

УДК 575.22:595.773.4

ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ К ГОМОДИМЕРИЗАЦИИ N-КОНЦЕВЫХ ДОМЕНОВ БЕЛКОВ С КЛАСТЕРАМИ ЦИНКОВЫХ ПАЛЬЦЕВ ЧЕЛОВЕКА

© 2021 г. Д. В. Фурсенко¹, академик РАН П. Г. Георгиев¹, А. Н. Бончук^{1,*}

Поступило 31.03.2021 г.

После доработки 20.04.2021 г.

Принято к публикации 22.04.2021 г.

СТСФ принадлежит к большому семейству транскрипционных факторов, имеющих кластеры доменов цинковых пальцев C2H2 типа (C2H2 белки), и является основным архитектурным белком млекопитающих. На N-конце СТСФ человека находится гомодимеризующийся неструктурированный домен, который может участвовать в организации дистанционных взаимодействий. Для исследования существования аналогичных N-концевых доменов у других C2H2 белков человека была использована дрожжевая двугибридная система. В общей сложности способность неструктурированных N-концевых доменов к гомодимеризации была исследована для шести C2H2 белков человека, имеющих сходный с СТСФ профиль экспрессии. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии способности к гомодимеризации у выбранных участков. С другой стороны, три C2H2 белка, содержащие на N-конце структурированный DUF3669 домен в дрожжевой двугибридной системе, демонстрируют способность как к гомо-, так и к гетеродимеризации.

Ключевые слова: цинковые пальцы C2H2 типа, гомодимеризация, DUF3669 домен, белки с цинковыми пальцами, факторы транскрипции

DOI: 10.31857/S2686738921040090

СТСФ, наиболее изученный архитектурный белок млекопитающих, состоит из неструктурированных концевых областей и расположенного в центральной части кластера из 11 цинковых пальцев C2H2 типа (C2H2 домены) [1]. В составе СТСФ человека 3–7 C2H2 домены отвечают за специфичное связывание с консенсусной последовательностью длиной 15 п.н. [2]. Кластер C2H2 доменов – единственная консервативная часть белка СТСФ, имеющая высокий уровень гомологии у большей части позвоночных, насекомых и некоторых нематод [3]. Белки с кластерами из 5 и более C2H2 доменов (C2H2 белки) обладают способностью к специфическому узнаванию протяженных последовательностей ДНК и у разных таксонов составляют значительную часть ДНК связывающих транскрипционных факторов, функции которых остаются до настоящего времени слабо исследованными [1, 4].

Среди порядка 170 C2H2 белков дрозофилы многие выполняют архитектурную функцию,

поддерживая дистанционные взаимодействия. У большинства, помимо кластера C2H2 доменов, на N-конце имеются структурированные домены, способные к специфичной гомодимеризации [5]. Было показано, что гомодимеризация N-доменов у таких белков необходима для поддержания дистанционных взаимодействий [4, 6]. Мы предполагаем, что доля C2H2 белков млекопитающих, выполняющих архитектурную функцию, гораздо больше, чем принято считать сейчас, и что механизм поддержания дистанционных взаимодействий принципиально не отличается между млекопитающими и насекомыми. Однако только сравнительно небольшая часть C2H2 белков млекопитающих содержит структурированные N-концевые домены SCAN или VTB, способные к гомодимеризации [4]. VTB домены формируют преимущественно стабильные гомодимеры [7], в то время как для SCAN доменов была показана способность к гомодимеризации и выборочной гетеродимеризации [8]. Для еще одного малоизученного домена, DUF3669, была выборочно показана способность к гомо- и гетеродимеризации [9].

Отсутствие охарактеризованных димеризующих N-концевых доменов у C2H2 белков млекопитающих можно объяснить способностью не-

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

*e-mail: bonchuk_a@genebiology.ru

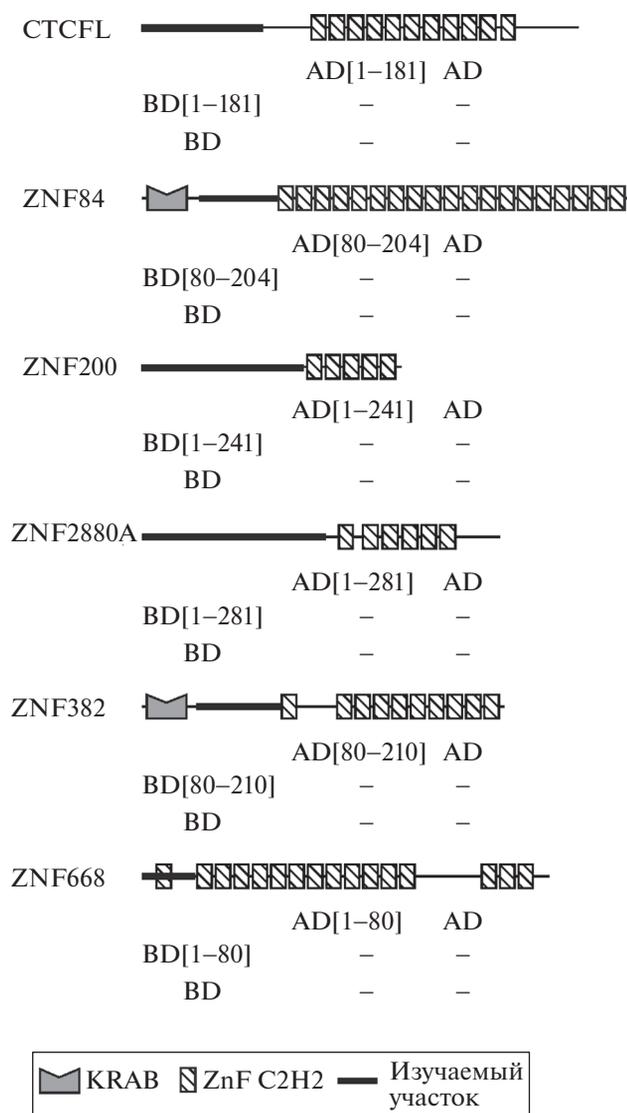


Рис. 1. Исследование способности к гомодимеризации N-концевых участков C2H2-содержащих белков человека в дрожжевой двугибридной системе. Для проверки способности к гомодимеризации наблюдали способность к росту на селективной среде дрожжей, коэкспрессирующих N-концевой участок, соединенный с ДНК-связывающим доменом GAL4 (BD) или с активационным доменом GAL4 (AD). На схеме доменной структуры белков исследованный участок обозначен толстой линией, ниже указаны соответствующие номера аминокислотных остатков. Ниже представлены результаты дрожжевой двугибридной системы, где + и - означают наличие или отсутствие взаимодействия между соответствующими конструкциями. В качестве положительного контроля использовалась способность к гомодимеризации N-конца белка CTCF человека (1-264 а.к.), а в качестве отрицательного контроля – тестирование на наличие взаимодействия только с активационным (AD) или ДНК-связывающим (BD) доменом белка GAL4. KRAB – Krüppel associated box домен, ZnF C2H2 – домен цинковых пальцев C2H2-типа.

структурированных доменов к олигомеризации, как было нами показано для основного архитектурного белка человека CTCF и его ортологов [10]. С целью проверки этого предположения были выбраны шесть C2H2 белков, которые имеют паттерн экспрессии, похожий на таковой для белка CTCF (рис. 1). Также в анализ были взяты три C2H2 белка с N-концевым DUF3669 доменом, для более полной характеристики димеризующей способности данного домена (рис. 2а).

Исследование способности N-концевых доменов к гомодимеризации было проведено с использованием дрожжевой двугибридной системы. Ранее данный метод позволил идентифицировать способность к гомодимеризации неструктурированного N-концевого участка белка CTCF разных видов животных [10]. В отличие от неструктурированного N-концевого домена CTCF человека, димеризация которого служила положительным контролем в данном эксперименте, не было обнаружено взаимодействия N-концевых участков белков ZNF84, ZNF200, ZNF280A, ZNF382, ZNF668, а также CTCFL, паралога CTCF (рис. 1). Последний результат представляет особый интерес, поскольку CTCFL имеет значительное сходство с CTCF в структуре цинковых пальцев и может связывать его сайты, однако экспрессируется преимущественно в семенниках млекопитающих [11]. Предполагается, что CTCFL участвует в регуляции архитектурных функций CTCF, подменяя его в определенных случаях на сайтах и тем самым нарушая формирование хроматиновых петель.

У человека предсказано 7 белков, имеющих DUF3669 домен, однако только у трех из них (ZNF282, ZNF398 и ZNF777) на C-конце есть кластер из 5 и более цинковых пальцев C2H2-типа (рис. 2а, слева). Данные белки находятся в одном кластере в геноме человека и многих других видов животных, а аминокислотная последовательность самого домена DUF3669 этих белков у человека имеет высокую степень гомологии (рис. 2б). Помимо высокой степени сходства, в дрожжевой двугибридной системе домен DUF3669 у всех взятых в работу C2H2 белков способен не только к гомо-, но и к гетеродимеризации (рис. 2а, справа).

Наличие способности к специфическому связыванию длинных мотивов ДНК и к гомодимеризации являются отличительными свойствами архитектурных белков дрозофилы. У млекопитающих из ~800 C2H2 белков лишь 84 имеют димеризующие SCAN или VTB домены [1]. В нашей работе мы подтвердили и показали, что малоизученный N-концевой домен DUF3669 так же способен к образованию гомо- и гетеро- димеров у трех C2H2 белков человека. Согласно модели, разработанной на дрозофиле, предполагается,

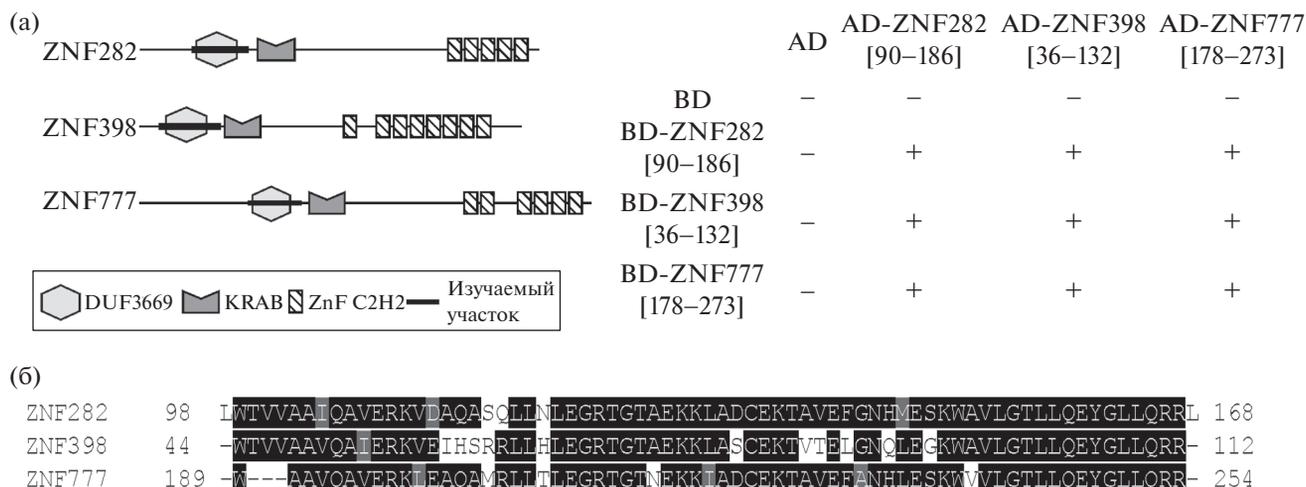


Рис. 2. (а) Доменные структуры DUF3669-содержащих белков (слева) и результаты дрожжевой двугибридной системы (справа). Результаты представлены аналогично рис. 1. AD – активационный домен, BD – ДНК-связывающий домен. (б) Выравнивание аминокислотных последовательностей доменов DUF3669 белков ZNF282, ZNF398, ZNF777 человека. DUF3669 – домен с неизвестной функцией 3669, KRAB – Krüppel associated box домен, ZnF C2H2 – домен цинковых пальцев C2H2-типа.

что большая часть C2H2 белков участвует в организации архитектуры хромосом. Преимущественная гомодимеризация N-концевых доменов C2H2 белков дрозофилы является ключевой в организации специфичных дистанционных взаимодействий [12]. Однако среди C2H2 белков человека димеризация N-концевых доменов имеет незначительное распространение по сравнению с аналогичными белками дрозофилы [4]. Также результаты нашей работы не подтверждают предположения, что среди C2H2 белков человека широко распространена гомодимеризация за счет неструктурированного N-концевого участка. Стоит отметить, что у наиболее исследованного архитектурного/инсуляторного белка дрозофилы Su(Hw) на N-конце также не было обнаружено домена, способного к гомодимеризации [13]. Возможно, но слабо исследованным, механизмом гомодимеризации для таких белков может являться участие самих C2H2 доменов в этом процессе. Так, было показано, что белок YY1 человека гомодимеризуется с участием C2H2 доменов [14]. Таким образом, требуется дальнейшее изучение механизмов формирования гомодимеров у C2H2 белков человека.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Максименко О.Г., Фурсенко Д.В., Белова Е.В. и др. // Acta Naturae. 2021. V. 13. № 1. P. 80–95.

2. Hashimoto H., Wang D., Horton J.R., et al. // Mol. Cell. 2017. V. 66. № 5. P. 711–720.

3. Heger P., Marin B., Bartkuhn M., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2012. V. 109. № 43. P. 17507–17512.

4. Федотова А.А., Бончук А.Н., Могила В.А., и др. // Acta Naturae. 2017. V. 9. P. 47–58.

5. Bonchuk A., Boyko K., Fedotova A., et al. // Nucleic Acids Res. 2021. V. 49. № 4. P. 2375–2389.

6. Zolotarev N., Fedotova A., Kyrchanova O., et al. // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. № 15. P. 7228–7241.

7. Stogios P.J., Downs G.S., Jauhal J.J.S., et al. // Genome Biol. 2005. V. 6. № 10. P. 1–18.

8. Liang Y., Huimei Hong F., Ganesan P., et al. // Nucleic Acids Res. 2012. V. 40. № 17. P. 8721–8732.

9. Al Chiblak M., Steinbeck F., Thiesen H.J., et al. // BMC Mol. Cell Biol. 2019. V. 20. № 1. P. 1–23.

10. Bonchuk A., Kamalyan S., Mariasina S., et al. // Sci. Rep. 2020. V. 10. № 1. P. 2677.

11. Loukinov D.I., Pugacheva E., Vatolin S., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2002. V. 99. № 10. P. 6806–6811.

12. Maksimenko O., Kyrchanova O., Klimenko N., et al. // Biochim. Biophys. Acta. Gene Regul. Mech. 2020. V. 1863. № 1. P. 1863.

13. Melnikova L., Kostyuchenko M., Molodina V., et al. // Open Biol. 2017. V. 7. № 10. P. 170150.

14. Li L., Williams P., Ren W., et al. // Nat. Chem. Biol. 2021. V. 17. № 2. P. 161–168.

STUDY OF THE N-TERMINAL DOMAINS HOMODIMERIZATION IN HUMAN PROTEINS WITH ZINC FINGER CLUSTERS

D. V. Fursenko^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*

CTCF belongs to a large family of transcription factors with clusters of C2H2 type zinc finger domains (C2H2 proteins) and is a main architectural protein in mammals. Human CTCF has a homodimerizing unstructured domain at the N-terminus which is involved in long-distance interactions. To test the presence of similar N-terminal domains in other human C2H2 proteins, a yeast two-hybrid system was used. In total, the ability of unstructured N-terminal domains to homodimerize was investigated for six human C2H2 proteins with an expression profile similar to CTCF. The data indicate lack of the homodimerization ability of these domains. On the other hand, three C2H2 proteins containing the structured domain DUF3669 at the N-terminus demonstrated homo-, as well as heterodimerization activity.

Keywords: C2H2 proteins, dimerization, DUF3669, ZFP, transcription factor