

УДК 575.22:595.773.4

ИЗОФОРМЫ ТТК ВЗАИМОДЕЙСТВУЮТ С ДВУМЯ УЧАСТКАМИ БЕЛКА MER-1 *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© 2021 г. К. Ю. Халисова¹, И. С. Осадчий¹,
академик РАН П. Г. Георгиев¹, О. Г. Максименко^{1,*}

Поступило 13.01.2021 г.
После доработки 06.03.2021 г.
Принято к публикации 06.03.2021 г.

Белок ТТК дрозофилы участвует в процессах клеточной дифференцировки и представлен двумя изоформами, ТТК69 и ТТК88, которые имеют общий N-концевой ВТВ домен и различные С-концевые последовательности. Ранее было показано, что ТТК69 репрессирует активность энхансеров и промоторов за счет рекрутирования на хроматин консервативного среди высших эукариот NURD-комплекса. В составе NURD-комплекса дрозофилы был найден белок Мер-1, который взаимодействует с С-концевым районом ТТК69. В настоящем исследовании с помощью дрожжевой двугибридной системы нами были картированы взаимодействующие участки белков ТТК и Мер-1. В уникальных С-концевых участках изоформ ТТК были определены районы, способные взаимодействовать одновременно с двумя участками белка Мер-1. Полученные результаты демонстрируют, что несмотря на низкую гомологию С-концевых районов, изоформы ТТК сохраняют способность взаимодействовать с двумя консервативными участками белка Мер-1, что предполагает функциональную значимость такого взаимодействия.

Ключевые слова: NURD-комплекс, репрессия транскрипции, белок-белковые взаимодействия

DOI: 10.31857/S2686738921030069

Ген *tramtrack* (ТТК) был исходно идентифицирован как негативный регулятор раннего эмбриогенеза [1, 2]. Ген кодирует две изоформы, ТТК69 и ТТК88, которые отличаются по С-концевому домену, включающему два цинковых пальца С2Н2-типа [3]. Изоформа ТТК69 участвует в регуляции транскрипции в процессе эмбриогенеза, определяет закладку и развитие нервной системы, спецификацию мышечных клеток, развитие трахеи [4, 5]. Изоформа ТТК88 определяет закладку фоторецепторов и сенсорных органов на более поздних этапах развития дрозофилы [5, 6]. Изоформы ТТК имеют N-концевой ВТВ-домен, который формирует гомо-мультимерные комплексы и также может взаимодействовать с ВТВ-доменами других регуляторных факторов дрозофилы [7].

Ранее было показано, что изоформа ТТК69 может рекрутировать на регуляторные элементы консервативный среди высших эукариот NURD-

комплекс за счет взаимодействия с белком Мер-1 [8]. NURD-комплекс локализуется в области энхансеров и промоторов и выполняет до конца неисследованные функции в негативной регуляции транскрипции [9]. Предполагается, что ТТК репрессирует транскрипцию, участвуя в рекрутировании на регуляторные элементы NURD-комплекса. Целью настоящего исследования стало исследование взаимодействия изоформ ТТК69 и ТТК88 с одним из компонентов NURD-комплекса, Мер-1.

Ранее было показано [10], что специфичный для изоформы ТТК69 район (392–500 а.о.) взаимодействует с Мер-1. Для уточнения участка взаимодействия между белками была использована дрожжевая двугибридная система, успешно примененная для исследования взаимодействий между ТТК69 и Мер-1 в предыдущей работе [10].

В первую очередь было исследовано взаимодействие между полноразмерными белками, так как ранее было описано взаимодействие только для изоформы ТТК69, а ТТК88 оставалась практически неизученной. В результате нами было не только подтверждено взаимодействие между ТТК69 и Мер-1, но и показано взаимодействие с Мер-1 изоформы ТТК88 (рис. 1).

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

*e-mail: maksog@mail.ru

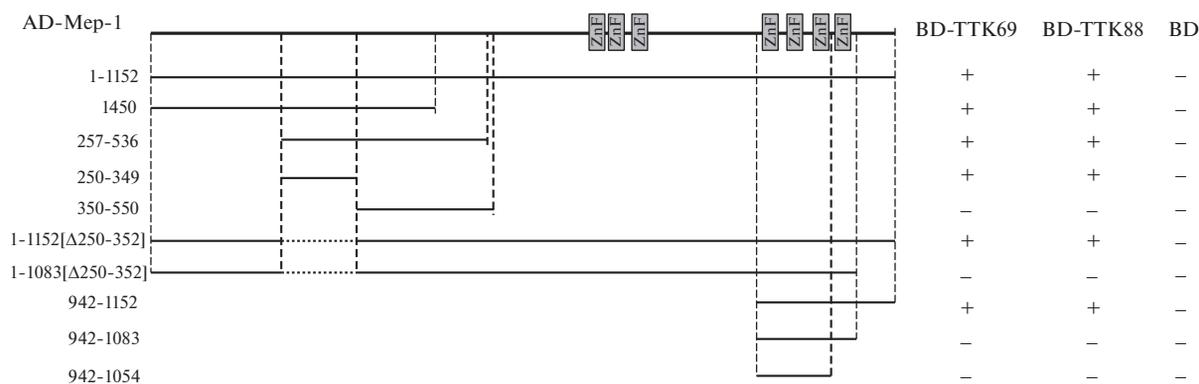


Рис. 1. Определение в составе белка Мер-1 участка взаимодействия с изоформами ТТК в дрожжевой двугибридной системе. Фрагменты Мер-1 были соединены с активационным доменом GAL4 (AD), белки ТТК69 и ТТК88 – с ДНК-связывающим доменом GAL4 (BD). На схеме показано расположение в молекуле белка Мер-1 цинковых пальцев С2Н2-типа прямоугольниками, линии отражают различные фрагменты белка, аминокислотные остатки соответствующих фрагментов указаны слева. Результаты представлены в колонках справа, где + и – означают наличие или отсутствие взаимодействия соответственно. В качестве отрицательного контроля использовали ДНК-связывающий (BD) домен белка GAL4.

Для картирования района в составе белка Мер-1, с которым взаимодействуют изоформы ТТК, на основе вектора для дрожжевой двугибридной системы были получены различные делеционные производные гена *mer-1*, кодирующие отдельные части белка. Белок Мер-1 из известных доменов содержит два кластера цинковых пальцев С2Н2-типа – между 681 и 766 а.о. (3 С2Н2-домена) и между 949 и 1083 а.о. (4 С2Н2-домена). В результате проведенного анализа было показано, что обе изоформы ТТК взаимодействуют с ранее описанной частью белка Мер-1, расположенной между 257 и 536 а.о. (рис. 1). Более точное картирование в дрожжевой двугибридной системе позволило локализовать участок в 100 а.о. (250–349) Мер-1, ответственный за данное взаимодействие. Этот участок Мер-1 высоко консервативен среди видов *Drosophila*, но имеет сравнительно небольшую гомологию при сравнении с другими представителями двукрылых.

Неожиданно оказалось, что делеция 250–349 а.о. в полном белке Мер-1 не нарушает взаимодействие с изоформами ТТК (рис. 1). Этот результат дал основание предполагать, что в белке Мер-1 присутствует второй домен, участвующий в установлении данного взаимодействия. При одновременной делеции 250–349 а.о. и С-концевой части белка Мер-1 взаимодействие с изоформами ТТК исчезает. Этот результат свидетельствует о том, что второй взаимодействующий участок расположен в С-концевой части белка Мер-1, который содержит четыре цинковых пальца С2Н2-типа и неструктурированный район длиной 69 а.о. между 1083 и 1152 а.о. (рис. 1). Для более точного картирования участка, участвующего во взаимодей-

ствии, были созданы производные, экспрессирующие разные делеционные производные в С-концевом домене (942–1152 а.о.) белка Мер-1. Результаты, полученные в дрожжевой двугибридной системе, показали, что изоформы ТТК эффективно взаимодействуют с локализованным С-концевым районом (69 а.о.) белка Мер-1. Стоит отметить, что этот район белка Мер-1 является консервативным среди всех насекомых.

Следующей задачей было картирование взаимодействующих с Мер-1 участков в составе изоформ ТТК (рис. 2).

Согласно [10] во взаимодействии с Мер-1 участвует район 392–500 а.о. изоформы ТТК69. Нами был подтвержден этот результат (рис. 2а). Параллельно мы определили, что в составе изоформы ТТК88 с Мер-1 взаимодействует район между 500 и 642 а.о. (рис. 2б). Неожиданно оказалось, что один и тот же район у изоформ ТТК обеспечивает взаимодействие с обеими участками Мер-1. Интересно, что взаимодействующие с Мер-1 участки в составе ТТК69 и ТТК88 практически не содержат протяженных областей гомологии и не имеют выраженных структурных особенностей (рис. 2в). Белки с ВТВ-доменами представлены у большинства животных, при этом каждый ген может кодировать много изоформ, у которых ВТВ-домен – общий, а переменная часть возникает путем множественных дупликаций одного и того же экзона, которые становятся альтернативными частями разных изоформ. В процессе эволюции данные экзоны сильно расходятся, в результате переменные части изоформ начинают выполнять разные функции. У изоформ ТТК такие участки тоже сильно разошлись и при сравнении можно выявить только единич-

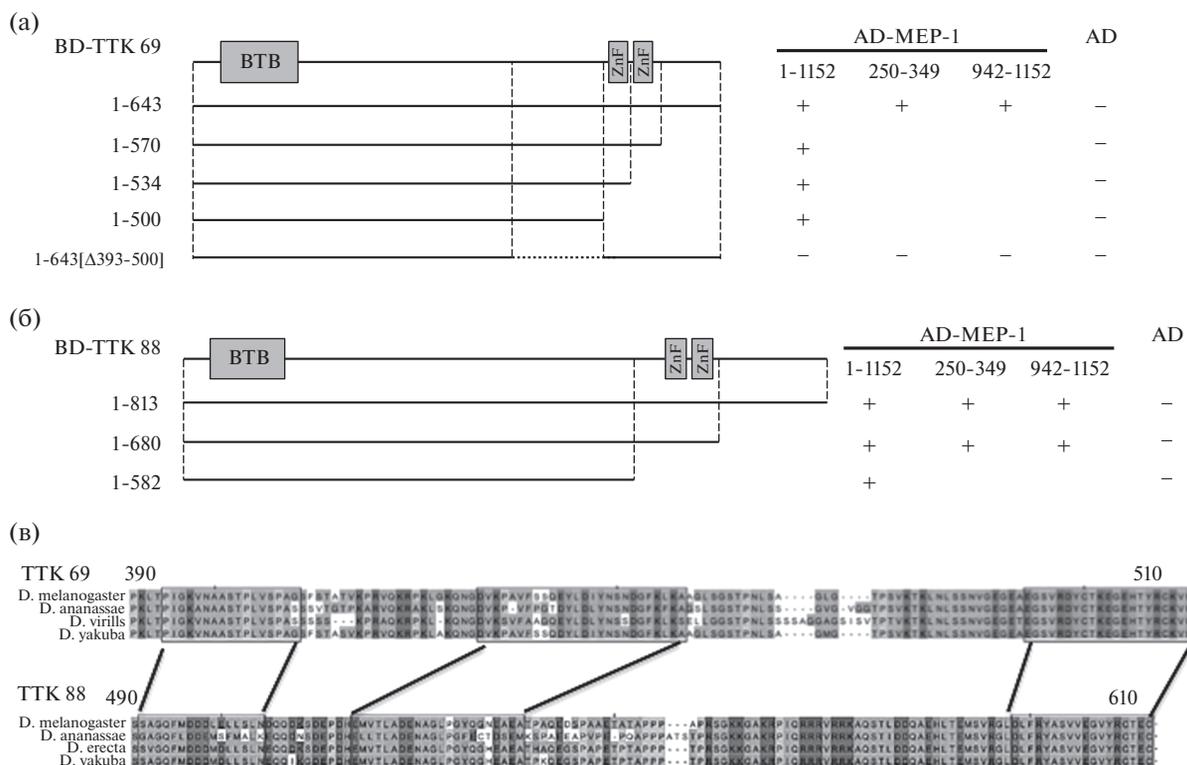


Рис. 2. Определение в составе белков ТТК69 (а) и ТТК88 (б) участков взаимодействия с белком Мер-1 в дрожжевой двугибридной системе. На схеме прямоугольниками показано расположение в молекулах белков ТТК69 и ТТК88 ВТВ-домена и цинковых пальцев С2Н2-типа. Остальные обозначения аналогичны Рис. 1. (в) Сравнение участков белков ТТК69 и ТТК88, прилегающих к цинковым пальцам и необходимых для взаимодействия с Мер-1. Рамками и линиями показаны участки, предположительно имеющие общее происхождение.

ные совпадающие аминокислоты в составе дуплицированного экзона. Поэтому тот факт, что несмотря на отсутствие выраженной гомологии (рис. 2в), участки двух изоформ ТТК сохранили взаимодействие с Мер-1 говорит о важности данного взаимодействия в процессе функционирования обеих изоформ ТТК.

Наличие двух взаимодействующих с изоформами ТТК участков в составе Мер-1 увеличивает специфичность и эффективность рекрутирования NURD-комплекса на хроматиновые мишени. Различные функции изоформ ТТК определяются их уникальными С-концевыми районами, которые отвечают за специфичность связывания каждой из изоформ с определенными регуляторными элементами. При этом С-концевые домены при отсутствии выраженной гомологии сохранили способность взаимодействовать с одними и теми же участками Мер-1. Таким образом, полученные результаты демонстрируют, что взаимодействие ТТК с Мер-1 является важным в процессе рекрутирования NURD-комплекса и репрессии транскрипции целевых генов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 18-04-01272.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Harrison S.D., Travers A.A. // EMBO J. 1990. V. 9. P. 207–216.
- Brown J.L., Wu C. // Development. 1993. V. 117. P. 45–58.
- Read D., Manley J.L. // EMBO J. 1992. V. 11. P. 1035–1044.
- Ciglar L., Girardot C., Wilczyński B., et al. // Development. 2014. V. 141. P. 2633–2643.
- Badenhorst P., Finch J. T., Travers A.A. // Mech. Dev. 2002. V. 117. P. 87–101.
- Lai Z.C., Harrison S.D., Karim F., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1996. V. 93. P. 5025–5030.
- Bonchuk A., Denisov S., Georgiev P., et al. // J Mol Biol. 2011. V. 412. P. 423–436.
- Kunert N., Wagner E., Murawska M., et al. // EMBO J. 2009. V. 28. P. 533–544.
- Bracken A.P., Brien G.L., Verrijzer C.P. // Genes Dev. 2019. V. 33. P. 936–959.
- Reddy B.A., Bajpe P.K., Bassett A., et al. // Mol Cell Biol. 2010. V. 30. P. 5234–5244.

TTK ISOFORMS INTERACT WITH TWO REGIONS OF THE MEP-1 PROTEIN OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*

K. Y. Khalisova^a, I. S. Osadchiy^a, Academician of the RAS P. G. Georgiev^a, and O. G. Maksimenko^{a,#}

^a *Institute of Gene Biology RAS, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: maksog@mail.ru*

The *Drosophila* TTK protein is involved in the processes of cell differentiation and is represented by two isoforms, TTK69 and TTK88, which have a common N-terminal BTB domain and different C-terminal sequences. Earlier, it was shown that TTK69 represses the activity of enhancers and promoters by recruiting a conserved among higher eukaryotes NURD complex to chromatin. The Mep-1 protein was found in the NURD-complex of *Drosophila*, and this protein can interact with the C-terminal region of TTK69. In the present study, using the yeast two-hybrid system, we mapped the interacting regions of the TTK and Mep-1 proteins. We identified regions in the unique C-terminal regions of TTK isoforms that can interact simultaneously with two regions of the Mep-1 protein. The results demonstrate that, despite the low homology of the C-terminal regions, the TTK isoform retains the ability to interact with two conserved regions of the Mep-1 protein, which suggests the functional significance of this interaction.

Keywords: NURD complex, transcriptional repression, protein-protein interactions