипции Sin3В в клетках человека (hSin3В) представляет собой адапторный белок (scaffold protein), который взаимодействует с различными транскрипционными факторами и регулирует транскрипцию. Он состоит из шести консервативных доменов: домена, взаимодействующего с деацетилазой гистонов (НID), высококонсервативного участка (НСR) и четырех парных амфифильных спиралей (РАН 1–4). Интересно, что РАН домены белка hSin3В в значительной мере гомологичны друг другу, однако каждый из них взаимодействует со строго специфичным набором транскрипционных факторов. Несмотря на то, что различные факторы, взаимодействующие с РАН доменами белка hSin3В, были охарактеризованы, информации о структуре отдельных РАН доменов hSin3В в литературе нет. В настоящей работе мы охарактеризовали структуру и стабильность различных РАН доменов белка hSin3В при физиологических значениях рН, а также при значениях рН, характерных для ядра. Мы показали, что структура нативного состояния и стабильность различных РАН доменов различается при значениях рН, характерных для ядра, при которых hSin3В выполняет свою биологическую функцию. Мы также показали, что структура нативного состояния и термодинамическая стабильность доменов РАН2 и РАН3 при значениях рН, характерных для ядра, отличается от таковых при физиологических значениях рН, тогда как структура домена РАН1 остается неизменной при обоих значениях рН. Полученные результаты свидетельствуют о том, что структурная гетерогенность РАН доменов может обуславливать уникальность набора связываемых транскрипционных факторов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: структура белка, термодинамическая стабильность, круговой дихроизм, регулятор транскрипции, адапторный белок.

Sin3 (общий регулятор транскрипции) участвует в регуляции различных биологических процессов, таких как изменение положения нуклеосом (ремоделинг), метилирование ДНК, клеточная пролиферация и апоптоз [1, 2]. Sin3 не связывается с ДНК, но будучи адапторным белком, способствует транскрипции различных генов за счет взаимодействия с транскрипционными факторами с образованием Sin3 комплекса. У человека основной Sin3 комплекс состоит из восьми компонентов: SIN3, HDAC1, HDAC2, RbAp46, RbAp48, SAP30, SAP18 и SDS3 [3, 4]. Sin3 содержит шесть отдельных консервативных

доменов: НID, НСR и РАН (1–4) [1]. Домены РАН1 и РАН2 в значительной степени схожи у разных организмов, тогда как последовательность РАН3 довольно сильно отличается от последовательностей РАН1 и РАН2 (степень идентичности 25 и 16% соответственно). Тем не менее эти РАН домены узнают различные мотивы, т.е. обладают высокой степенью специфичности по отношению к мишеням [5, 6]. В клетках человека обнаружены две изоформы Sin3 (hSin3А и hSin3В), кодируемые двумя отдельными генами, которые являются, скорее всего, результатом дупликации [7]. Белки Sin3А и Sin3В чело-

Принятые сокращения: НID (histone deacetylase interaction domain) – домен, взаимодействующий с деацетилазой гистонов; НСR (highly conserved region) – высококонсервативный участок; РАН (1–4)(paired amphipathic helices) – четыре парных амфифильных спиралей).

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM14-235, 15.02.2015.

** Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

века ~57% идентичны друг другу, причем наиболее гомологичные участки приходятся на РАН домены и НID участок [8–9].

Известно, что РАН домены hSin3B отвечают за взаимодействие с различными транскрипционными факторами [10–12]. В клетках человека были идентифицированы различные партнеры, взаимодействующие с доменами РАН1, РАН2 и РАН3 и обеспечивающие выполнение различных биологических функций [13]. В литературе также встречается некоторая информация о структурных и функциональных аспектах РАН доменов [2, 14]. Кроме того, в последнее время появились данные о структуре Sin3 на атомарном уровне, однако большая часть структурных исследований была проведена на РАН доменах белка мышей, а не человека [6, 14–17]. Нехватка структурной информации о различных РАН доменах белка из клеток человека затрудняла систематический анализ данных о взаимодействии факторов. В настоящей работе с помощью различных спектроскопических методов мы исследовали различия структуры и стабильности разных РАН доменов Sin3B белка из клеток человека при значениях рН, характерных для ядра (6,3–6,8), и при физиологических значениях рН (7,0). Мы зафиксировали небольшие изменения структуры РАН доменов hSin3B при значениях рН, характерных для ядра, при которых Sin3 выполняет свои биологические функции. Мы также показали, что структура нативного состояния и стабильность РАН2 и РАН3 различаются при значениях рН, характерных для ядра, и при физиологических значениях рН, тогда как структура РАН1 остается неизменной при обоих значениях рН. Полученные нами результаты позволяют предположить, что различия конформации нативной структуры или подвижности структуры РАН доменов может обуславливать специфичность взаимодействия с другими белками.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клонирование, экспрессия и очистка белков.

Библиотеку кДНК из мозга эмбрионов человека амплифицировали согласно рекомендациям производителя («Clontech Laboratory Inc.», США) и использовали для ПЦР-амплификации различных РАН доменов белка hSin3B. Для амплификации использовали праймеры:

5'-AGCTGCGGATCCACGTAGAAGACG-3'

и

5'-TCTAGTCTCGAGCCGAGGGGAAGAAAAG-3' (РАН1),

5'-CATAGGGGATCCTGGAGTCCGATTC-3'

и

5'-GTGCATCTCGAGCGGCCCGTTTCCTGT-3' (РАН2)

и

5'-CAGTGGGGATCCACGGGACTCTGCAG-3'

и

5'-ATGGAACTCGAGAAGGACAGCTCTTTTACC-3' (РАН3).

При этом прямые праймеры содержали сайт рестрикции *Bam*HI, а обратные праймеры – сайт рестрикции *Xho*I. Продукты амплификации сначала клонировали в TA вектор («Promega», США), а затем в экспрессирующий вектор pGEX-5 × 3 по сайтам *Bam*HI/*Xho*I. Полученными плазмидами трансформировали клетки *E. coli* DH5alpha, после чего клетки растили в течение ночи на чашках с LB-агаром, содержащим 100 мкг/мл ампициллина. Точность клонирования фрагментов анализировали с помощью секвенирования. РАН домены экспрессировали в клетках BL21 (DE3). Клетки *E. coli* трансформировали полученными плазмидами, отдельные колонии растили в течение ночи в LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина при 37° перемешивая со скоростью 250–300 rpm [18]. 1 л свежей среды инокулировали 10 мл ночной культуры и растили при интенсивном перемешивании при 250 rpm в течение 3–4 ч до OD 600 равной 0,5–0,6. Суперэкспрессию РАН доменов индуцировали 0,5 mM изопропил-D-1-тиогалактопиранозидом (IPTG) при 37° при интенсивном перемешивании в течение 4 ч, после чего клетки собирали центрифугированием при 8000 g 20 мин при 4°. Осадок клеток замораживали, хранили при –80° и использовали в течение 1 недели.

Клетки лизировали в буфере, содержащем 50 mM Tris, pH 8,0 («MP Biomedicals», США), 250 mM NaCl («G-Biosciences», США), 0,1%-ный NP-40 («Sigma», США) и 1%-ный коктейль ингибиторов бактериальных протеаз («Sigma», США). Клетки лизировали ультразвуком (6 циклов с эффективностью 60%). Для удаления неразрушенных остатков лизат центрифугировали при 8000 g при 4°. Супернатант (4 мл) смешивали с 2 мл (объем слоя) носителя, сопряженного глутатионом («GE Healthcare», США), и инкубировали 30 мин при 4° при покачивании. Носитель промывали пять раз 10 мл фосфатного буфера (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ и 1,8 mM KH₂PO₄). Для удаления GST-тэга ~4 мг очищенного рекомбинантного белка инкубировали с 40 мкл (1 мкг/мл) фермента Factor Xa («GE Healthcare», Великобритания) при 22° 16 ч в 4 мл буфера для расщепления (50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl и 1 mM CaCl₂). Суспензию центри-

фугировали при 500 g 5 мин с тем, чтобы осадить носитель, и отбирали супернатант, содержащий очищенный белок и Factor Xa. Последний удаляли с помощью колонки HiTrap Benzamide FF (high sub) («GE Healthcare», Великобритания). Factor Xa остается на колонке, позволяя собрать чистый свободный от протеаз препарат белка в элюате. Раствор белка диализовали против 0,1 M KCl, pH 7,0, при 4° для удаления соли, после чего препарат лиофилизировали и использовали для дальнейших экспериментов.

Анализ тепловой денатурации проводили с использованием спектрополяриметра Jasco J-810 с пельтье-приставкой при скорости нагревания 1° в мин. Такая скорость обеспечивает достаточное время для достижения равновесия. Каждый образец нагревали от 20 до 85°, регистрируя изменения поглощения при 268 нм. Для построения каждой кривой теплового перехода регистрировали порядка 500 точек. Измерения повторяли, как минимум, трижды. Для анализа обратимости денатурации препарат белка немедленно охлаждали после нагревания. Анализ кривых перехода позволил вычислить T_m (среднюю точку кривой денатурации) и ΔH_m (изменение энтальпии при T_m) с помощью нелинейного метода наименьших квадратов согласно уравнению:

$$y(T) = \frac{y_N(T) + y_D(T) \exp[-\Delta H_m / R(1/T - 1/T_m)]}{1 + \exp[-\Delta H_m / R(1/T - 1/T_m)]}, \quad (1)$$

где $y(T)$ — оптическое свойство при температуре T (Кельвин), $y_N(T)$ и $y_D(T)$ — оптические свойства нативных и денатурированных молекул белка при T (К) соответственно, а R — газовая постоянная. При анализе кривой перехода было принято допущение, что зависимость оптических свойств нативных и денатурированных молекул белка описывает параболическая функция (т.е. $y_N(T) = a_N + b_N T + c_N T^2$ и $y_D(T) = a_D + b_D T + c_D T^2$, где a_N , b_N , c_N , a_D , b_D и c_D — коэффициенты, не зависящие от температуры). Графики зависимости ΔH_m от T_m при разных значениях pH позволили вычислить значение удельного теплопоглощения ΔC_p при постоянном давлении. Изменения свободной энергии Гиббса при температуре $T - \Delta G_D(T)$ оценивали с помощью уравнения Гиббса–Гельмгольца (уравнение 2) со значениями ΔH_m , T_m и ΔC_p

$$\Delta G_D(T) = \Delta H_m(T_m - T) - \Delta C_p \left[(T_m - T) + \ln T \left(\frac{T}{T_m} \right) \right]. \quad (2)$$

Анализ кругового дихроизма (КД). КД спектры регистрировали на спектрополяриметре Jasco J-810 с пельтье-приставкой с шестью нако-

пителями. Для регистрации спектра КД в дальней УФ области использовали перпараты белков с концентрацией 0,6 мг/мл. Измерения проводили в кюветах с длиной оптического пути 0,1 см. Перед измерениями препараты белков выдерживали в течение ночи в определенных условиях. Из полученных данных вычитали базовую линию. Все измерения проводили при 25°. Для калибровки инструмента использовали D-10-камфорсульфокислоту.

Анализ собственной флуоресценции. Спектр флуоресценции белковых препаратов регистрировали на спектрофлуориметре Perkin Elmer LS 55 в 3 мм кварцевых кюветах при ширине щели для возбуждения и эмиссии в 10 нм. Концентрация белка во всех экспериментах составила 10 μ M. Для анализа внутренней флуоресценции препараты возбуждали при 268 нм, тогда как спектр эмиссии регистрировали при длинах волн от 290 до 400 нм при 25°. Из всех полученных данных вычитали базовую линию. В экспериментах по связыванию 1-анилино-8-нафталенсульфоната (ANS) препараты возбуждали при длине волны 360 нм, а спектр эмиссии регистрировали при длинах волн от 400 до 600 нм. Концентрация ANS в 16 раз превышала концентрацию белка. Концентрацию ANS определяли экспериментально с учетом коэффициента молярной абсорбции ϵ , равного 5000 $M^{-1} cm^{-1}$ при 350 нм [19, 20], и фильтровали перед использованием для удаления нерастворимых частиц. Спектры регистрировали при 25° в спектролюминиметре Perkin Elmer LS-55 в 5 мм кварцевых кюветах при ширине щели для возбуждения и эмиссии в 10 нм при скорости сканирования 100 нм/мин. Спектры анализировали с учетом базовой линии.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для выяснения возможно ли, что РАН домены обладают разной термодинамической стабильностью, мы, прежде всего, проанализировали тепловую денатурацию всех трех РАН белков при различных значениях pH (6,3; 6,5; 6,8 и 7,0), анализируя изменения θ_{222} — разницы КД сигнала при длине волны 222 нм. Мы выбрали именно эти значения pH, поскольку pH в ядре чуть ниже 7,0, но выше 6,0. В настоящей работе pH 7,0 соответствует оптимальным физиологическим условиям. Все полученные кривые денатурации были обратимы. На рис. 1 представлены профили тепловой денатурации РАН1, РАН2 и РАН3 при различных значениях pH. Анализ кривых денатурации белков при разных значениях pH позволил вычислить ΔH_m и T_m с использованием нелинейного метода наименьших

квадратов, который подразумевает приведение всех данных о кривой перехода к уравнению (1) с 8 свободными параметрами (a_N , b_N , c_N , a_D , b_D , c_D , ΔH_m и T_m). Термодинамические параметры

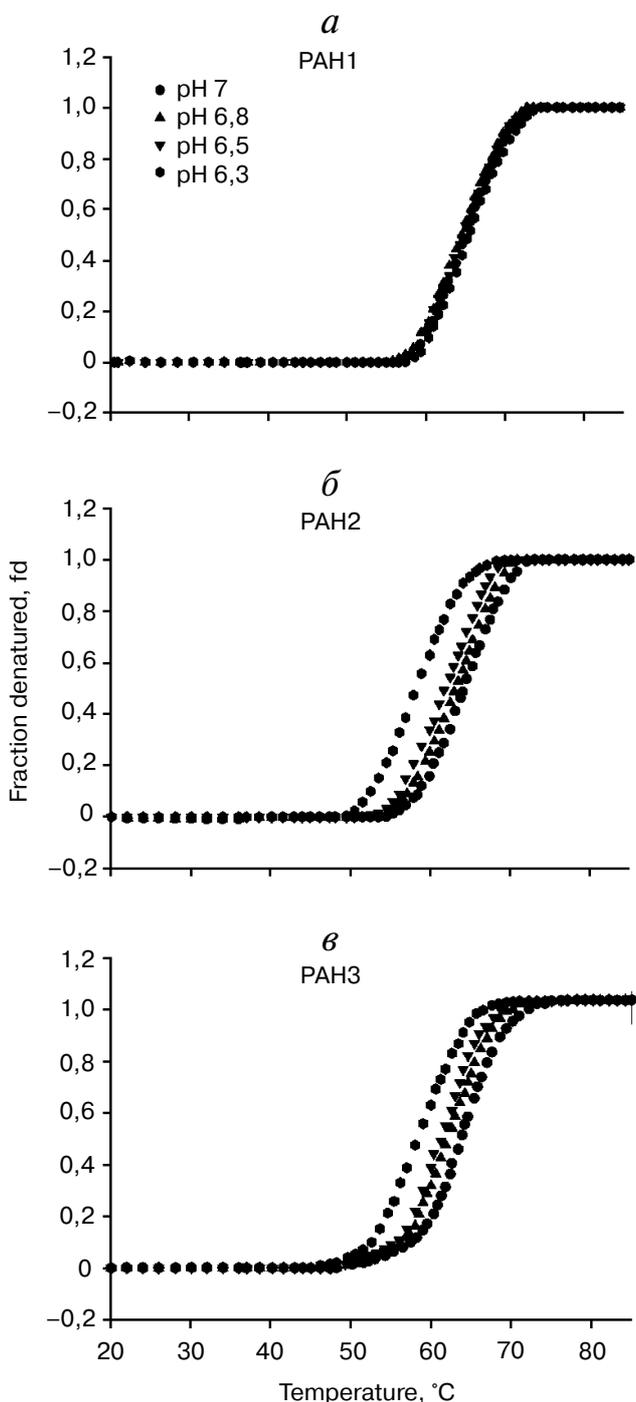


Рис. 1. Профили тепловой денатурации РАН1 (а), РАН2 (б) и РАН3 (в) при разных значениях рН (обозначения на рисунке)

(ΔH_m и T_m), полученные для различных значений рН, для всех белков приведены в табл. 1. Значения ΔC_p вычисляли путем построения зависимости ΔH_m от T_m при разных значениях рН. Значения ΔC_p для РАН2 и РАН3 составили 1,53 и 1,54 соответственно (табл. 1). Мы не смогли вычислить значение ΔC_p для РАН1, так как значительных изменений ΔH_m и T_m для данного белка при изменении рН зафиксировано не было. Поскольку для РАН2 и РАН3 были получены идентичные значения ΔC_p , для вычисления ΔG_D° РАН1 мы использовали это же значение ΔC_p . Величины ΔG_D° (значение ΔG_D при 25°), вычисленные для разных РАН доменов с использованием уравнения 2, также приведены в табл. 1. На рис. 2 представлены графики зависимости ΔT_m (T_m белка при рН 7,0 – T_m при других значениях рН) от рН (а, б, в) и графики зависимости $\Delta \Delta G_D^\circ$ (ΔG_D° белка при рН 7,0 – ΔG_D° белка при других значениях рН) от рН (г, д, е). Как видно из рис. 2, понижение рН не влияет на стабильность РАН1, однако снижает стабильность РАН2 и РАН3 с точки зрения T_m и ΔG_D° .

На следующем этапе мы проанализировали структурные варианты разных РАН доменов и оценили, насколько структурная целостность белков в нативном состоянии меняется в зависимости от рН. Для этого мы зарегистрировали КД спектр в области дальнего УФ (вторичная структура) каждого РАН домена белка hSin3B при различных значениях рН (рН 6,3; 6,5; 6,8 и 7,0). Как показано на рис. 3, изменение рН приводит к уменьшению структурированности РАН2 и РАН3, тогда как структура РАН1 не претерпевает значительных изменений. На рис. 4 (а, б, в) отражено влияние рН на третичную структуру различных РАН доменов как функцию окружения остатков тирозина. Из рисунка видно увеличение относительной интенсивности флуоресценции в случае доменов РАН2 и РАН3. В то же время значительных изменений относительной флуоресценции домена РАН1 при изменении рН не наблюдалось. Следует, однако, отметить, что максимум флуоресценции наблюдался при ~345 нм, что соответствует скорее пику триптофана, а не тирозину, максимум эмиссии которого приходится на ~310 нм. Ни один из РАН доменов не содержит остатков триптофана, согласно данным секвенирования и другой информации из литературы. Таким образом, наблюдаемый при ~345 нм пик обусловлен исключительно наличием остатков тирозина. Ранее сообщалось, что пик эмиссии многих белков, не содержащих остатков триптофана, а содержащих остатки тирозина, приходится на ~345 нм, что объясняется образованием тирозинатов. Скорее всего, тирозинаты образуются за

Таблица 1. Термодинамические параметры РАН доменов при разных значениях pH^{a,6}

pH	pH 7,0			pH 6,8			pH 6,5			pH 6,3			ΔC_p
	T_m	ΔH_m	ΔG_D°	T_m	ΔH_m	ΔG_D°	T_m	ΔH_m	ΔG_D°	T_m	H_m	ΔG_D°	
РАН1	65,7	140	12,9	65,3	133	12,0	65,5	136	12,4	65,2	131	11,7	1,53*
РАН2	64,0	119	10,2	62,2	116	9,6	60,3	113	9,0	57,5	109	8,2	1,53
РАН3	63,7	117	9,9	61,8	113	9,2	60,5	111	8,8	58,0	108	8,1	1,54

^a Единицы измерения T_m , H_m , ΔG_D° и ΔC_p – °, ккал/моль⁻¹, ккал/моль⁻¹ и ккал/моль⁻¹ соответственно.

⁶ Ошибки измерений T_m , H_m , ΔG_D° и ΔC_p составили 0,2–1%, 3–6%, 7–9% и 5–7% соответственно.

* Теоретическая величина, а не результат эксперимента (см. раздел «Обсуждение результатов» для более подробной информации).

счет межмолекулярного переноса протонов от одного или нескольких возбужденных остатков тирозина к подходящему акцептору протонов в полипептидной цепочке. Остатки аспарагиновой и глутаминовой кислот являются подходящими акцепторами протонов [20–23]. РАН1 и РАН3 содержат только один остаток тирозина, тогда как РАН2 содержит два остатка. Интересно, что все остатки тирозина, локализованные в соответствующих полипептидах, соседствуют либо расположены недалеко от остатков аспартата. Из рис. 4 (z, d, e) видно, что РАН1 и РАН3 домены не связываются с ANS, поскольку значительного увеличения интенсивности флуоресценции ANS и сдвига λ_{max} не наблюдается. Однако в случае РАН2 видно увеличение относительной флуоресценции ANS, не сопровождаемое, однако, сдвигом λ_{max} , что указывает на, возможно, слабое связывание с ANS. Полученные результаты свидетельствуют о том, что различные домены РАН, возможно, имеют различные конформационные вариации.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мы проанализировали различия термодинамической стабильности и структурные вариации различных РАН доменов белка hSin3B, а также исследовали, как на них влияет изменение pH. Термодинамическую стабильность трех РАН доменов оценивали путем мониторинга тепловой денатурации белков, анализируя изменения θ_{222} . ΔG_D° при определенных значениях pH вычисляли согласно уравнению (2) с известными значениями ΔH_m , T_m и ΔC_p . Однако такая оценка требует значительной экстраполяции. В связи с этим, при вычислении ΔG_D° можно получить большую ошибку за счет ошибок при оценке ΔH_m , T_m и ΔC_p . Для определения максималь-

ной и минимальной ошибок при вычислении ΔG_D° в определенных условиях мы использовали процедуру Бектель–Шельмана [24]. Эта процедура включает теоретическое вычисление ΔG_D° белков с учетом максимальных и минимальных ошибок параметров ΔH_m и ΔC_p (одно вычисление с максимальной ошибкой ΔH_m и минимальной ошибкой ΔC_p и другое вычисление с минимальной ошибкой ΔH_m и максимальной ошибкой ΔC_p), полученных из анализа индивидуальных кривых денатурации, и дает два разных значения ΔG_D° (одно минимальное и одно максимальное). В результате трех независимых измерений ΔH_m и T_m белка при определенном значении pH мы получили шесть значений ΔG_D° (три максимальных и три минимальных значений). Все шесть значений были использованы для определения среднего значения ΔG_D° и средней ошибки. Показано, что средняя ошибка при вычислении ΔG_D° составила от 7 до 9% для всех белков.

Как видно из табл. 1, при физиологических значениях pH домен РАН1 более стабилен, по сравнению с доменами РАН2 и РАН3 с точки зрения T_m и ΔG_D° белков. Однако стабильность всех РАН доменов оказалась различной при физиологических значениях pH и при значениях pH, характерных для ядра, поскольку значения T_m и ΔG_D° при pH 7,0 отличались от соответствующих значений при более низких значениях pH (табл. 1). Полученные данные указывают на то, что изменения pH могут регулировать структуру и стабильность РАН доменов. В связи с этим мы проанализировали влияние различных значений pH на РАН домены. Для этого были построены график зависимости ΔT_m от pH и график зависимости $\Delta \Delta G_D^\circ$ от pH (рис. 2). Как видно из рис. 2, для доменов РАН2 и РАН3 существует линейная зависимость стабильности белка от pH (с точки зрения ΔT_m и $\Delta \Delta G_D^\circ$); иными слова-

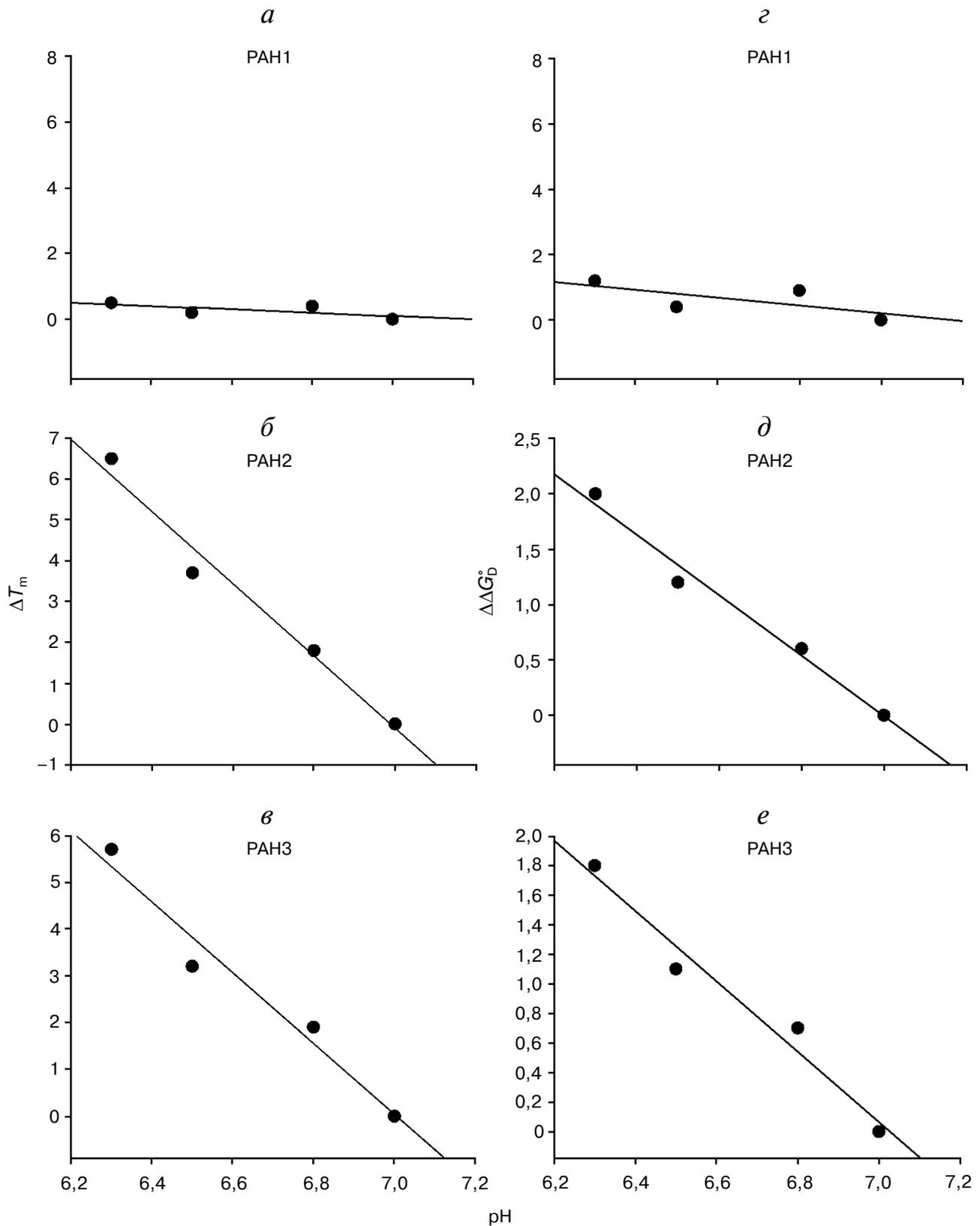


Рис. 2. Зависимость стабильности белков от pH. График зависимости ΔT_m от pH (a–c) и график зависимости $\Delta \Delta G_D^0$ от pH (d–f) для PAH1, PAH2 и PAH3 при pH 7,0; 6,8; 6,5 и 6,3

ми, стабильность белка уменьшается при снижении pH. Однако стабильность домена РАН1 от pH не зависит. Таким образом, стабильность

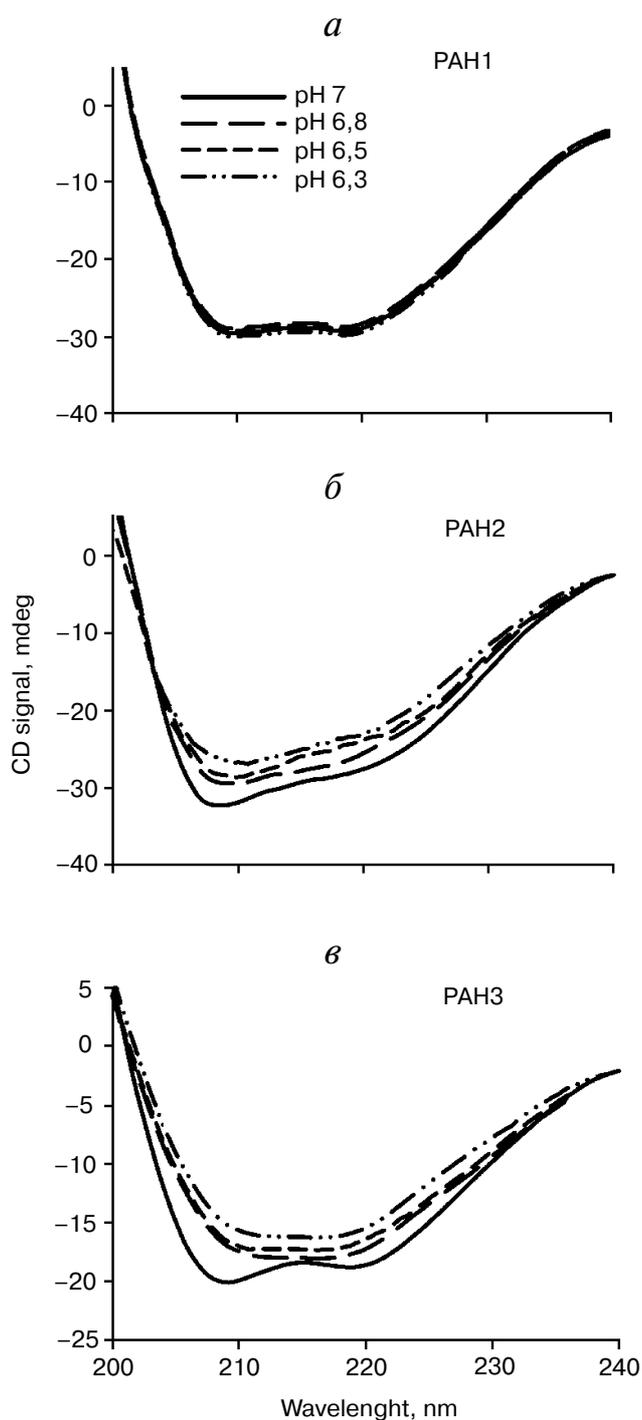


Рис. 3. Влияние pH на вторичную структуру различных РАН доменов. КД спектры в дальнем УФ (при 37°) РАН1 (а), РАН2 (б) и РАН3 (в) после ночи инкубации в буфере с соответствующим pH (указаны на рисунке)

белка не всегда является функцией pH для всех РАН доменов. Снижение стабильности белка при низких значениях pH в случае РАН2 и РАН3 может означать, что и структура этих доменов должна быть дестабилизирована. Для того чтобы исследовать эту возможность проанализировали вторичную и третичную структуры белков с помощью измерения КД спектров в области дальнего УФ (рис. 3) и флуоресценцию тирозина (рис. 4, а, б, в) соответственно. Из рисунков видно, что вторичная и третичная структуры РАН2 и РАН3 нарушаются при снижении pH. При этом, как и ожидалось, структура РАН1 при понижении pH остается без изменений. Таким образом, результаты термодинамических исследований совпадают с данными структурного анализа. Результаты четко показывают, что изменение pH может способствовать регуляции активности hSin3B. В поддержку нашего предположения говорит тот факт, что Sin3 был обнаружен не только в ядре, но и в цитоплазме и митохондриях [25–29]. Кроме того, в условиях стресса происходит перераспределение hSin3B между ядром и цитоплазмой (неопубликованные данные). Ранее было показано, что разница в значениях pH между ядром и цитоплазмой также играет роль во внутриклеточной локализации и движении различных белков между ядром и цитоплазмой [30]. Таким образом, регуляция структуры и функции белка за счет изменения pH, возможно, является глобальной стратегией для многих клеточных белков.

Поскольку Sin3B является ядерным белком, нам представлялось важным сравнить структуру и стабильность различных РАН доменов при значениях pH, соответствующих ядерному окружению. Значения ΔG_D^0 при различных значениях pH, приведенные в табл. 1, свидетельствуют о том, что из трех РАН доменов домен РАН1 является наиболее стабильным. Интересно, что стабильность РАН2 и РАН3 практически идентична при всех значениях pH. Мы проанализировали насколько сходство термодинамической стабильности соответствует сходным структурным свойствам доменов РАН2 и РАН3. В табл. 2 приведено сравнение структур трех РАН доменов при значениях pH, характерных для ядра. Из табл. 2 видно, что вторичная структура нарушается в большей степени у домена РАН2, по сравнению с РАН3, тогда как в домене РАН1 значительных изменений вторичной структуры при снижении pH вообще не наблюдалось. Аналогичные результаты были получены при анализе относительной флуоресценции тирозина: третичная структура домена РАН2 подвергается большим изменениям, чем структура домена РАН3, тогда как третичная структура РАН1 при

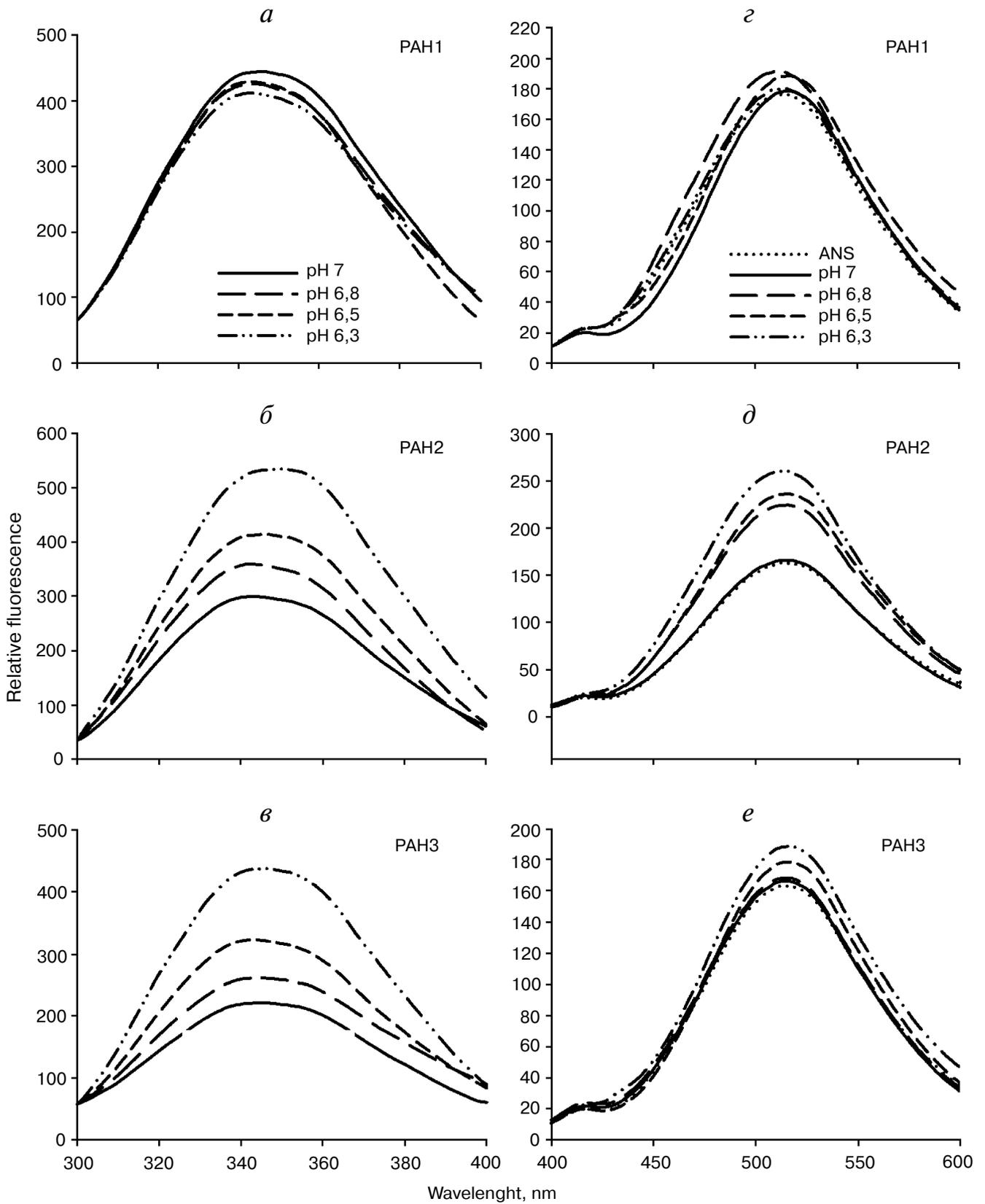


Рис. 4. Влияние pH на третичную структуру PAH доменов. Спектр собственной флуоресценции (a–c) и спектр ANS флуоресценции (d–f) PAH1, PAH2 и PAH3

Таблица 2. Влияние pH на структуру РАН доменов белка Sin3B человека (hSin3B)

pH	pH 6,8			pH 6,5			pH 6,3		
	% изменения (θ_{222})	% изменения (относительная флуоресценция)	% изменения связывания ANS	% изменения (θ_{222})	% изменения (относительная флуоресценция)	% изменения связывания ANS	% изменения (θ_{222})	% изменения (относительная флуоресценция)	% изменения связывания ANS
РАН1	2,3	4,4	8,1	1,1	3,9	6,7	1,6	7,8	2,1
РАН2	10	21	38	14	46	45	20	100	60
РАН3	9	17	2,9	11	37	9	18	96	15

Примечание. % изменения θ_{222} , изменения относительной флуоресценции и связывания ANS по отношению к соответствующим значениям при физиологических значениях pH.

снижении pH остается без изменений. Поскольку изменение pH оказывает влияние на вторичную и третичную структуры РАН доменов, мы предположили наличие незначительных отличий в их структуре. Ранее сообщалось, что дестабилизация третичной структуры приводит к экспозиции гидрофобных кластеров (которые были скрыты внутри) к растворителю [20]. Мы проанализировали наличие гидрофобных кластеров в РАН доменах с использованием теста на связывание ANS. Как видно из табл. 2, РАН1 и РАН3 не связываются с ANS. Однако, в случае РАН2, мы наблюдали увеличение интенсивности флуоресценции ANS, которое не сопровождалось сдвигом максимума эмиссии, свидетельствуя о слабом связывании. Полученные данные позволили нам предположить, что разные РАН домены при значениях pH, характерных для ядра, принимают разные конформации. По всей видимости, РАН1 обладает очень стабильной нативной структурой, так что небольшие изменения pH не нарушают его структурной целостности. Структура РАН2 и РАН3, напротив, довольно подвижна. Ранее было показано, что структурная подвижность и ориентация РАН доменов у Sin3B млекопитающих играет ключевую роль при выборе партнеров для связывания каждого из РАН доменов [5, 14, 15, 31]. Интересно отметить, что домен РАН1 человека, обладающий стабильной конформацией (по сравнению с РАН2 или РАН3), взаимодействует только с одним белком HCF-1. У низших организмов было выявлено только два партнера РАН1 домена – SMRTER у *S. cerevisiae* и Op1 у *Drosophila* [31]. Таким образом, похоже, что в ходе эволюции более низкая конформационная подвижность ограничила способность РАН1 связывать

другие белки из многочисленного пула транскрипционных факторов. При этом домены РАН2 и РАН3 человека, обладающие относительно подвижной структурой, способны связываться с большим количеством разнообразных партнеров [13]. Эти результаты в целом свидетельствуют о том, что разница в конформации нативной структуры или подвижность разных РАН доменов может приводить к тому, что домены связываются с разными партнерами.

Таким образом, наши исследования показали что (i) структура нативного состояния и стабильность разных РАН доменов отличается при значениях pH, характерных для ядра, при которых Sin3 активен. (ii) Структура и стабильность доменов РАН2 и РАН3 отличается при физиологических значениях pH и при значениях pH, характерных для ядра, тогда как структура РАН1 остается неизменной. Настоящее исследование указывает на важность структурной гетерогенности РАН доменов для привлечения или узнавания специфического набора партнеров для взаимодействия. Дальнейшие исследования должны быть направлены на анализ функциональной важности РАН1 в hSin3B, поскольку он обладает крайне стабильной нативной структурой.

Работа выполнена при финансовой поддержке Департамента научных и промышленных исследований Министерства науки и технологий Индии (File no.37 (1596/13/EMR-II)).

Т. Хасан и Л.Р. Сингх выражают благодарность Индийскому совету по медицинским исследованиям за финансовую поддержку (File No.3/1/3/JRF-2010/MBD-2 (33050)).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grzenda, A., Lomber, G., Zhang, J.-S., and Urrutia, R. (2009) Sin3: master scaffold and transcriptional corepressor, *Biochim. Biophys. Acta*, **1789**, 443–450.
2. Kadamb, R., Mittal, S., Bansal, N., Batra, H., and Saluja, D. (2013) Sin3: Insight into its transcription regulatory functions, *Eur. J. Cell Biol.*, **92**, 237–246.
3. McDonel, P., Costello, I., and Hendrich, B. (2009) Keeping things quiet: roles of NuRD and Sin3 co-repressor complexes during mammalian development, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **41**, 108–116.
4. Hassig, C.A., Fleischer, T.C., Billin, A.N., Schreiber, S.L., and Ayer, D.E. (1997) Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A, *Cell*, **89**, 341–347.
5. Le Guezennec, X., Vermeulen, M., and Stunnenberg, H.G. (2006) Molecular characterization of Sin3 PAH-domain interactor specificity and identification of PAH partners, *Nucleic Acids Res.*, **34**, 3929–3937.
6. Sahu, S.C., Swanson, K.A., Kang, R.S., Huang, K., Brubaker, K., Ratcliff, K., and Radhakrishnan, I. (2008) Conserved themes in target recognition by the PAH1 and PAH2 domains of the Sin3 transcriptional corepressor, *J. Mol. Biol.*, **375**, 1444–1456.
7. Ayer, D.E., Lawrence, Q.A., and Eisenman, R.N. (1995) Mad-Max transcriptional repression is mediated by ternary complex formation with mammalian homologs of yeast repressor Sin3, *Cell*, **80**, 767–776.
8. Yang, Q., Kong, Y., Rothermel, B., Garry, D.J., Bassel-Duby, R., and Williams, R.S. (2000) The winged-helix/forkhead protein myocyte nuclear factor beta (MNF-beta) forms a co-repressor complex with mammalian sin3B, *Biochem. J.*, **345**, 335–343.
9. Alland, L., Muhle, R., Hou, H., Potes, J., Chin, L., Schreiber-Agus, N., and DePinho, R.A. (1997) Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression, *Nature*, **387**, 49–55.
10. Rayman, J.B., Takahashi, Y., Indjeian, V.B., Dannenberg, J.-H., Catchpole, S., Watson, R.J., te Riele, H., and Dynlacht, B.D. (2002) E2F mediates cell cycle-dependent transcriptional repression *in vivo* by recruitment of an HDAC1/mSin3B corepressor complex, *Genes Dev.*, **16**, 933–947.
11. Spronk, C.A.E.M., Tessari, M., Kaan, A.M., Jansen, J.F.A., Vermeulen, M., Stunnenberg, H.G., and Vuister, G.W. (2000) The Mad1-Sin3B interaction involves a novel helical fold, *Nature Struct. Mol. Biol.*, **7**, 1100–1104.
12. Olsson, A., Olsson, I., and Dhanda, R.S. (2008) Transcriptional repression by leukaemia-associated ETO family members can be independent of oligomerization and coexpressed hSIN3B and N-CoR, *Biochim. Biophys. Acta*, **1779**, 590–598.
13. Silverstein, R.A., and Ekwall, K. (2005) Sin3: a flexible regulator of global gene expression and genome stability, *Curr. Genet.*, **47**, 1–17.
14. van Ingen, H., Baltussen, M.A.H., Aelen, J., and Vuister, G.W. (2006) Role of structural and dynamical plasticity in Sin3: the free PAH2 domain is a folded module in mSin3B, *J. Mol. Biol.*, **358**, 485–497.
15. Swanson, K.A., Knoepfler, P.S., Huang, K., Kang, R.S., Cowley, S.M., Laherty, C.D., Eisenman, R.N., and Radhakrishnan, I. (2004) HBP1 and Mad1 repressors bind the Sin3 corepressor PAH2 domain with opposite helical orientations, *Nature Struct. Mol. Biol.*, **11**, 738–746.
16. Kumar, G.S., Xie, T., Zhang, Y., and Radhakrishnan, I. (2011) Solution structure of the mSin3A PAH2-Pfl SID1 complex: a Mad1/Mxd1-like interaction disrupted by MRG15 in the Rpd3S/Sin3S complex, *J. Mol. Biol.*, **408**, 987–1000.
17. van Ingen, H., Lasonder, E., Jansen, J.F.A., Kaan, A.M., Spronk, C.A.E.M., Stunnenberg, H.G., and Vuister, G.W. (2004) Extension of the binding motif of the Sin3 interacting domain of the Mad family proteins, *Biochemistry*, **43**, 46–54.
18. Saluta, M., and Bell, P.A. (1998) Troubleshooting GST fusion protein expression in *E. coli*, *Life Sci. News*, **1**.
19. Marty, A., Boiret, M., and Deumie, M. (1986) How to illustrate ligand-protein binding in a class experiment: An elementary fluorescent assay, *J. Chem. Education*, **63**, 365.
20. Lakowicz, J.R. (2007) Principles of fluorescence spectroscopy, Springer.
21. Szabo, A.G., Lynn, K., Krajcarski, D., and Rayner, D.M. (1979) Tyrosine fluorescence at 345 nm in proteins lacking tryptophan, *J. Luminescence*, **18**, 582–586.
22. Szabo, A.G., Lynn, K.R., Krajcarski, D.T., and Rayner, D.M. (1978) Tyrosinate fluorescence maxima at 345 nm in proteins lacking tryptophan at pH 7, *FEBS Lett.*, **94**, 249–252.
23. Ruan, K., Li, J., Liang, R., Xu, C., Yu, Y., Lange, R., and Balny, C. (2002) A rare protein fluorescence behavior where the emission is dominated by tyrosine: case of the 33-kDa protein from spinach photosystem II, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **293**, 593–597.
24. Becktel, W.J., and Schellman, J.A. (1987) Protein stability curves, *Biopolymers*, **26**, 1859–1877.
25. Barnes, V.L., Strunk, B.S., Lee, I., Huttemann, M., and Pile, L.A. (2010) Loss of the SIN3 transcriptional corepressor results in aberrant mitochondrial function, *BMC Biochemistry*, **11**, 26.
26. Backues, S.K., Lynch-Day, M.A., and Klionsky, D.J. (2012) The Ume6-Sin3-Rpd3 complex regulates ATG8 transcription to control autophagosome size, *Autophagy*, **8**, 1835–1836.
27. Kong, Q., Zeng, W., Wu, J., Hu, W., Li, C., and Mao, B. (2010) RNF220, an E3 ubiquitin ligase that targets Sin3B for ubiquitination, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **393**, 708–713.
28. Khochbin, S., Verdel, A., Lemerrier, C., and Seigneurin-Berny, D. (2001) Functional significance of histone deacetylase diversity, *Curr. Opin. Genetics Dev.*, **11**, 162–166.
29. Vega, A.V., Avila, G., and Matthews, G. (2013) Interaction between the transcriptional corepressor Sin3B and voltage-gated sodium channels modulates functional channel expression, *Sci. Rep.*, **3**.
30. Cunningham, J., Estrella, V., Lloyd, M., Gillies, R., Frieden, B.R., and Gatenby, R. (2012) Intracellular electric field and pH optimize protein localization and movement, *PLoS One*, **7**, e36894.
31. Nomura, M., Uda-Tochio, H., Murai, K., Mori, N., and Nishimura, Y. (2005) The neural repressor NRSF/REST binds the PAH1 domain of the Sin3 corepressor by using its distinct short hydrophobic helix, *J. Mol. Biol.*, **354**, 903–915.

**pH MIGHT PLAY A ROLE IN REGULATING
THE FUNCTION OF PAH DOMAINS BY ALTERING
STRUCTURE AND THERMODYNAMIC STABILITY**

**Tauheed Hasan^{1#}, Mashook Ali^{1#}, Daman Saluja¹,
Laishram Rajendrakumar Singh^{1*}**

*University of Delhi, Dr. B. R. Ambedkar Center
for Biomedical Research, Delhi-110-007, India; fax: +91(11)276-66248,
E-mail: directoracbr@gmail.com, director@acbr.du.ac.in*

Received August 19, 2014
Revision received September 29, 2014

Human Sin3B (hSin3B), a transcription regulator, is a scaffold protein that binds to different transcription factors and regulates transcription. It consists of six conserved domains that include paired amphipathic helices (PAH 1–4), histone deacetylase interaction domain (HID), and the highly conserved region (HCR). Interestingly, the PAH domains of hSin3B are significantly homologous to one another, yet each interacts with a specific set of unique transcription factors. Although various interacting partners of PAH domains of hSin3B have been characterized, there has been no structural information available on the individual PAH domains of hSin3B. Here we characterize the structure and stability of different PAH domains of hSin3B at both nuclear and physiological pH values using different optical probes. We found that the native state structure and stability of different PAH domains are different at nuclear pH where hSin3B performs its biological function. We also found that PAH2 and PAH3 behave differently at both the nuclear and physiological pH in terms of native state structure and thermodynamic stability, while the structural identity of PAH1 remains unaltered at both pH values. Our study indicates that the structural heterogeneity of the different PAH domains might be responsible for having a unique set of interacting transcription factors.

Key words: protein structure, thermodynamic stability, circular dichroism, transcription regulator, scaffold protein