

УДК 577.218

КО-РЕПРЕССОР NCoR ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С ТРАНСКРИПЦИОННЫМ ФАКТОРОМ Kaiso ПО МЕХАНИЗМУ, ОТЛИЧНОМУ ОТ ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С BCL6

© 2023 г. К. И. Балагуров^{1,*}, академик РАН П. Г. Георгиев¹, А. Н. Бончук¹

Поступило 20.09.2022 г.
После доработки 24.10.2022 г.
Принято к публикации 24.10.2022 г.

Транскрипционный фактор позвоночных Kaiso специфично связывается с метилированными последовательностями ДНК при помощи цинковых пальцев C2H2-типа. Помимо C2H2-доменов, на N-конце Kaiso находится ВТВ/POZ домен, который формирует гомодимеры. Kaiso, как и несколько других хорошо исследованных ВТВ/POZ белков, в том числе BCL6, взаимодействует с белком NCoR (nuclear co-repressor), который определяет посадку на хроматин комплексов, репрессирующих транскрипцию. С помощью дрожжевой двугибридной системы мы показали, что N-концевой домен NCoR взаимодействует с С-концевыми цинковыми пальцами Kaiso, а не с его ВТВ/POZ доменом, как предполагалось ранее. Полученные результаты демонстрируют, что NCoR взаимодействует с различными доменами транскрипционных факторов, что может увеличивать эффективность привлечения NCoR-зависимых репрессорных комплексов в регуляторные области генома.

Ключевые слова: ко-репрессоры, белки с цинковыми пальцами, C2H2-домены, факторы транскрипции, репрессия транскрипции

DOI: 10.31857/S2686738922600777, **EDN:** MPYLIL

Kaiso – транскрипционный фактор позвоночных, специфично связывающий метилированные CpG последовательности ДНК при помощи цинковых пальцев C2H2-типа. Помимо C2H2-доменов, на N-конце Kaiso находится димеризующийся ВТВ/POZ домен (ВТВ-домен). Ряд данных свидетельствует, что Kaiso является репрессором транскрипции [1]. В предыдущих работах было показано взаимодействие Kaiso и ко-репрессора NCoR, что объясняет, каким образом данный фактор участвует в репрессии транскрипции [2]. Транскрипционный ко-репрессор NCoR является компонентом мультибелковых репрессорных комплексов, которые включают гистондеацетилазы (HDAC) классов 1 и 2 и другие вспомогательные белки. NCoR содержит несколько доменов (рис. 2б), которые отвечают за белок-белковые взаимодействия и является ключевым звеном в процессах сборки и привлечения репрессорных комплексов, одновременно взаимодействуя с субъединицами данных комплексов, транскрипционными факторами, а также с гисто-

нами [3, 4]. Кроме того, NCoR непосредственно регулирует активность HDAC3 [5]. Первоначально NCoR был идентифицирован как белок, репрессирующий транскрипцию генов-мишеней рецепторов тиреоидного гормона и ретиноевой кислоты [6]. Нарушения экспрессии NCoR связывают с развитием некоторых онкологических заболеваний, например, глиобластомы [7].

Ряд транскрипционных факторов, включая ВТВ-содержащие белки BCL6, MAZR, PLZF, а также Kaiso, взаимодействуют с NCoR и могут привлекать репрессорные комплексы в область целевых промоторов, иницируя репрессию транскрипции. В связывании с NCoR участвуют ВТВ-домены транскрипционных факторов [2, 8–10]. Кристаллические структуры комплексов ВТВ-домена BCL6 и фрагментов NCoR, а также его ближайшего гомолога SMRT(NCoR2) показали, что во взаимодействии принимает участие пептид-связывающая бороздка ВТВ-домена и консервативная VBD1 полипептидная последовательность в С-концевой части ко-репрессоров [8, 11]. Также у NCoR описана дополнительная С-концевая последовательность VBD2, стабилизирующая взаимодействие с BCL6 [11].

Ранее методом GST pull-down было показано, что полноразмерный белок Kaiso связывается с N-концевым RD1-доменом NCoR, что отличает-

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

*e-mail: kostya.chatomilla@gmail.com

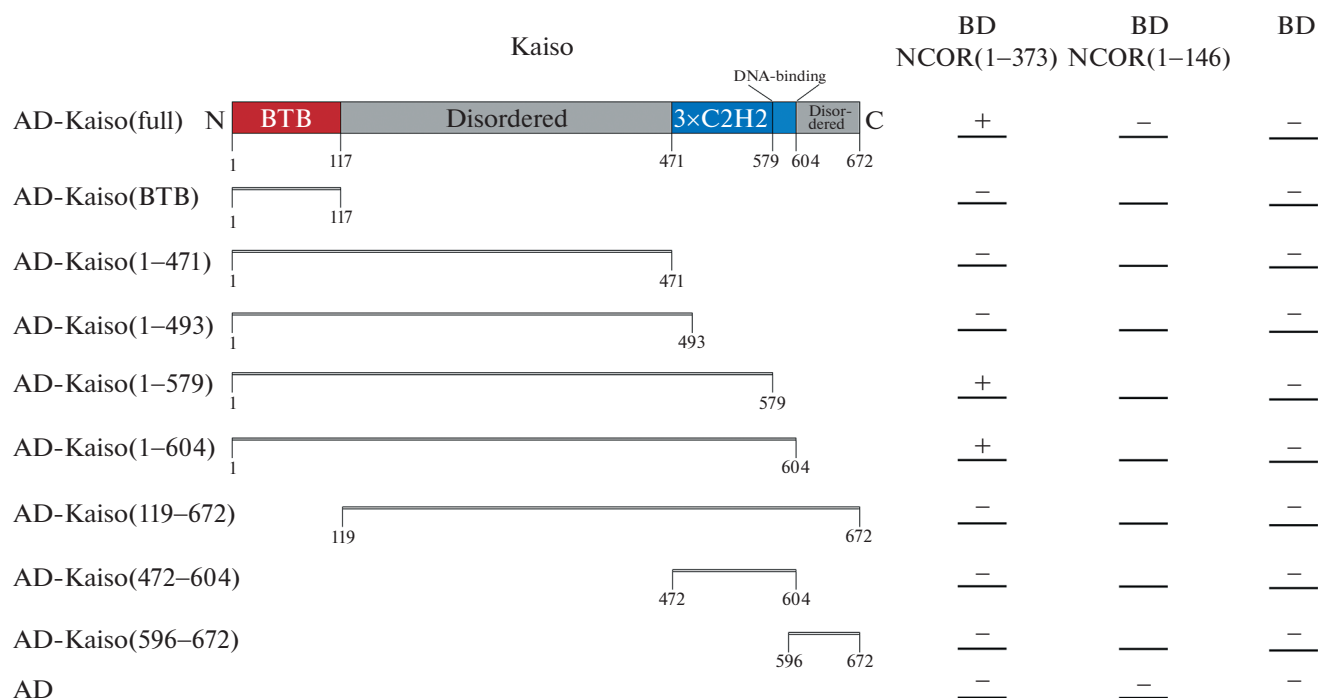


Рис. 1. Исследование способности делеционных мутантов белка Kaiso, слитых с AD Gal4, к взаимодействию с фрагментами белка NCoR, слитых с BD Gal4, в дрожжевой двугибридной системе. AD – активационный домен белка GAL4. BD – ДНК-связывающий домен GAL4. На схеме белков исследованный участок обозначен толстой линией, а ниже указаны номера аминокислот в полипептидной последовательности. В таблице + и – обозначают наличие или отсутствие взаимодействия между соответствующими белками. Пропуски в таблице означают отсутствие экспериментальных данных. В качестве положительного контроля использовалась способность к гомодимеризации N-конца белка Kaiso (1–117 а.к.), содержащего BTB-домен, а в качестве отрицательного контроля – тестирование всех исследуемых белков на наличие взаимодействия только с активационным (AD) или ДНК-связывающим (BD) доменом белка GAL4. C2H2 – домены цинковых пальцев C2H2-типа, BTB - Broad-complex, tramtrack, and bric-a-brac domain.

ся от механизма связывания данного ко-репрессора с BCL6. Также было показано, что BTB-домен Kaiso связывается с полноразмерным NCoR [2]. Методом дрожжевой двугибридной системы (ДДС) нам не удалось подтвердить прямое взаимодействие BTB-домена Kaiso и RD1-домена NCoR. Таким образом, целью настоящего исследования стало картирование доменов, определяющих взаимодействие между белками Kaiso и NCoR.

Для картирования участка взаимодействия на основе опубликованных структурных данных, а также модели AlphaFold2, была проанализирована доменная организация Kaiso, включающая BTB-домен и три ДНК-связывающих цинковых пальца, между которыми расположен длинный неструктурированный участок [12, 13]. За последним цинковым пальцем следует консервативная последовательность, принимающая участие в стабилизации ДНК-белкового комплекса, после которой располагается неструктурированный С-концевой участок. Исходя из доменной организации, был получен ряд делеционных мутантов Kaiso: BTB-домен (1–117 а.о.), белок без BTB-домена (119–672 а.о.), цинковые пальцы

(472–579 а.о.), С-концевой участок (596–672 а.о.), а также несколько вариантов белка с усеченным С-концом (рис. 1). Исследование белок-белковых взаимодействий проводилось методом ДДС. Были получены генетические конструкции для экспрессии делеционных производных Kaiso и NCoR, слитых с активационным (AD) или с ДНК-связывающим (BD) доменом транскрипционного активатора GAL4. Эксперименты с полноразмерным Kaiso, слитым с BD GAL4, ограничиваются его способностью к сильной активации транскрипции в ДДС, что позволяет исследовать его взаимодействия с другими белками только в случае, если он слит с активационным доменом GAL4.

По результатам ДДС было подтверждено прямое взаимодействие между полноразмерным белком Kaiso(full) и RD1-доменом NCoR(1-373). При этом Kaiso не взаимодействует с NCoR(1-146), что говорит о расположении области, связывающейся с Kaiso, между 146 и 373 аминокислотными остатками NCoR. Прямое взаимодействие изолированного BTB-домена Kaiso и NCoR(1-373) подтверждено не было. Также не было выявлено взаимодействие NCoR(1-373) с любым вариантом

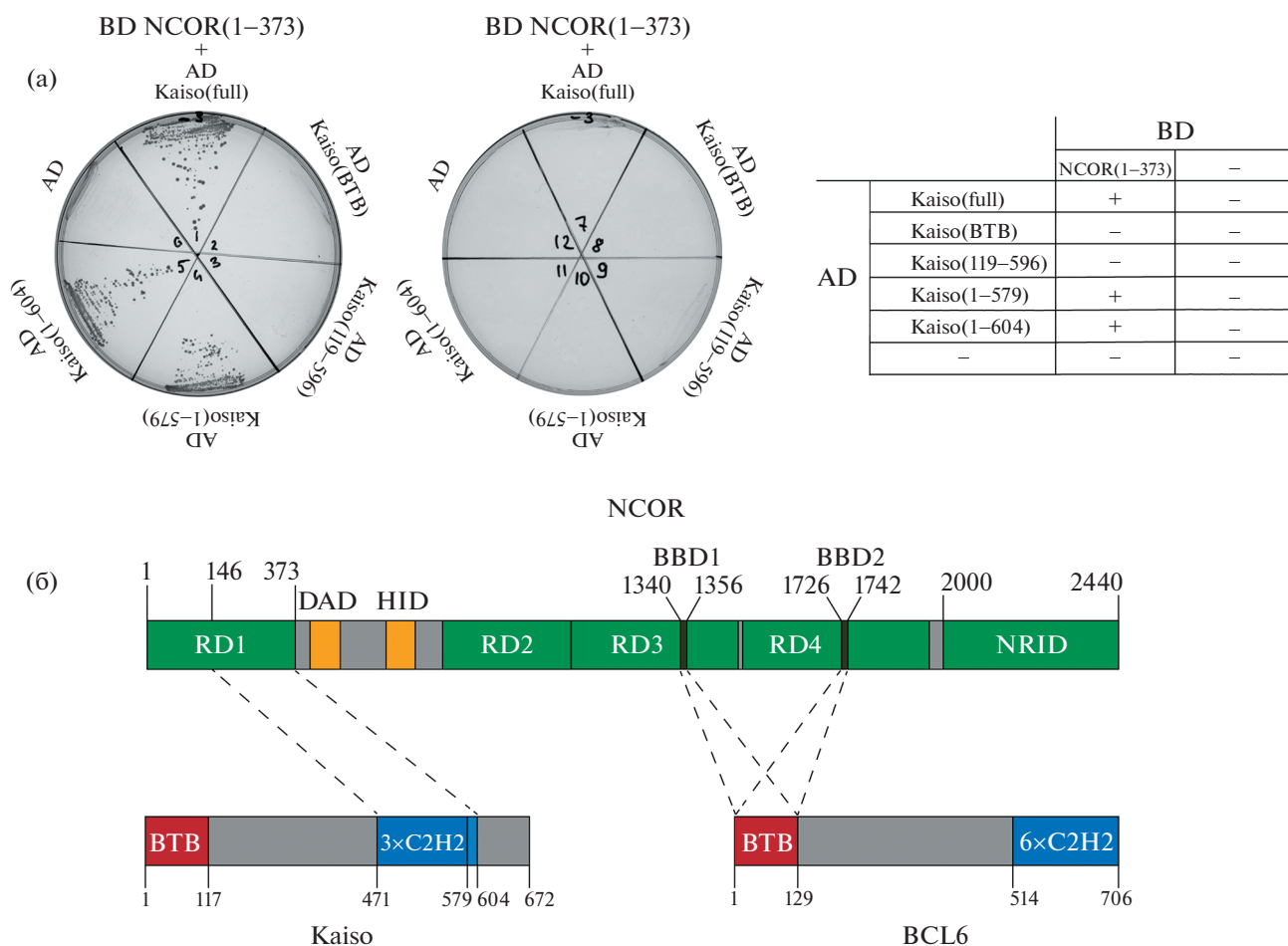


Рис. 2. а – Взаимодействие полноразмерного Kaiso, а также его некоторых делеционных производных в ДДС. Экспериментальные чашки, не содержащие гистидина, показаны слева, итоговая таблица взаимодействий справа. б – Схематичное изображение районов взаимодействия NCoR с белками Kaiso и BCL6. RD – репрессивные домены NCoR, NRID – домены, связывающие ядерные рецепторы, DAD – deacetylase activating domain, HID – histone interaction domain, BBD – BCL6-binding domain. Прочие условные обозначения аналогичны рис. 1. Номера аминокислотных остатков, обозначающих границы доменов и взаимодействующих участков у NCoR, указаны сверху, а у Kaiso и BCL6 снизу. Участки взаимодействия белков обозначены пунктирными линиями.

Kaiso с усеченным С-концом, не содержащим цинковые пальцы (рис. 1). При этом было показано взаимодействие NCoR(1-373) с производными Kaiso(1-579) и Kaiso(1-604), что указывает на то, что в связывании с ко-репрессором принимают участие C2H2 цинковые пальцы Kaiso (рис. 2а).

Интересно, что при взаимодействии ко-репрессора с Kaiso(1-579) рост дрожжей происходит значительно быстрее, чем в случае с Kaiso(1-604). Данный эффект может быть обусловлен тем, что во взаимодействии с ко-репрессором принимает участие второй β-тяж третьего цинкового пальца Kaiso, с которым, исходя из структурных данных, взаимодействует β-тяж из участка 579–604 а.о. и конкурирует с ним за связывание с NCoR. Отсутствие прямого взаимодействия NCoR с изолированными цинковыми пальцами Kaiso, а также с

Kaiso(119-672) можно объяснить необходимостью димеризации Kaiso для эффективного связывания ко-репрессора. Также нельзя исключать вероятного нарушения сворачивания белков при удалении их N-концевых фрагментов, что иногда наблюдается в ДДС.

Полученные результаты свидетельствуют, что механизм взаимодействия NCoR с BTB-содержащим белком Kaiso принципиально отличается от описанного ранее взаимодействия с BCL6, в случае которого с N-концевым BTB-доменом BCL6 связывается консервативный С-концевой участок ко-репрессора (рис. 2б). В отличие от BCL6, в описанном нами взаимодействии N-концевой район NCoR(146-373) связывается с С-концевыми C2H2 цинковыми пальцами Kaiso. При этом в данном взаимодействии не принимает участие BTB-домен Kaiso, однако в предыдущей работе

[2] методом GST pull-down показано, что ВТВ-домен Kaiso взаимодействует с полноразмерным NCoR. Вероятно, ВТВ-домен Kaiso также имеет низкоаффинные сайты связывания в С-концевой области NCoR, детектируемые при высоких концентрациях белка в *in vitro* системе.

Таким образом, NCoR может одновременно взаимодействовать с белками BCL6 и Kaiso, что может увеличивать эффективность рекрутирования NCoR-зависимых репрессорных комплексов на регуляторные элементы, связанные с Kaiso и BCL6. В целом полученные нами данные свидетельствуют о том, что NCoR может использовать различные домены для взаимодействия с транскрипционными факторами, что, вероятно, определяет широкий спектр потенциальных ДНК-связывающих транскрипционных факторов-партнеров NCoR-зависимых репрессорных комплексов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Prokhortchouk A., Hendrich B., Jorgensen H., et al.* // Genes and Development. 2001. V. 15,13. P. 1613–1618.
2. *Yoon H., Chan D., Reynolds A., et al.* // Molecular Cell. 2003. V. 12,3. P. 723–734.
3. *Mottis A., Mouchiroud L., Auwerx J.* // Genes and Development. 2013. V. 27,8. P. 819–835.
4. *Yu J., Li Y., Ishizuka T., et al.* // EMBO Journal. 2003. V. 22,13. P. 3403–3410.
5. *Guenther M.G., Barak O., Lazar M. A.* // Molecular and Cellular biology. 2001. V. 21,18. P. 6091–6101.
6. *Horlein A.J., Naar A.M., Heinzel T., et al.* // Nature. 1995. V. 377. P. 397–404.
7. *Park D.M., Li J., Okamoto H., et al.* // Cell Cycle. 2007. V. 6,4. P. 467–470.
8. *Ahmad K., Melnick A., Lax S., et al.* // Molecular Cell. 2003. V. 12,6. P. 1551–1564.
9. *Bilic I., Koesters C., Unger B., et al.* // Nature Immunology. 2006. V. 7,4. P. 392–400.
10. *Huynh K.D., Bardwell V.J.* // Oncogene. 1998. V. 17. P. 2473–2484.
11. *Zacharchenko T., Wright S.* // IUCrJ. 2021. V. 8. P. 154–160.
12. *Buck-Koehntop B.A., Stanfield R.L., Ekiert D.C., et al.* // PNAS. 2012. V. 109,38. P. 15229–15234.
13. *Jumper J., Evans R., Pritzel A., et al.* // Nature. 2021. V. 596,7873. P. 583–589.

THE NCoR CO-REPRESSOR INTERACTS WITH THE KAISO TRANSCRIPTION FACTOR THROUGH A MECHANISM DIFFERENT FROM THAT OF BCL6 INTERACTION

K. I. Balagurov^{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: kostya.chamomilla@gmail.com*

The vertebrate transcription factor Kaiso binds specifically to methylated DNA sequences using C2H2-type zinc fingers. In addition to C2H2-domains, the ВТВ/POZ domain, which forms homodimers, is located at the N-terminus of Kaiso. Kaiso, like several other well-studied ВТВ/POZ proteins, including BCL6, interacts with the NCoR (nuclear co-repressor) protein, which determines the landing of transcriptional repressive complexes on chromatin. Using the yeast two-hybrid system, we have shown that the N-terminal domain of NCoR interacts with the C-terminal zinc fingers of Kaiso, and not with its ВТВ/POZ domain, as previously assumed. The results obtained demonstrate that NCoR interacts with various transcription factor domains, which can increase the efficiency of attracting NCoR-dependent repressor complexes to regulatory regions of the genome.

Keywords: co-repressors, zinc-finger proteins, C2H2-domains, transcription factors, transcriptional repression