

УДК 575.22:595.773.4

СТСФ ЧЕЛОВЕКА ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С СР190 ДРОЗОФИЛЫ, НО НЕ С KAISO

© 2021 г. К. Ю. Халисова¹, академик РАН П. Г. Георгиев¹, А. Н. Бончук^{1,*}

Поступило 04.12.2020 г.
После доработки 13.01.2021 г.
Принято к публикации 14.01.2021 г.

СТСФ человека (hСТСФ) является основным архитектурным белком млекопитающих. У дрозофилы гомолог СТСФ (dСТСФ) взаимодействует с ВТВ доменом белка СР190, участвующего в создании открытого хроматина и инсуляции. Ранее было показано, что ВТВ-содержащий белок Kaiso взаимодействует с hСТСФ и регулирует его активность. Нами было проведено подробное исследование взаимодействия между белками в дрожевой двугибридной системе. Неожиданным оказалось, что Kaiso не взаимодействует с hСТСФ и его гомологом у дрозофилы. С другой стороны, СР190 взаимодействовал с С-концом hСТСФ. Полученные результаты демонстрируют, что взаимодействие между белками СТСФ и СР190 является высококонсервативным. Вероятно, что у человека есть другие ВТВ-содержащие белки, которые выполняют функции, описанные для белка СР190 дрозофилы.

Ключевые слова: архитектурные белки, хроматиновый инсулятор, регуляция транскрипции, ВТВ домен

DOI: 10.31857/S2686738921020128

Высококонсервативный среди высших эукариот белок СТСФ имеет неструктурированные концевые домены и расположенный в центральной части кластер, состоящий из 11 цинковых пальцев С2Н2 типа [1]. У млекопитающих СТСФ является основным охарактеризованным архитектурным белком, который поддерживает дистанционные контакты между удаленными участками хромосом [2]. У дрозофилы гомолог СТСФ (dСТСФ) участвует в организации инсуляторов и дистанционных взаимодействий совместно с белком СР190 [3, 4]. Согласно современным представлениям, подкрепленным многочисленными экспериментальными результатами, у млекопитающих СТСФ в кооперации с когезиновым комплексом формирует границы хроматиновых петель и определяет границы большей части топологически ассоциированных доменов (ТАДов) [5]. Также у белков СТСФ были идентифицированы N-концевые гомодимеризующие домены, которые могут быть вовлечены в организацию специфичных дистанционных взаимодействий [6]. Роль других партнеров белка hСТСФ в организации архитектуры хромосом остается слабо исследованной.

Ранее было показано, что ВТВ домен белка Kaiso взаимодействует с С-концевым неструктурированным районом белка hСТСФ [7]. Белок Kaiso человека имеет на N-конце ВТВ/POZ домен и 3 цинковых пальца, которые узнают метилированный сайт на ДНК [8]. ВТВ/POZ является высококонсервативным доменом у высших эукариот, который формирует гомодимеры и участвуют в белок-белковых взаимодействиях для привлечения транскрипционных комплексов на хроматин [9]. Для Kaiso было показано участие в метилзависимой репрессии путем привлечения корепрессоров N-CoR и SMRT [10].

К семейству белков, содержащих N-концевой ВТВ/POZ домен, также относится белок СР190, который преимущественно связывается с промоторами генов домашнего хозяйства и инсуляторами и участвует в поддержании их активности [11]. Нами было показано, что белок СР190 может взаимодействовать с ДНК-связывающими архитектурными белками с помощью ВТВ и М домена [1, 4]. В том числе ВТВ домен белка СР190 взаимодействует с С-концевым участком белка dСТСФ [4]. Белки Kaiso и СР190 имеют во многом сходное строение, что предполагает вероятный консерватизм их функций. Целью исследования стала проверка, насколько консервативны могут быть взаимодействия между СТСФ и ВТВ-содержащими белками у человека и дрозофилы.

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН), Москва, Россия

*e-mail: bonchuk_a@genebiology.ru

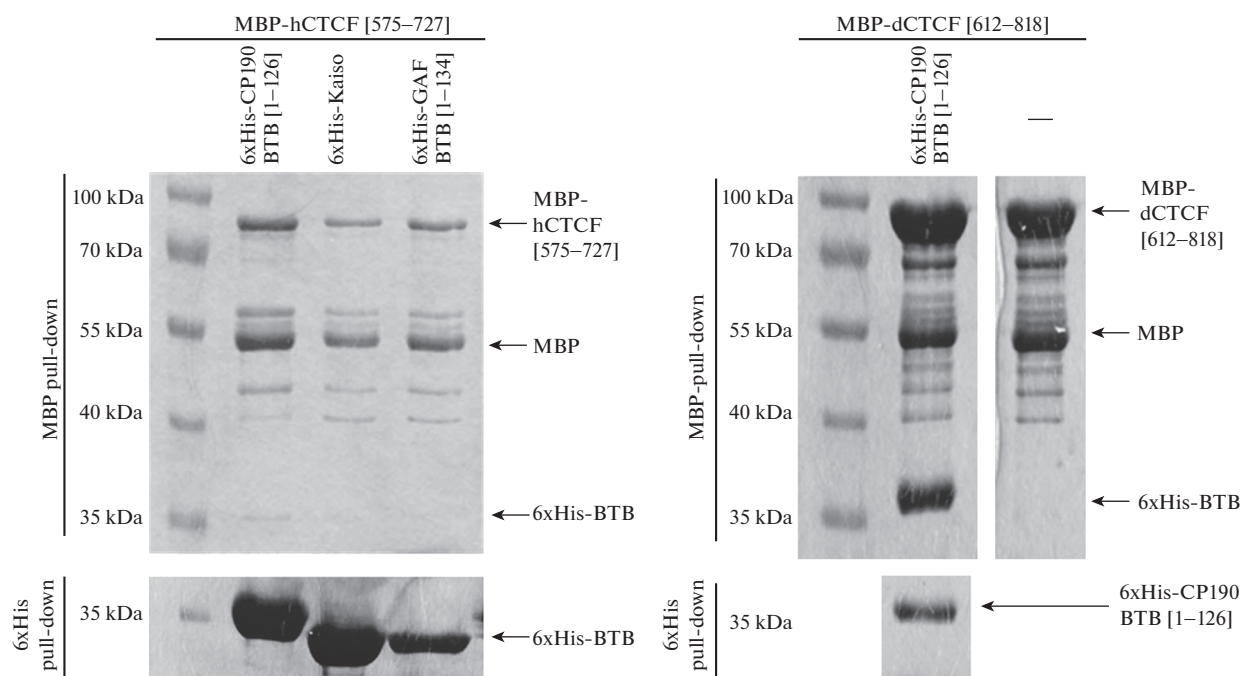


Рис. 1. Анализ взаимодействия между слитыми с MBP С-концевыми доменами белков CTCF человека и дрозофилы (hCTCF и dCTCF) и BTB доменами Kaiso, CP190, GAF, слитыми с 6xHis, *in vitro* при помощи соосаждения на иммобилизованной амилозе (MBP-pull-down). Соосаждение на Ni-NTA (6xHis-pull-down) использовалось как контроль уровня экспрессии BTB-доменов. Соосажденные белки были разделены при помощи SDS-PAGE и окрашены Coomassie. Позиции аминокислотных остатков указаны в квадратных скобках.

Так как взаимодействие между С-концевой областью hCTCF и BTB доменом Kaiso было исследовано только в дрожевой двугибридной системе, было решено протестировать взаимодействие между Kaiso и hCTCF *in vitro*. С этой целью были проэкспрессированы в бактериях С-концевой домен белка CTCF человека (575-727), соединенный с мальтозо-связывающим белком (MBP) и BTB домены белков CP190 (1-126), Kaiso (1-130) и GAF (1-134), сшитые с полигистидиновой меткой (6xHis) для дальнейшего соосаждения белков *in vitro* на аффинном носителе (иммобилизованной амилозе или Ni-NTA сефарозе). Очистка белков за 6xHis использовалась в качестве положительного контроля экспрессии BTB доменов в бактериях. В результате было показано, что BTB Kaiso и CP190 не взаимодействуют с С-концом CTCF человека (рис. 1). В то же время BTB домен CP190 соосаждается с С-концевым участком dCTCF. Таким образом, не было подтверждено взаимодействие между Kaiso и hCTCF *in vitro*.

Для подтверждения непредвиденного результата было проведено исследование взаимодействия между белками в дрожевой двугибридной системе, которая позволяет изучать целые белки, а не их отдельные домены (рис. 2). Белок Kaiso имеет один-два района, которые могут приводить к сильной активации транскрипции репортерных генов, в том случае если они соединены с ДНК-

связывающим доменом GAL4, что ограничивало применение данных конструкций полноразмерного белка для оценки взаимодействий в дрожевой двугибридной системе. Исследования полноразмерного Kaiso возможны лишь в случае соединения его с активационным доменом GAL4. Для полной картины нами также были исследованы меньшие фрагменты белка, содержащие BTB домен, BTB домен и прилежащие неструктурированные участки, кластер цинковых пальцев (рис. 2в). Для оценки консервативности взаимодействия BTB-содержащих белков с CTCF были тестированы взаимодействия белка CP190 с CTCF человека (рис. 2а, 2б). Положительными контролями эксперимента служила способность BTB-содержащих белков (Kaiso, CP190) к димеризации.

В результате всех проведенных исследований нами не было показано взаимодействие между BTB Kaiso и hCTCF. Интересно, что большие фрагменты белка Kaiso, включающие прилежащие неструктурированные участки белка, также не взаимодействуют с hCTCF, что противоречит ранее полученным в дрожевой системе данным [7]. Также с Kaiso не взаимодействует dCTCF. При исследовании взаимодействия белка CP190 было обнаружено, BTB домен белка CP190 взаимодействовал только с С-концевым районом CTCF дрозофилы. Неожиданным оказалось, что

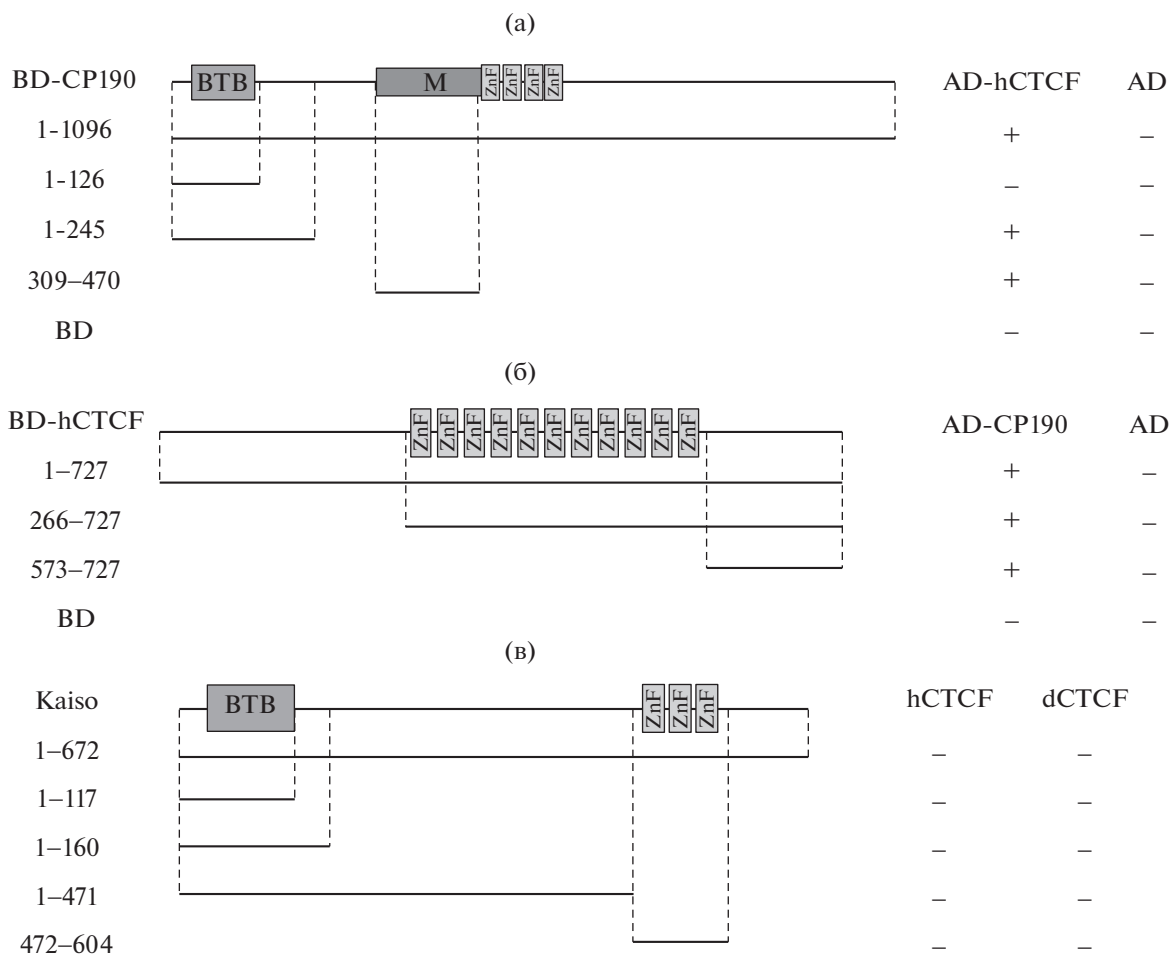


Рис. 2. Исследование взаимодействий между белками dCTCF, hCTCF, Kaiso и CP190 в дрожжевой двугибридной системе. (а) Исследование взаимодействия между CP190 и hCTCF. Фрагменты CP190 были слиты с ДНК-связывающим доменом GAL4 (BD) и исследовано их взаимодействие с hCTCF, слитым с активационным доменом GAL4 (AD). На схеме полноразмерного CP190 белковые домены обозначены прямоугольниками, линии показывают исследуемые фрагменты белка (соответствующие аминокислотные остатки указаны слева). Результаты представлены в колонках справа, где + и – означают наличие или отсутствие взаимодействия соответственно. В качестве положительного контроля проверялась способность BTB доменов к димеризации, а в качестве отрицательного контроля – тестирование на наличие взаимодействия только с активационным (AD) или ДНК-связывающим (BD) доменом белка GAL4. (б) Локализация домена белка hCTCF, необходимого для взаимодействия с CP190. Различные фрагменты hCTCF были слиты с ДНК-связывающим доменом GAL4 и исследовано их взаимодействие с CP190, слитым с активационным доменом GAL4. Остальные обозначения такие же, как в (а). (в) Исследование взаимодействия между белками Kaiso и hCTCF, dCTCF. Полноразмерный Kaiso был слит с активационным доменом GAL4, различные фрагменты Kaiso были соединены как с ДНК-связывающим, так и с активационным доменом GAL4. Все полученные производные были протестированы в дрожжевой двугибридной системе на способность к взаимодействию с СТCF человека и дрозофилы. Остальные обозначения такие же, как в (а).

М-домен белка CP190 одновременно взаимодействует с С-концами белков СТCF дрозофилы и человека, что указывает на консервативность взаимодействия.

Отсутствие взаимодействия между белками Kaiso и hCTCF нельзя считать неожиданным. Эти белки являются антагонистами в регуляции экспрессии и связывании с геномными сайтами. Белок СТCF обеспечивает создание открытого хроматина и теряет способность связываться с метилированными сайтами, что приводит к инак-

тивации транскрипции [2]. Наоборот, Kaiso связывается с метилированной ДНК и может рекрутировать комплексы, которые усиливают метилирование ДНК и репрессию транскрипции [12, 13]. Вследствие этого можно предположить, что hCTCF и Kaiso формируют на хроматине альтернативные комплексы. Обратная ситуация наблюдается в случае dCTCF и CP190, которые функционируют совместно в организации активных промоторов и инсуляторов [4, 11, 14]. Можно предположить, что взаимодействие между СТCF

и CP190-подобными белками является высококонсервативным и M-подобный домен осуществляет взаимодействие между неидентифицированным ВТВ-содержащим белком и hCTCF при активации промоторов человека. В настоящее время не найдено стабильных ВТВ-содержащих партнеров белка hCTCF, поэтому направленный поиск партнеров hCTCF между ВТВ белками человека является актуальной задачей.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ проект № 19-74-30026.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fedotova A.A., Bonchuk A.N., Mogila V.A., et al. // *Acta Naturae*. 2017. V. 9. № 2. P. 47–58.
2. Arzate-Mejía R.G., Recillas-Targa F., Corces V.G. // *Development*. 2018. V. 145. P. 6.
3. Kyrchanova O., Ivlieva T., Toshchakov S., et al. // *Nucleic Acids Res.* 2011. V. 39. P. 8. P. 3042–3052.
4. Bonchuk A., Maksimenko O., Kyrchanova O., et al. // *BMC Biol.* 2015. V. 13. P. 63.
5. Szabo Q., Bantignies F., Cavalli G., et al. // *Sci Adv.* 2019. V. 5. P. 4.
6. Bonchuk A., Kamalyan S., Mariasina S., et al. // *Sci Rep.* 2020. V. 10. P. 1.
7. Defossez P.A., Kelly K.F., Fillion G.J., et al. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 52. P. 43017–43023.
8. Prokhortchouk A., Hendrich B., Jørgensen H., et al. // *Genes Dev.* 2001 V. 15. P. 13.
9. Stogios P.J., Downs G.S., Jauhal J.J., et al. // *Genome Biol.* 2005. V. 6. № 10. P. 1–18.
10. Raghav S.K., Waszak S.M., Krier I., et al. // *Mol Cell.* 2012. V. 46. P. 335–350.
11. Ahanger S.H., Shouche Y.S., Mishra R.K., et al. // *Nucleus*. 2013. V. 4. № 2. P. 115–22.
12. Fillion G.J., Zhenilo S., Salozhin S., et al. // *Mol Cell Biol.* 2006. V. 1. P. 169–181.
13. Zhenilo S., Deyev I., Litvinova E., et al. // *Cell Death Differ.* 2018. V. 11. P. 1938–1951.
14. Bartkuhn M., Straub T., Herold M., et al. // *EMBO J.* 2009. V. 28(7). P. 877–888.

HUMAN CTCF INTERACTS WITH DROSOPHILA CP190, BUT NOT WITH KAISO

K. Y. Khalisova^a, Academician of the RAS P. G. Georgiev^a, and A. N. Bonchuk^{a,#}

^a *Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

[#] *e-mail: bonchuk_a@genebiology.ru*

Human CTCF (hCTCF) is a major architectural protein in mammals. In *Drosophila*, the CTCF homologue (dCTCF) interacts with the ВТВ domain of the CP190 protein, which is involved in the establishment of open chromatin and activity of insulators. Previously, it was shown that the ВТВ protein Kaiso interacts with hCTCF and regulates its activity. We have carried out a detailed study of the interaction between these proteins in a yeast two-hybrid assay. Surprisingly, Kaiso did not interact with hCTCF and its *Drosophila* homologue. On the other hand, CP190 interacted with the C-terminus of hCTCF. The results obtained demonstrate that the interaction between CTCF and CP190 proteins is highly conserved. It is likely that humans have other ВТВ proteins that perform the functions described for the *Drosophila* CP190.

Keywords: architectural proteins, chromatin insulator, regulation of transcription, ВТВ domain