



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

VI. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2025eko maiatzaren 28, 29 eta 30a
Bilbo, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 4.0

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Berezko desordenaren funtzioa
CBP/p300 eta Miokardinaren
arteko elkarrekintzan**

*Maddi Olaetxea Usabiaga,
Matthew Fishman, Holly Spencer
eta Steven Smith*

267-274 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.vi.05.33>

ANTOLATZAILEA



BABESLEAK



EUSKO JAURLARITZA
GOBIERNO VASCO



LAGUNTZAILEAK



Berezko desordenaren funtzioa CBP/p300 eta Miokardinarekin arteko elkarrekintzan

Maddi Olaetxea Usabiaga (1), Matthew Fishman (2), Holly Spencer (2), Steven Smith (2)

(1) Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa

(2) Department of Biomedical and Molecular Sciences, Queen's University, Kingston, ON, Kanada
molaetxea004@ikasle.ehu.eus

Laburpena

Intrintsekoki desordenatutako proteinek ez dute egitura tridimentsional finkorik eta horrek aukera ematen die lotura-bikote desberdinekin elkarrengaitzeko; ezaugarri hau bereziki garrantzitsua da seinalizazio eta gene-erregulazio prozesuetan. CBP/p300 azetil-transferasa koaktibatzaile nabarmena da eta transkripzio faktoreekin elkarrengaitzen du, sarritan haien transaktibazio-domeinuetan dauden Φ -X-X- Φ - Φ motibo desordenatuak identifikatuz. Miokardina berriz, bihotzeko eta muskulu leun baskularreko zelulen desberdintzapenean funtsezko transkripzio faktorea da. Ikerketek erakutsi dute CBP/p300ekin elkarrengaitzen duela eta zantzuak daude elkarrekintza hori miokardinarekin bi transaktibazio-domeinuetako motibo desordenatuen bidez gertatzen dela iradokitzeko.

Hitz gakoak: Intrintsekoki desordenatutako proteinak/erregioak (IDP/IDR), CREB proteina lotzailea (CBP), Miokardina (MYOCD), Φ -X-X- Φ - Φ motiboa, titrazio bidezko kalorimetria isotermoa (ITC)

Abstract

Intrinsically disordered proteins lack a stable structure and hence can interact with multiple partners, a property critical for signaling and gene regulation. CBP/p300, a central acetyltransferase coactivator, interacts with transcription factors employing its structured motifs, generally identifying disordered Φ -X-X- Φ - Φ motifs in their transactivation domains. Myocardin, a critical TF for cardiac and vascular smooth muscle differentiation, is thought to bind to CBP/p300 via two such motifs.

Keywords: Intrinsically disordered proteins/regions (IDP/IDR), CREB binding protein (CBP/p300), Myocardin (MYOCD), Φ -X-X- Φ - Φ motif, isothermal titration calorimetry (ITC)

1. Sarrera

Historikoki onartu da proteina-funtzio dogma, non proteinek haien funtzioa betetzeko hiru dimentsiotako egitura bakar bat hartzen dutela baieztatzen den (Babu *et al.*, 2012). Hala ere azken urteotan sortutako desorden-funtzio paradigmak ikuspegi klasikoa irauli du haien funtzioa betetzeko egitura finkorik ez duten proteinen aurkikuntzarekin. Proteina hauek erakusten duten malgutasun konformazionala dela eta berez edo intrintsekoki desordenatutako proteina (IDP) izena eman zaie (Pinet *et al.*, 2021). Kasu batzuetan, proteina osoa desordenatua izan gabe, proteinaren eskualde zehatz batzuek soilik falta dute estruktura definitu bat eta hala ere, beraien funtzioa betetzeko gai dira. Proteinaren segmentu hauei intrintsekoki desordenatutako erregio (IDR) deritze.

Proteina edo erregio zehatz batek egitura ordenatu edo desordenatu bat hartzeko probabilitatea amino azido sekuentzian kodetuta dago (Dunker *et al.*, 2001). Aminoazido hondar batzuk ugariak dira IDP edo IDRetan, beste batzuk aldiz oso gutxitan ageri dira. IDP/IDRen ezaugarri den egitura malgu eta desestrukturatua hondar hidrofobiko handien (Leu, Phe, Trp...) ausentziaren ondorioz ematen da, hauek tipikoki proteinari egitura ematen dion nukleo hidrofobikoa sortzea baitakarte. Aldi berean, aipatutako proteinek aminoazido polarren kopuru handia erakusten dute (Arg, Asn, Gln, Glu...), hauek ingurune urtsuarekin elkarrekintzak faboratzen baitituzte. Glizina eta Prolina hondarrak ere ohikoak dira eta proteinen izaera luzatu eta malguari laguntzen diote (Williams *et al.*, 2001). Aminoazido-sekuentzia zehatzak zehaztuko du finean IDP/IDR-ak desegituratuta jarraituko duen ala tokiko egitura ordenatu bat (adibidez helikoidala) har dezakeen zenbait baldintzatan, hala nola,

lotura-bikote baten presentzian (Mukhopadhyay *et al.*, 2020). Interesgarria da proteinen egitura-desordenatuaren proportzioa nola igo den genomaren konplexutasunarekin batera: arkeoetan eta bakterioetan ~%2 ingurukoa da, baina eukariotoetan proteinen %33k gutxienez IDR funtzionalki garrantzitsu bat dute. Joera honek egitura-desordena ezinbestekoa dela iradokitzen du seinaleztapen bide konplexuen funtzionamendurako (Ward *et al.*, 2004).

IDP/IDRen egitura malguak gaitasuna ematen die zelula-konpartimentu ezberdinetan funtzionatzeko eta baldintza aldakorretara egokitzeko, hala nola ioi-gradienteen eta pH-aren aldaketetara (Berlow *et al.*, 2015). Baldintza jakin batzuetan edo lotura-bikote espezifikoekin elkarrekitean, desordenetik konformazio ordenatu desberdinetara igaro daitezke, “toleste indutua” bezala ezagutzen den prozesua emanez (Strodel *et al.*, 2021). Konformazio desberdin asko hartzeak, funtzio biologiko anitz burutzeko aukera ematen die. Dinamismo horri esker, helburu-ligandoak oso azkar ezagutu ditzakete eta seinaleztapenean eta molekulen aitortzan funtsezkoak diren aldi baterako loturak ahalbidetu ditzakete (Robustelli *et al.*, 2020). Hala ere hartzen dituzten konformazioak eta ondorioz lotura-bikoteekiko afinitatea jasaten dituzten aldaketa post-transkripzionalen menpe dago (fosforilazioak, azetilazioak, ubiquitinazioak...).

Ezaugarri hauek nabarmen erakusten dituen proteina-klase bat transkripzio faktoreak (TF) dira, askotan IDP-ak izanik edo IDR-ak barneratuz. Egitura-malgu honek haien funtzio erregulatzailerik azkar eta moldakorrari laguntzen dio, gene-adierazpenaren kontrolean funtsezkoak baitira (Brodsky *et al.*, 2020).

2. Arloko egoera

p53 TF garrantzitsu bat da, ADNaren kalteekiko zelularen erantzuna erregulatuz jarduera tumore-supresorea duena. Bere egitura nagusiki desordenatua bada ere, toleste indutua gertatzen da; amino-muturreko bi transaktibazio-domeinuek (TAD) beraien lotura-bikoteekin elkarrekiteko egitura desordenatua izatetik ordenatu bat izatera pasatzen dira (Denis *et al.*, 2014). Esanguratsua da fenomeno hau jasaten duten TAD domeinu gehienek gauza amankomun bat dutela: IDR den Φ -X-X- Φ - Φ motibo anfipatikoa (Φ hondar hidrofobo handia eta X edozein aminoazido izanik). p53 TFen Φ -X-X- Φ - Φ motiboekin elkarrekitean duen proteina bat *CREB-binding protein* (CBP) eta bere paralogoak den p300 dira, aurrerantzean CBP/p300 bezala izendatuko direnak (Dyson *et al.*, 2016).

CBP/p300 funtsezko koaktibatzailea da, eta transkripzioa aktibatuz zelulen garapena eta desberdintzapena erregulatzen ditu. Horretarako, hainbat transkripzio faktoreekin elkarrekitean du, kromatina eraldatuz gene adierazpena erregulatzeko. Erregulazio horren desorekak gaixotasunen agerpena eta progresioa eragiten du, hala nola onkogenesia (Zhu *et al.*, 2023). Egitura mailan, CBP/p300 proteina handi eta multimodularra da, zazpi domeinu globular dituen. Horien artean, TAZ1, TAZ2 eta KIX proteina-proteina elkarrekintza domeinuak (Φ -X-X- Φ - Φ motiboa duten transkripzio faktoreen lotura-eremu nagusiak), nukleo-koaktibatzaile lotura domeinua (NCBD) eta azetil transferasa (HAT) domeinua nabarmentzen dira, guztiak IDR interdomeinuz lotuak (1A. irudia; Wan *et al.*, 2013).

Domeinu hauei esker, CBP-k gene-adierazpena erregulatzeko bi mekanismo nagusi ditu: histonen azetilazioaren bidez (HAT domeinua) kromatina “irekitzea” eta beste proteina batzuekin elkarrekintza bidez (proteina-proteina elkarrekintza domeinuak) transkripzio-makinaria erakarri eta transkripziorako funtsezko konplexuak eratzea (1C. irudia).

Miokardina (MYOCD) transkripzio koaktibatzaile indartsua da, bihotzeko eta gihar leuneko ehunetan adierazten dena nagusiki. Bihotzaren garapen faseetan adierazten da batez ere baina bihotz helduetan

ere aktibo egoten da eta bihotzeko hezur-proteina morfogenetiko 10 (BMP10)-aren adierazpena koordinatzen du.

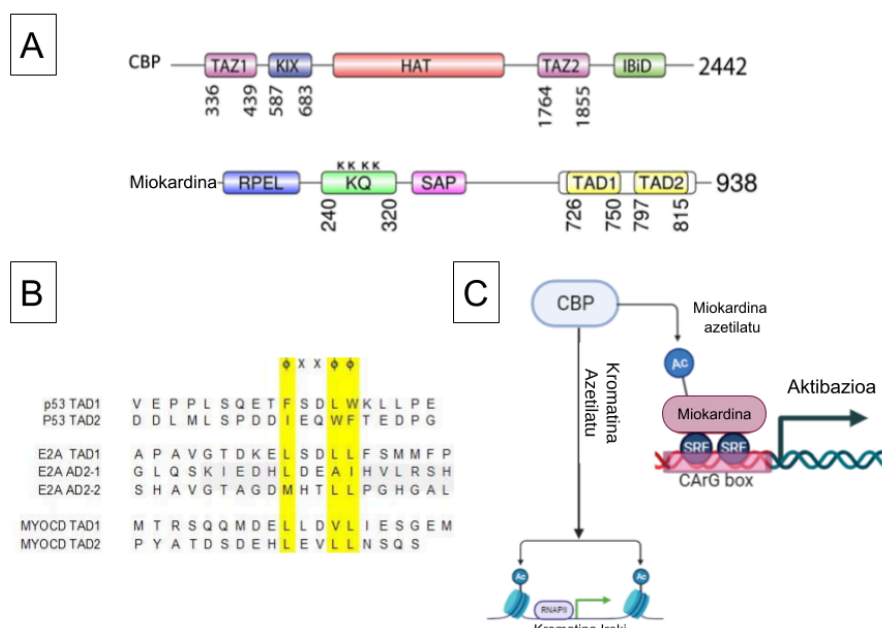
Beraz MYOCD bihotzaren funtzioa bizitzako etapa guztietan mantentzeko funtsezkoa dela esan daiteke. MYOCDk, transkripzio faktore gehienek ez bezala, ez du DNArri lotzeko domeinurik, beraz, ezin da gene ituen erregulazio-sekuentziekin zuzenean elkartu. Horren ordez, Serum Response Factor (SRF) proteinarekin elkarrekiten du SAP domeinuaren bidez. SRF-k bere DNA-lotura domeinuaren bidez CArG kutxetara lotzen da (Wang *et al.*, 2004). Hirugarren mailako konplexu hau sortzen denean itu geneen transkripzioa baimentzen da (1C. irudia, Wang *et al.*, 2001).

Gainera MYOCD-k CBP/p300 bezalako kromatina eraldatzeko faktoreak erakartzen ditu eta hauek histonen lisina hondarrak azetilatzuz geneen transkripzioa areagotzen dute (Cao *et al.*, 2008). *In vitro* entseguetan ikusi da MYOCD eta CBP/p300-ren arteko elkarrekintzaren bidez, CBP/p300ek MYOCD azetilatzun duela KQ eskualdean. Azetilazio honek MYOCDk SRF-rekin duen lotura indartzen du, horrela geneen espresioa areagotuz (1C. irudia; Cao *et al.*, 2012). Ondorioz, CBP/p300ek bi funtzio betetzen ditu: bai kromatina tokian bertan azetilatzea, bai MYOCD bera azetilatzea, gene-adierazpena bideratzeko.

Hala ere, CBP/p300-k MYOCD azatiltzeko, bien arteko nolabaiteko elkarrekintza zuzena egon behar du. Sekuentzia-analisiak erakutsi dute MYOCD-ren C-terminal eskualdean Φ -X-X- Φ - Φ motiboa duten bi TAD daudela (1B. irudia). Jakina da p53 transkripzio faktoreak bere TAD domeinuetako Φ -X-X- Φ - Φ motiboaren bidez elkarrekiten dutela CBP/p300en domeinuekin. Sekuentzian antzekotasunak behatuta, MYOCD-k bere TAD-ak erabiltzen dituela hipotizatzen dugu CBP/p300-rekin lotzeko, eta hori CBP/p300en TAZ1, TAZ2 eta/edo KIX domeinuen bidez gerta liteke.

1. irudia. Miokardina eta CBP/p300 proteinen arteko elkarrekintzaren funtsak.

A) Domeinu-arkitektura sinplifikatua eta proteina giltzarrien egitura. Miokardinak transaktibazio domeinu bat du C terminalean (TAD) eta N-terminalean KQ eta SAP. CBP/p300 koaktibatzaile transkribatzaileak histona azetil transferasaren domeinua du (HAT), baita proteina-proteinen interakzio-domeinu batzuk ere; TAZ1/TAZ2, KIX eta IBiD. **B)** TADen lerrokatze sekuentziala. E2A, p53 eta miokardinarek TADetan dagoen Φ -X-X- Φ - Φ motiboa homologoa da. **C)** CBP/p300-k gene-adierazpena bi modutan erregulatzen du: MYOCDren amino-terminaleko KQ eremuko lisina hondarrak azetilatzek MYOCD eta SRF-ren arteko interakzioa areagotzen du CArG kutxen gainean, adierazpena indartuz. Bestalde zuzenean histona muinetako lisina hondarretan azetilatzek ere geneen transkripzioa handitzen du (irudi hau sortzeko BioRender erabili da).



3. Ikerketaren helburuak

Ikerketa honek MYOCD eta CBP/p300 arteko elkarrekintzaren oinarri molekularrak argitu nahi ditu. Titrazio bidezko kalorimetria isoterma (ITC) esperimentuetatik lortutako parametro termodinamikoek proteinen barruko desordenaren eginkizuna hobeto ulertzen lagunduko dute, MYOCD gene-espresioaren erregulazio dinamikan.

4. Ikerketaren muina

4.1 Miokardinarek TAD domeinuen eta CBP/p300-ren ustezko elkarrekintza domeinuen espresio errekonbinantea

MYOCDren TAD-ek CBP/p300-ren domeinu espezifikoekin elkarrekiten duten ikusteko, alde batetik miokardinarek TAD1 (726-750aa) eta TAD2 (797-815aa) domeinuak eta bestetik CBP/p300 proteinarek KIX (587-683aa) eta TAZ2 (1764-1855aa) domeinu errekonbinanteak adierazi dira *Escherichia coli* (BL21 anduia) bakterioen adierazpen sistema erabiliz.

Intereseko fusio-proteinak kodetzen duen material genetikoak plasmido batzuetan txertatu eta hauek transformazio kimiko bidez bakterioek bereganatzea lortu dugu. CaCl_2 tratamendua eta *heat shock* (42 °C tan 40 segunduz) bidez zelula konpetenteak bihurtarazi eta mintza aldi baterako iragazkor bihurtu da. Plasmido honek bere baitan Anpizilina antibiotikoarekiko erresistentzia genea (Amp^R) du sustatzaile konstitutibo baten pean, beraz antibiotikoa mediora gehituaz, bizirautea lortutako bakterio guztiek gure plasmidoa beraien baitan dutela bermatu da.

Zelulen hazkuntza M9 medio batean eman da, 37°C-tan. TAZ2 kodetzen duen plasmidoa duten bakterioen medioan ere 100 μM ZnCl_2 gehitu dira.

Behin bakterioek plasmidoa barneratuta, 600 nmtan dentsitate optikoaren 0,6ko balioa lortzean, gure helburu diren domeinuen adierazpena induzitu dugu. Plasmidoan, gure intereseko genea Lac operoiak kontrolatutako sustatzaile baten “ur behera” (*downstream*) kokatzen da. Sustatzaile honek LacI errepresore-proteina lotua du; RNA polimerasa lotzea eragotziz eta *downstream* geneen transkripzioa blokeatzen du. Ordea ingurura alolaktosaren analogo den isopropil β -d-1-tiogalaktopiranosidoa (IPTG) gehitzean, LacI errepresoreari lotzen zaio, eta horrek konformazio-aldaketa bat eragiten du, errepresorea operadore-sekuentziatik askaraziz eta operoiaren menpeko geneen transkripzioa hasiz. Hazkuntza 23 °C-an jarraitu da gau osoan zehar.

Prozesuarekin amaitzeko jasotako zelula-pelletak sonikazioz lisatu dira desnaturalizazio lotura bufferrean (urea 8 M duena) eta ostean, zentrifugazioz garbitu eta ganajalkina berreskuratu da.

4.2 Domeinuen purifikazio prozesua

Purifikazio prozesua desberdina da domeinu bakoitzak duen etiketa edo izaeraren arabera.

TAZ2 domeinua GB1 (disolbagarritasuna hobetzeko) eta Histidina etiketa batekin fusio proteina moduan adierazi da purifikazioa errazteko. Purifikazio-prozedura bi urrats nagusitan oinarritzen da: lehenik, afinitate kromatografia erabiltzen da Ni^{2+} ioiak dituzten zutabe batean, eta bigarrenik, katioi-trukaketa kromatografia SP Sepharose erretxina erabiliz. Garrantzitsua da aipatzea domeinu honek hiru zink ioiekin elkarrekiten duela egitura tridimentsional egonkor bat osatzeko. Horregatik, bere egitura mantentzeko, purifikazioan erabilitako disoluzio guztiei 10 μM ZnCl_2 gehitu zaie.

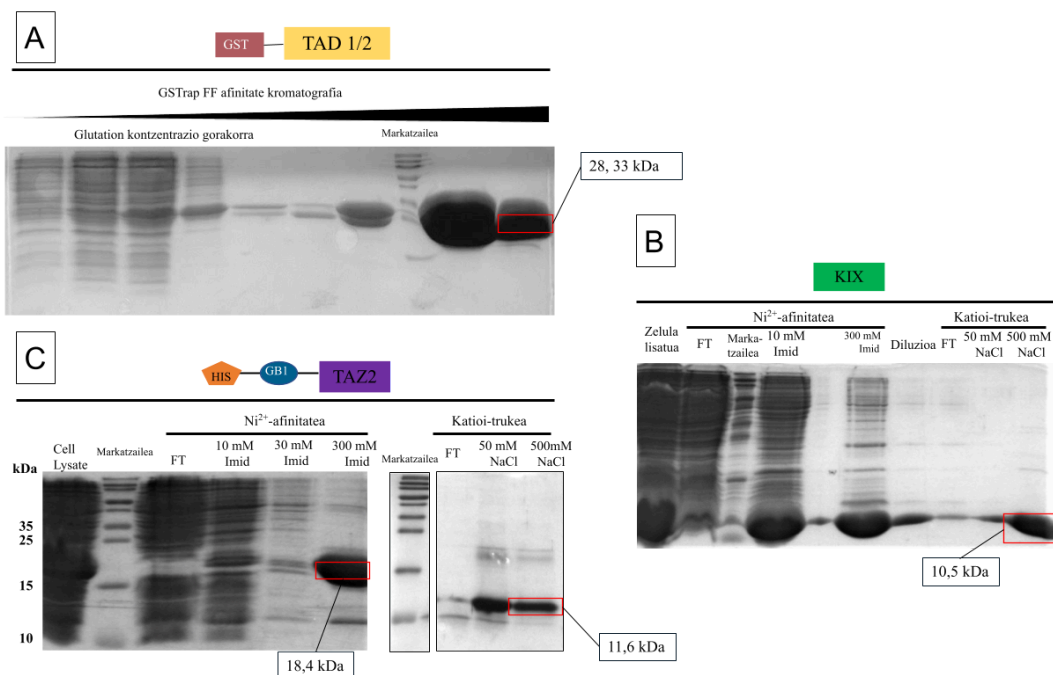
Lehen pausuan, histidinaren imidazol taldeak nikelarekiko afinitatea duenez, honi “itsatsita” geratzen da. Ondoren imidazolekin garbikoteinak eluitzeko. Ostean, proteinen birtolestea induzitu da, horretarako orain arte erabilitako buffer desnaturalizatzailea ordeztatu da jatorrizko soluzio indargetzailearekin (desnaturalizazio lotura bufferrean osagai berdinak dituen urearik gabe) hainbat garbiketa eginez. Azkenik 300mM imidazol soluzio batekin itu proteina eluitzen da, honek

histidina etiketa Ni^{2+} -rekin duen lotura hausten baitu. Pausu honen ostean Tronbina (1 unitate/50 nmol proteinako) bidez fusio proteina ebaki eta etiketatik banatu dugu gure domeinua, ondorego esperimenduetan etiketak izan ditzaken interferentziak ekiditeko. Tronbina gehitu eta laginak gau osoan dializatu dira A bufferrean (20 mM HEPES, pH 8,0; 50 mM NaCl; 5 mM β -merkaptotanol; 10 μM ZnCl_2). Azken purifikazio pausu bezala eta His6-GB1 fragmentuak gure proteina birtolestutik banatzeko SP sefrosa zutabe batetik igaro dugu lagina; katioi-truke erretxina batetik hain zuzen ere. Hala ere, laginaren bolumen murriztaren ondorioz hamar aldiz diluitu behar izan dugu zutabetik igaro aurretik. Horrela lehenik garbiketa bat egin da 50mM NaCl rekin etiketa eluitzeko eta azkenik, gure itu proteinaren eluziorako, 500 mM NaCl soluzio bat erabili da.

KIX domeinuaren kasuan bere baitan sintetizatu da, fusio proteina gabe. Purifikaziorako TAZ2-ren kasuan bezala nikelezko afinitate kromatografia bat egin da, domeinu honek hainbat histidina aminoazido baititu naturalki. 10mM imidazoleko soluzio batekin lehen garbiketa egin eta gure intereseko proteina 300mM imidazol soluzio batekin eluitu da. Urrats honen ostean, gure proteina egoera ez-desnaturizatzaile batera pasatzeko buffer aldaketa bat burutu da. Horretarako 24 orduko hainbat dialisi egin dira, urea 6M izatetik, 3M, 1M eta azkenean 0M (A bufferrean dializatuz). Amaitzeko katioi trukeko Mono-S zutabe bat erabili da, non 50mM NaCl soluzioarekin garbiketa egin ostean gure proteina 500mM NaCl soluzio batekin eluitu den.

TAD domeinuarekin jarraituz, fusio proteina bat eratu da GST(Glutation S-Transferasa) etiketa bat gehituz. Etiketa honek purifikazioa urrats bakarrean burutzea baimendu du. GSTrap FF afinitate kromatografia zutabe batean kargatu da lagina, ostean garbiketa bat egin da PBS soluzio batekin eta amaitzeko glutation kontzentrazio gradiente gorakorreko soluzio batekin eluitu da (10-100mM), lehiakortasun bidez GST-a zutabetik askatu eta glutation askera lotuz eluitzen baita. Aipatzekoa da molekula hauei ez zaiela GST etiketa kendu ondorengo entseguak egiteko. Honen arrazoi nagusia, peptidoa oso txikia izanik (2,33 kDa), peptidoaren galera saihestu eta hurrengo analisisetan detekzioa bermatzea izan da.

2. irudia. SDS.PAGE gelaren irudia: TAD1, TAD2, KIX eta TAZ2 domeinuen purifikazio eraginkorra; proteinak kutsatzaile gabe isolatzea lortu da. A) GST-Trap afinitate kromatografia nahikoa da GST-TAD1/2 fusio proteinak purifikatzeko. B) KIX domeinua guztiz purifikatzeko nikelezko afinitate kromatografia egin, eta ostean katioi trukeko kromatografia burutu da. C) TAZ2 domeinuari dagokionez nikelezko afinitate kromatografia nahikoa da purifikaziorako, ostean histidina etiketa kendu eta katioi-trukeko kromatografiaz etiketa eta gera zitezkeen kutsatzaileetaz banatu da.



Kasu guztietan purifikazio urratsak arrakastatsuak izan direla bermatzeko proteinak SDS-poliakrilamida geletan pisu molekularren arabera banatu dira elektroforesiaren bidez, 90 minutuz 100 V-tan.

4.3 Elkarrekintza entsegua titrazio bidezko kalorimetria isoterma bidez

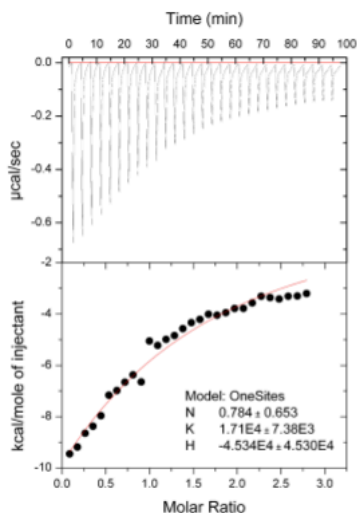
Behin purifikazioak burututa, domeinuen arteko elkarrekintzaren azterketa titrazio bidezko kalorimetria isoterma (ITC) bidez egin da, lotura-interakzioak aztertzeko bero-aldaketak neurtuz.

Teknika honetan, titulatzailerak (ligandoa) xiringan dago, eta lagin-ganberan dagoen beste molekula batekin titratzen da. Ligandoa bolumen txikitik gehitzen da injekzio progresiboen bidez, eta molekulen arteko elkarrekintzak beroa askatu edo xurgatu egiten du. Kalorimetroak bero-aldaketa hauek neurtzen ditu, eta datuetatik lotura-konstantea (K_d), estekiometria (n) eta entalpia (ΔH) kalkula daitezke. Esperimentuak 30 °C-tan burutu dira, 20 mM MES (pH 6,5), 5 mM β -merkaptotanol eta 10 μ M $ZnCl_2$ erabiliz, 100–200 μ M TAZ2 zelulan eta 1–2 mM TAD1/2 rekin xiringan. Termogramak guztiak bakarreko lotura-eredu bati egokitu dira eta kurba sigmoide bat lortu da.

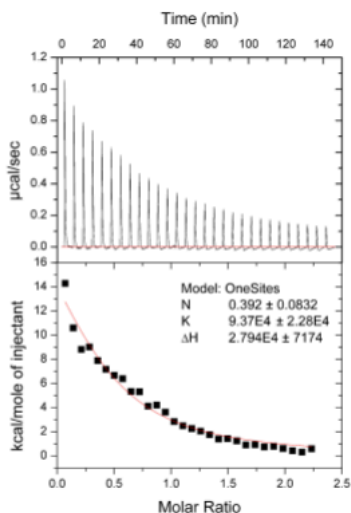
MYOCD-TAD1 eta CBP-TAZ2 arteko elkarrekintza begira, lortutako disoziazio konstantea $58 \pm 13,6 \mu$ M-ekoa da (3. Irudia). Hau Lochheaden taldeak lortutako CBP-TAZ2 eta p53-AD1en arteko afinitatearekin konparatuta ($K_d = 4,1 \pm 1,2 \mu$ M) nahikoa txikia da, hala ere bi domeinuen artean nolabaiteko elkarrekintza dagoela baieztatzeko balio du. Entalpia aldaerari begiratuz: $\Delta H = -45,34$ kcal/mol elkarrekintza oso exotermikoa dela ikusi da. Honek elkarrekintza entalpia aldeko elkarrekintzek bultzatzen dutela nagusiki esan nahi du; izan hidrogeno zubi edo elkarrekintza hidrofobikoak.

MYOCD-TAD2 eta CBP-TAZ2ren interakzioak aldiz aurrekoak baino afinitate handiagoa erakusten du, disoziazio konstantea $10,7 \pm 4,4 \mu$ M delarik. Hala ere, esan beharra dago elkarrekintza hau ez dela oso sendoa. Entalpia aldaketa positiboa da kasu honetan: 27,94 kcal/mol. Erreakzioa, beraz, endotermikoa da, eta interakzioa nagusiki entropia-aldaketek bultzatzen dute.

3. irudia. MYOCD-TAD1 eta CBP-TAZ2 domeinuen artean elkarrekintza dago, baita MYOCD-TAD2 eta CBP-TAZ2ren artean ere. Goiko zatia: denboran zeharreko potentzia termikoa (μ cal/sec) erakusten du. Puntu bakoitza lagin-gelaxkan ligando baten injekzioari dagokio. Beheko zatia: entalpia normalizatua (kcal/mol injektatutako molekula) adierazten du, injektatutako molekularen eta gelaxkako molekularen arteko erlazio molarren funtzioan.



MYOCD-TAD1: CBP-TAZ2



MYOCD-TAD2: CBP-TAZ2

Eraikinak	Disoziazio konstantea (K_d)
GST-MYOCD-TAD1: CBP-TAZ2	$58,5 \pm 13,6 \mu$ M
GST-MYOCD-TAD2: CBP-TAZ2	$10,7 \pm 4,4 \mu$ M

5. Ondorioak

Sortutako plasmido eta adierazte sistema egokia izan da, proteina kontzentrazio egokiak lortu baitira. Purifikazio prozesua ere arrakastatsua izan da, sortutako fusio proteina eta purifikazio urratsak emaitza positiboak lortu dituzte. Prozedura hauen protokoloa finkatuta geratu da etorkizuneko saiakeretarako. ITC bidez jasotako emaitzekin ordea ezin da ondorio finkorik atera, oraindik hipotesia baieztatzeko datu osagarriak falta direlako. Hala ere behin-behineko emaitzek aztertutako domeinuen artean elkarrekintza ahul batzuk ematen direla iradokitzen du, eta beraz MYOCD eta CBP/p300 arteko elkarrekintzak domeinu hauek bideratuta eman daitezke.

6. Etorkizunerako planteatutako norabidea

KIX domeinuaren purifikazioa arrakastatsua izan zen arren, ezin izan dira ITC esperimentuak domeinu honekin burutu, beraz, MYOCD-TAD1/2 eta domeinu honen arteko elkarrekintzak aztertzeke daude. Horretaz gain, aipatu behar da erabilitako MYOCD-TAD ek GST etiketa zutela ITC egiteko orduan, beraz ezinbestekoa izango da TAZ2 eta KIX domeinuek GST etiketarekin elkarrekiten duten aztertzea kontrol moduan.

Gainera, egindako saioen erreplika gehiago egitea komeni da, bikoiztu gehiago eduki eta lortutako emaitzak erreproduzigarriak direla bermatzeko. Baita baldintzak (proteinen kontzentrazioak) hobeto doitzeko ere, lortutako estekiometria baloreak 1- balorearen ingurukoa izan behar duelako. Horrez gain, ITC-n titrazioa kontrako modura eginez emaitza berdinak lortzen diren behatu beharko litzateke; TAD domeinuak injekzio bidez gehitu beharrean ganbaran jarri eta TAZ2 titratuz.

Azkenik, azterketa hauen ostean, erresonantzia magnetiko nuklear bidez (NMR) elkarrekintzan garrantzitsuak diren aminoazido hondarrak identifikatu ahalko dira. Hau ezinbestekoa izango da IDRen dinamika hobeto ulertzeko.

7. Erreferentziak

1. Babu, M. M., Kriwacki, R. W., & Pappu, R. V. (2012). Versatility from protein disorder. *Science*, 337(6101), 1460–1461. <https://doi.org/10.1126/science.1228775>
2. Berlow, R. B., Dyson, H. J., & Wright, P. E. (2015). Functional advantages of dynamic protein disorder. *FEBS Letters*, 589(19), 2433–2440. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.07.013>
3. Brodsky, S., Jana, T., Mittelman, K., Chapal, M., Kumar, D. K., Carmi, M., & Barkai, N. (2020). Intrinsically disordered regions direct transcription factor in vivo binding specificity. *Molecular Cell*, 79(3), 459–471. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.06.020>
4. Cao, D., Wang, C., Tang, R., Chen, H., Zhang, Z., Tatsuguchi, M., & Wang, D.-Z. (2012). Acetylation of myocardin is required for the activation of cardiac and smooth muscle genes. *Journal of Biological Chemistry*, 287(46), 38495–38504. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.396879>
5. Cao, D., Wang, Z., Zhang, C.-L., Oh, J., Xing, W., Li, S., Richardson, J. A., & Wang, D.-Z. (2005). Modulation of smooth muscle gene expression by association of histone acetyltransferases and deacetylases with myocardin. *Molecular and Cellular Biology*, 25(2), 364–376. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.2.364-376.2005>
6. Denis, C. M., Langelaan, D. N., Kirilin, A. C., Chitayat, S., Munro, K., Spencer, H. L., LeBrun, D. P., & Smith, S. P. (2014). Functional redundancy between the transcriptional activation domains of E2A is mediated by binding to the KIX domain of CBP/p300. *Nucleic Acids Research*, 42(11), 7370–7382. <https://doi.org/10.1093/nar/gku354>
7. Dunker, A. K., Lawson, J. D., Brown, C. J., Williams, R. M., Romero, P., Oh, J. S., Oldfield, C. J., Campen, A. M., Ratliff, C. M., Hipps, K. W., Ausio, J., Nissen, M. S., Reeves, R., Kang, C., Kissinger, C. R., Bailey, R. W., Griswold, M. D., Chiu, W., Garner, E. C., & Obradovic, Z. (2001). Intrinsically disordered protein. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 19(1), 26–59. [https://doi.org/10.1016/S1093-3263\(00\)00069-5](https://doi.org/10.1016/S1093-3263(00)00069-5)

8. 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. *Journal of Biological Chemistry*, 291(14), 6714–6722. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.692020>
9. Lochhead, M. R., Brown, A. D., Kirlin, A. C., Chitayat, S., Munro, K., Findlay, J. E., & Smith, S. P. (2020). Structural insights into TAZ2 domain-mediated CBP/p300 recruitment by transactivation domain 1 of the lymphopoietic transcription factor E2A. *Journal of Biological Chemistry*, 295(14), 4303–4315. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.012457>
10. Mukhopadhyay, S. (2020). The dynamism of intrinsically disordered proteins: Binding-induced folding, amyloid formation, and phase separation. *Journal of Physical Chemistry B*, 124(46), 11541–11560. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c08435>
11. Pinet, L., Assrir, N., & van Heijenoort, C. (2021). Expanding the disorder-function paradigm in the C-terminal tails of ErbBs. *Biomolecules*, 11(11), 1690. <https://doi.org/10.3390/biom11111690>
12. Robustelli, P., Piana, S., & Shaw, D. E. (2020). Mechanism of coupled folding-upon-binding of an intrinsically disordered protein. *Journal of the American Chemical Society*, 142(26), 11092–11101. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c03755>
13. Strodel, B. (2021). Energy landscapes of protein aggregation and conformation switching in intrinsically disordered proteins. *Journal of Molecular Biology*, 433(16), 167182. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167182>
14. Wang, D., Chang, P. S., Wang, Z., Sutherland, L., Richardson, J. A., Small, E., Krieg, P. A., & Olson, E. N. (2001). Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell*, 105(7), 851–862. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00390-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00390-2)
15. Wang, F., Marshall, C. B., & Ikura, M. (2013). Transcriptional/epigenetic regulator CBP/p300 in tumorigenesis: Structural and functional versatility in target recognition. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(21), 3989–4008. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1280-4>
16. Wang, Z., Wang, D.-Z., Hockemeyer, D., McAnally, J., Nordheim, A., & Olson, E. N. (2004). Myocardin and ternary complex factors compete for SRF to control smooth muscle gene expression. *Nature*, 428(6979), 185–189. <https://doi.org/10.1038/nature02382>
17. Ward, J. J., Sodhi, J. S., McGuffin, L. J., Buxton, B. F., & Jones, D. T. (2004). Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life. *Journal of Molecular Biology*, 337(3), 635–645. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.02.002>
18. Williams, R. M., Obradović, Z., Mathura, V., Braun, W., Garner, E. C., Young, J., Takayama, S., Brown, C. J., & Dunker, A. K. (2001). The protein non-folding problem: Amino acid determinants of intrinsic order and disorder. *Pacific Symposium on Biocomputing*, 89–100.
19. Zhu, Y., Wang, Z., Li, Y., Peng, H., Liu, J., Zhang, J., & Xiao, X. (2023). The role of CREBBP/EP300 and its therapeutic implications in hematological malignancies. *Cancers*, 15(5), 1219. <https://doi.org/10.3390/cancers15051219>

8. Eskerrak eta oharrak

Lan hau TASSEP programaren bidez Kanadako Queen's University-n egindako lauhileko bateko elkartrukearen fruitu da, Steven Smithen gidaritzapean, Matthew Fishman eta Holly Spencer-en laguntzarekin.