

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 577.323

Определение константы связывания фрагмента белка LANA с нуклеосомой

Р.В. Новиков^{1,2,†}, Е.А. Бондаренко^{1,†} , Н.В. Малюченко¹, А.В. Феофанов^{1,3},
В.М. Студитский^{1,4}, А.К. Шайтан^{1,2,*} 

¹Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

²Научно-технологический университет «Сириус», Россия, 354340, г. Сочи, ул. Олимпийская, д. 1;

³Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10;

⁴Cancer Epigenetics Program, Fox Chase Cancer Center, Cottman Avenue 333, Philadelphia, PA 19111, USA

*e-mail: shaytan_ak@mail.bio.msu.ru

†равноценный вклад

На поверхности нуклеосомы существует множество сайтов для взаимодействия с белками хроматина, среди которых выделяется кислотный лоскут – отрицательно заряженный участок, образованный боковыми цепями аминокислот гистонового димера H2A/H2B. Кислотный лоскут рассматривается как мишень для противораковых лекарств, а также является местом воздействия некоторых патогенов. Так, было показано, что этот регион является местом связывания белка LANA герпесвируса человека 8 типа и выполняет связующую роль между эписомами вируса и митотическими хромосомами. Развитие методов анализа взаимодействий различных соединений с нуклеосомой необходимо как для понимания механизмов регуляции хроматина, так и для дизайна лекарственных агентов. В настоящей работе предложена методика и проведены измерения константы связывания фрагмента белка LANA с нуклеосомой. В отличие от предыдущих работ измерения проведены при физиологической концентрации соли в буферном растворе. Предложенная методика основана на детекции сигнала флуоресцентно-меченых пептидов после разделения комплексов нуклеосом с пептидами методом гель-электрофореза. В работе также обсуждаются математические модели для анализа взаимодействия между пептидами и нуклеосомой, а также возможные факторы, способные влиять на него.

Ключевые слова: нуклеосома, LANA, константа связывания, гель-электрофорез, кислотный лоскут, уравнение Хилла

У эукариотических организмов геном организован в виде хроматина, наименьшей структурной единицей которого является нуклеосома. Это повторяющийся элемент хроматина, состоящий из сегмента ДНК длиной около 200 пар нуклеотидов, центральная область (длиной 146–147 п.н.) которого закручена в левую суперспираль вокруг белкового октамера, состоящего из гистонов H3, H4, H2A, H2B. На поверхности нуклеосомы существует множество областей, через которые осуществляются взаимодействия нуклеосом с белками хроматина, которые в свою очередь обеспечивают тонкую и сложную регуляцию функционирования хроматина посредством изменения динамических свойств нуклеосомы [1, 2]. Среди всех областей выделяется кислотный лоскут – участок на поверхности гистонового димера H2A/H2B, который, в отличие от остальной

поверхности нуклеосомы, несет отрицательный заряд [3]. По результатам исследований было показано, что не только белки хроматина взаимодействуют с этим участком, но и некоторые вирусы способны использовать эти взаимодействия для позиционирования генетического материала на поверхности нуклеосомы. Одним из таких вирусов является герпесвирус человека 8 типа, играющий этиологическую роль при саркоме Капоши (KSHV). Прикрепление эписом вируса KSHV к митотическим хромосомам инфицированных клеток происходит благодаря взаимодействию белка LANA (latency associated nuclear antigen) с кислотным лоскутом, а именно – N-концевой последовательности белка длиной 22 аминокислотных остатка (пептида LANA) [4]. Также область кислотного лоскута представляет собой мишень для терапевтических агентов противора-

ковой терапии и нуклеосом-связывающих патогенов [5]. В связи с этим, важно изучать взаимодействия кислотного лоскута с различными соединениями, в том числе и с пептидами, а также необходимо оптимизировать методы анализа этих взаимодействий. Важность такой оптимизации подчеркивается тем, что в разных работах измеренная константа диссоциации комплексов пептида LANA с нуклеосомой значительно различается: 200 нМ по данным спектрофотометрического анализа [6], и 8 мкМ – по данным метода гель-электрофореза [7]. Таким образом, константа диссоциации комплекса пептида LANA с нуклеосомой остается недостаточно охарактеризованной. В данной статье мы уточнили эту константу, апробировав способ анализа взаимодействия пептидов с нуклеосомой, основанный на методе гель-электрофореза с применением флуоресцентно-меченных пептидов, при физиологической концентрации ионов в растворе. Кроме того, обсуждаются математические принципы анализа взаимодействия между пептидом LANA и нуклеосомой, а также возможные факторы, которые могут на него влиять.

Материалы и методы

Приготовление моноклеосом и пептида LANA. Были получены моноклеосомы, реконструированные по ранее опубликованной методике [8] с использованием ДНК-матрицы, имеющей нуклеосом-позиционирующую последовательность s603 (147 п.н.) [9], и октамера рекомбинантных гистонов из *Xenopus laevis*. Используемая ДНК-матрица на 5'-конце содержала флуорофор FAM. Пептид LANA, меченный флуорофором циановым 5 (Cy5) по N-концу, был синтезирован компанией GenScript (США).

Обработка пробирок. Для снижения адгезии пептида LANA на стенках пробирок проводилась предварительная обработка пробирок буфером, содержащим Tris-HCl (20 мМ), KCl (150 мМ), 2-меркаптоэтанол (1 мМ), 0,1% БСА и раствор пептида в концентрации в 10 раз меньшей, чем концентрация пептида, используемая для анализа его связывания с нуклеосомой (см. следующий пункт). Предварительная инкубация производилась в течение 10 мин, затем раствор отбирался полностью.

Приготовление комплекса пептида LANA с нуклеосомой и его анализ. Пептид LANA в возрастающей концентрации (2–20 мкМ с шагом 2 мкМ) инкубировали с 57 нМ моноклеосом в реакционном буфере (Tris-HCl 20 мМ, KCl 150 мМ, 2-меркаптоэтанол 1 мМ) в течение 2 ч. Для отделения комплексов с нуклеосомами от свободного пептида и иных примесей использовали метод гель-электрофореза в 6%-ном нативном полиакриламидном геле при 140 В в течение

40–50 мин. Получаемый гель анализировали на приборе PharosFXTM Plus Molecular Imager (BioRad, США).

Обработка данных. Для определения константы диссоциации флуоресценцию в геле возбуждали светом длиной волны 635 нМ и регистрировали при длине волны 695 нм, а для визуализации нуклеосом, меченных флуорофором FAM, флуоресценцию возбуждали светом длиной волны 488 нм и регистрировали при длине волны 530 нм. Денситометрию обнаруженных в геле полос выполняли с использованием программы ImageJ (NIH, США) [10]. Нормировку и обработку данных проводили с помощью программных кодов, написанных на языке Python с использованием пакета SciPy [11]. Аппроксимацию экспериментальных данных выполняли с использованием уравнения Хилла:

$$\theta = \frac{[P]^n}{[P]^n + K_d^n}, \quad (1)$$

где θ – средняя доля сайтов связывания на поверхности нуклеосом, занятая пептидом; $[P]$ – концентрация пептида; K_d – микроскопическая константа диссоциации – концентрация пептида, при которой половина сайтов связывания занята пептидом (у нуклеосомы два сайта связывания пептида); n – коэффициент Хилла. Также использовалась модификация уравнения Хилла с учетом количества пептида, расходующегося на неспецифические взаимодействия:

$$\theta = \frac{1}{1 + \left(\frac{K_d}{[P - P_0]} \right)^n}, \quad (2)$$

где P_0 – количество адсорбирующегося пептида.

Результаты и обсуждение

Для измерения константы связывания нами был выбран метод, заключающийся в инкубировании нуклеосом с флуоресцентно-мечеными пептидами с последующим анализом образующихся комплексов методом нативного гель-электрофореза.

Были реконструированы модельные моноклеосомы на основе ДНК-матрицы длиной 147 п.н., меченной флуорофором FAM. Чистота использованного пептида была определена методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и составила 76,5%. Далее нуклеосомы в концентрации 57 нМ инкубировали в присутствии различных концентраций пептида LANA, несущего флуорофор Cy5 (см. Материалы и методы). После инкубации смесь была проанализирована с помощью метода гель-электрофореза и получены флуоресцентные изображения гелей в спектральных диапазонах (каналах), соответствующих меткам FAM и Cy5 (рисунок 1А).

На изображениях видно, что при увеличении концентрации пептида LANA интенсивность сигнала в Су5-канале в полосе нуклеосом увеличивалась. Это свидетельствует об образовании комплексов между пептидами и нуклеосомами. Отрицательно заряженные нуклеосомы мигрируют в геле с положительно заряженным пептидом LANA, в то время как свободный пептид остается

на старте геля. Нами также были проведены измерения при концентрации нуклеосом в реакционной смеси, равной 115 нМ (данные не показаны). В этом случае мы не наблюдали вхождение нуклеосом в гель. Данное явление может объясняться неспецифической агрегацией и образованием физического геля между нуклеосомами и пептидами при повышенной концентрации нуклеосом.

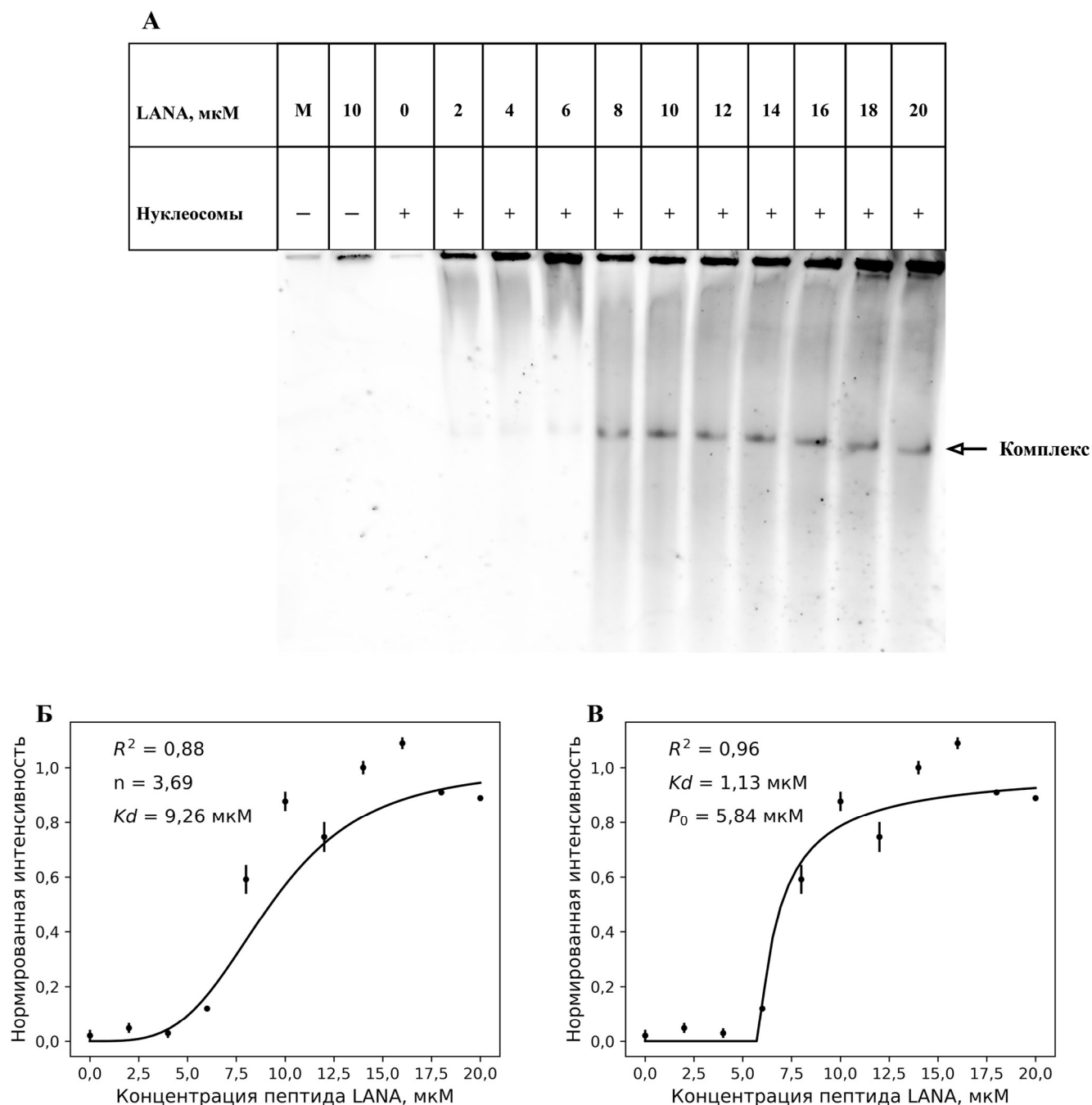


Рисунок. Анализ комплекса пептида LANA с нуклеосомой методом геля-электрофореза. **А** – Электрофореграммы свободного пептида LANA в концентрации 10 мкМ (вторая дорожка), свободных нуклеосом (57 нМ, третья дорожка) и комплексов пептида LANA (2–20 мкМ с шагом 2 мкМ) с нуклеосомами (4–13 дорожка). Разделение проводили в 6%-ном полиакриламидном геле. Детекция по флуоресценции Су5 в составе пептида LANA; М – меченые маркеры ДНК (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, США, первая дорожка). **Б** – Зависимость нормированной интенсивности флуоресценции комплекса пептида LANA с нуклеосомой от концентрации пептида. Данные нормированы и аппроксимированы с использованием уравнения Хилла (1). **В** – Зависимость нормированной интенсивности флуоресценции комплекса пептида LANA с нуклеосомой от концентрации пептида. Данные нормированы и аппроксимированы с использованием модифицированного уравнения Хилла (2).

При анализе результатов мы использовали различные математические модели. Во всех случаях измерялся сигнал Су5 как функция от концентрации пептида. Согласно уравнению Хилла, в этом случае интенсивность сигнала будет пропорциональна:

$$I([P]) \sim \theta([P]) [N]k,$$

где I – сигнал Су5, $[M]$ – концентрация нуклеосом, k – количество сайтов связывания на нуклеосоме. В нашем эксперименте концентрация нуклеосом и количество сайтов связывания k являлись фиксированными, поэтому нормированная на максимум интенсивность сигнала может быть аппроксимирована оригинальным уравнением Хилла (1). Это справедливо, так как приближение работает при любых значениях коэффициента Хилла и все данные были нормированы на максимальное значение интенсивности сигнала.

Первая модель представляла собой классическое уравнение Хилла (1). В рамках данной модели была проведена аппроксимация константы связывания и коэффициента Хилла. K_d составила 9,26 мкМ, $n = 3,69$, для оценки совпадения модели с данными использовался коэффициент детерминации (R^2), который для данной модели составил 0,88 (рисунок 1Б). Такое большое значение коэффициента Хилла обычно объясняют наличием более трех сайтов связывания и высокой кооперативностью взаимодействия. Однако известно, что на поверхности нуклеосомы расположены всего два сайта для связывания пептида. Это ставит под сомнение наблюдаемую высокую кооперативность взаимодействия (даже при взаимодействии гемоглобина с кислородом коэффициент Хилла составляет от 1,7 до 3,2 [12]). Для наличия кооперативности необходимы достаточно сложные механизмы, а с точки зрения электростатических взаимодействий связывание положительно заряженных пептидов рядом друг с другом должно приводить к кооперативности с $n < 1$. Поэтому в качестве альтернативной гипотезы может быть рассмотрена возможность неспецифического взаимодействия пептида с нуклеосомной ДНК. В то же время, ранее проводились соответствующие измерения и было показано, что пептид не взаимодействует с ДНК [13]. Нами было выдвинуто предположение, что пептид мог расходоваться на неспецифическую адсорбцию во время инкуба-

ции с нуклеосомами, и для учета этого явления была произведена модификация уравнения Хилла (2). В рамках данной модели была выполнена аппроксимация константы диссоциации и количества пептида, расходуемого на адсорбцию (исходили из приближения, что на адсорбцию всегда расходуется одинаковое количество пептида). Для этой модели при $n = 1$ получили $K_d = 1,13$ мкМ, $P_0 = 5,84$ мкМ, $R^2 = 0,96$ (рисунок 1В). Как видно, данная модель позволила аппроксимировать результаты со значительно лучшим коэффициентом детерминации. Получившиеся результаты отличаются от данных, приведенных в других работах [6, 7], что может объясняться использованием в нашем исследовании буфера с более высокой концентрацией соли (Tris-HCl 20 мМ, KCl 150 мМ), содержащего ионы калия, а не натрия, что ближе к физиологическим условиям. В присутствии ионов калия структура нуклеосом может меняться по сравнению с их структурой в растворах, содержащих ионы натрия [14]. Увеличение же концентрации соли влечет за собой увеличение ионной силы раствора, которая, в свою очередь, может влиять на величину константы диссоциации комплексов путем создания ионной шубы на поверхности пептида и сайта связывания, так как известно, что растворитель и ионы пронизывают структуру нуклеосомы, в том числе образуют области повышенной концентрации около кислотного лоскута [15].

Таким образом, в данной статье нами представлена оригинальная методика измерения константы связывания пептидов с нуклеосомой, основанная на методе гель-электрофореза в условиях, близких к физиологическим. Измеренная в этих условиях константа диссоциации, на наш взгляд, более корректно отражает способность пептида LANA взаимодействовать с кислотным лоскутом нуклеосом и является отправной точкой для дальнейших исследований и дизайна терапевтических пептидов, обладающих заданной аффинностью к поверхности нуклеосомы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №19-74-30003). Исследование проведено без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Horn V., Ingen van H. Recognition of nucleosomes by chromatin factors: lessons from data-driven docking-based structures of nucleosome-protein complexes // *Chromatin and Epigenetics* / Eds. C. Logie and T.A. Knoch. IntechOpen, 2018. DOI: 10.5772/intechopen.81016.

2. Armeev G.A., Gribkova A.K., Pospelova I., Komarova G.A., Shaytan A.K. Linking chromatin composition and

structural dynamics at the nucleosome level // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2019. Vol. 56. P. 46–55.

3. Kalashnikova A.A., Porter-Goff M.E., Muthurajan U.M., Luger K., Hansen J.C. The role of the nucleosome acidic patch in modulating higher order chromatin structure // *J. R. Soc. Interface.* 2013. Vol. 10. N 82: 20121022

4. Barbera A.J., Chodaparambil J.V., Kelley-Clarke B., Joukov V., Walter J.C., Luger K., Kaye K.M. The nucleosomal

surface as a docking station for Kaposi's sarcoma herpesvirus LANA // *Science*. 2006. Vol. 311. N 5762. P. 856–861.

5. Adhireksan Z., Palermo G., Riedel T., Ma Z., Muhammad R., Rothlisberger U., Dyson P.J., Davey C.A. Allosteric cross-talk in chromatin can mediate drug-drug synergy: 1 // *Nat. Commun.* 2017. Vol. 8. N 1: 14860.

6. Beauchemin C., Moerke N.J., Faloon P., Kaye K.M. Assay development and high-throughput screening for inhibitors of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus N-terminal latency-associated nuclear antigen binding to nucleosomes // *J. Biomol. Screen.* 2014. Vol. 19. N 6. P. 947–958.

7. Teles K., Fernandes V., Silva I., Leite M., Grisolia C., Lobbia V.R., van Ingen H., Honorato R., Lopes-de-Oliveira P., Treptow W., Santos G. Nucleosome binding peptide presents laudable biophysical and in vivo effects // *Biomed. Pharmacother.* 2020. Vol. 121: 109678.

8. Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Bondarenko V.A., Studitsky V.M. Preparation and analysis of uniquely positioned mononucleosomes // *Chromatin Protocols. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 523 / Ed. S. Chellappan. Clifton: Humana Press, 2009. P. 109–123.

9. Lowary P.T., Widom J. New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning // *J. Mol. Biol.* 1998. Vol. 276. N 1. P. 19–42.

10. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., et al. Fiji: an open-source platform for biological-image

analysis // *Nat. Methods*. 2012. Vol. 9. N 7. P. 676–682.

11. Millman K.J., Aivazis M. Python for scientists and engineers // *Comput. Sci. Eng.* 2011. Vol. 13. N 2. P. 9–12.

12. Weiss J.N. The Hill equation revisited: uses and misuses // *FASEB J.* 1997. Vol. 11. N 11. P. 835–841.

13. Chodaparambil J.V., Barbera A.J., Lu X., Kaye K.M., Hansen J.C., Luger K. A charged and contoured surface on the nucleosome regulates chromatin compaction: 11 // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007. Vol. 14. N 11. P. 1105–1107.

14. Lyubitelev A.V., Kudryashova K.S., Mikhaylova M.S., Malyuchenko N.V., Chertkov O.V., Studitsky V.M., Feofanov A.V., Kirpichnikov M.P. Change in linker DNA conformation upon histone H1.5 binding to nucleosome: Fluorescent microscopy of single complexes // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol. 71. N 2. P. 108–113.

15. Shaytan A.K., Armeev G.A., Goncarencu A., Zhurkin V.B., Landsman D., Panchenko A.R. Coupling between histone conformations and DNA geometry in nucleosomes on a microsecond timescale: atomistic insights into nucleosome functions // *J. Mol. Biol.* 2016. Vol. 428. N 1. P. 221–237.

Поступила в редакцию 05.08.2020 г.

После доработки 07.10.2020 г.

Принята в печать 14.10.2020 г.

SHORT COMMUNICATION

Determination of the binding constant of LANA protein fragment with nucleosome

R.V. Novikov^{1,2,†}, E.A. Bondarenko^{1,†} , N.V. Malyuchenko¹, A.V. Feofanov^{1,3}, V.M. Studitsky^{1,4}, A.K. Shaytan^{1,2,*} 

¹Bioengineering Department, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²“Sirius” Science and Technology University, Olympic str., 1, Sochi, 354340, Russia;

³Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Miklukho-Maklaya ul. 16/10, Moscow, 117997, Russia;

⁴Cancer Epigenetics Program, Fox Chase Cancer Center; Cottman Avenue 333, Philadelphia, PA 19111, USA

*e-mail: shaytan_ak@mail.bio.msu.ru

†contributed equally

On the surface of the nucleosome, there are many regions for interaction with chromatin proteins, but an acidic patch, a negatively charged region formed by the residues of the histone H2A/H2B dimer, is especially prominent. The acidic patch is a target for anti-cancer drugs and interaction locus for various pathogens. For instance, it was shown that this region is the binding site of the LANA protein of human gammaherpesvirus 8 and tethers the virus episomes to mitotic chromosomes. The development of methods for analyzing the binding of various compounds to nucleosomes is necessary both for understanding the mechanisms of chromatin regulation and for the therapeutic agents design. In this work, we propose a technique and measure the binding constant of the LANA

protein fragment to nucleosome. In contrast to previous studies, the measurements were carried out at a physiological salt concentration in the buffer solution. The proposed technique is based on the signal detection from the fluorescently labeled peptides after the separation of complexes of nucleosomes with peptides by gel electrophoresis. The paper also discusses mathematical models for analyzing the interaction between peptides and nucleosome and possible factors that can affect it.

Keywords: *nucleosome, LANA, binding constant, gel electrophoresis, acidic patch, Hill equation*

Сведения об авторах

Новиков Роман Вячеславович – студент кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: novikov.roman.2017@post.bio.msu.ru

Бондаренко Елена Александровна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: el.bondarenko@gmail.com; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5009-0863>

Малюченко Наталия Валериевна – канд. биол. наук, доц. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-00-05; e-mail: mal_nat@mail.ru

Феофанов Алексей Валерьевич – докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ, руководитель лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: avfeofanov@yandex.ru

Студитский Василий Михайлович – докт. биол. наук, гл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ, руководитель лаборатории эпигенетики рака Центра исследований рака Фокс Чейз, Филадельфия, США. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu

Шайтан Алексей Константинович – канд. физ-мат. наук, вед. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: shaytan_ak@mail.bio.msu.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0312-938X>