

УДК 577.218

ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РОЛИ *IN VIVO* МУТАЦИЙ В ВТВ ДОМЕНЕ БЕЛКА CP190 DROSOPHILA MELANOGASTER

© 2023 г. А. А. Федотова¹, академик РАН П. Г. Георгиев¹, А. Н. Бончук^{1,*}

Поступило 24.10.2022 г.

После доработки 15.11.2022 г.

Принято к публикации 17.11.2022 г.

Транскрипционный фактор CP190 дрозофилы является одним из ключевых белков, определяющих активность промоторов генов домашнего хозяйства и инсуляторов. CP190 имеет N-концевой ВТВ домен, обеспечивающий димеризацию. Большая часть из известных архитектурных белков дрозофилы взаимодействуют с гидрофобной пептид-связывающей бороздкой в ВТВ домене, что, как предполагается, является одним из механизмов привлечения CP190 на регуляторные элементы. Для исследования роли ВТВ домена во взаимодействии с архитектурными белками были получены трансгенные линии, экспрессирующие варианты CP190 с мутациями в пептид-связывающей бороздке, что нарушает их взаимодействие с архитектурными белками. В результате проведенных исследований было выяснено, что мутации в ВТВ домене не влияют на связывание белка CP190 с политенными хромосомами. Таким образом, наши исследования подтверждают полученные ранее данные о том, что CP190 привлекается на регуляторные элементы при помощи нескольких транскрипционных факторов, взаимодействующих помимо ВТВ с другими доменами CP190.

Ключевые слова: архитектурные белки C2H2, цинковые пальцы, фактор транскрипции, домен POZ

DOI: 10.31857/S2686738922600868, **EDN:** LZNLTА

Регуляция транскрипции у высших эукариот определяется функциональными взаимодействиями между энхансерами и промоторами, которые регулируются инсуляторами [1]. Белок CP190 участвует в организации большой группы активных промоторов генов домашнего хозяйства и известных инсуляторов дрозофилы [2, 3]. CP190 принимает участие в привлечении комплексов ремоделирования, открывающих хроматин в области регуляторных элементов [4, 5]. На N-конце белка CP190 находится ВТВ домен (рис. 1а), который образует стабильные гомодимеры и имеет высокий уровень гомологии с ВТВ доменами ДНК-связывающих транскрипционных факторов млекопитающих, таких как Bcl6 и PLZF [6, 7]. В центральной части белка CP190 находятся D и M домены, а также 4 цинковых пальца C2H2 типа (рис. 1а), все эти домены, как и ВТВ домен, участвуют только в белок-белковых взаимодействиях и не принимают участие в связывании с ДНК [8]. Таким образом, в отличие от ВТВ-содержащих транскрипционных факторов млекопитающих, CP190 связывается с регуляторными элементами

не напрямую, а с помощью ДНК-связывающих архитектурных белков [5, 9–12]. Было показано, что наиболее изученные архитектурные белки CTCF, Pita и Su(Hw) взаимодействуют с гидрофобной пептид-связывающей бороздкой в ВТВ домене белка CP190 [13]. Аналогичным образом ВТВ домены белков BCL6 и PLZF млекопитающих взаимодействуют с ко-репрессорными комплексами [14, 15]. В то время как Pita и Su(Hw) взаимодействуют только с ВТВ доменом [5, 11], белок CTCF одновременно взаимодействует с ВТВ, D и M доменами [10, 13]. Наконец, существует большая группа архитектурных белков, которые взаимодействуют только с D и M доменами белка CP190 [13].

Целью настоящей работы является исследование функциональной роли взаимодействия ВТВ домена с архитектурными белками. Ранее было показано, что мутации V7A, V114A и L118A в гидрофобной бороздке имели наибольшее влияние на взаимодействие ВТВ домена с архитектурными белками Su(Hw), Pita и dCTCF [13]. Для исследования функциональной роли гидрофобной бороздки в рекрутировании CP190 на хроматин и осуществлении других функций CP190, были созданы генетические конструкции, содержащие кДНК, кодирующую либо CP190 дикого типа (CP190^{wt}), либо мутанты CP190 с 3×FLAG-эпитопом на C-конце под контролем сильного полиу-

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

*e-mail: bonchuk_a@genebiology.ru

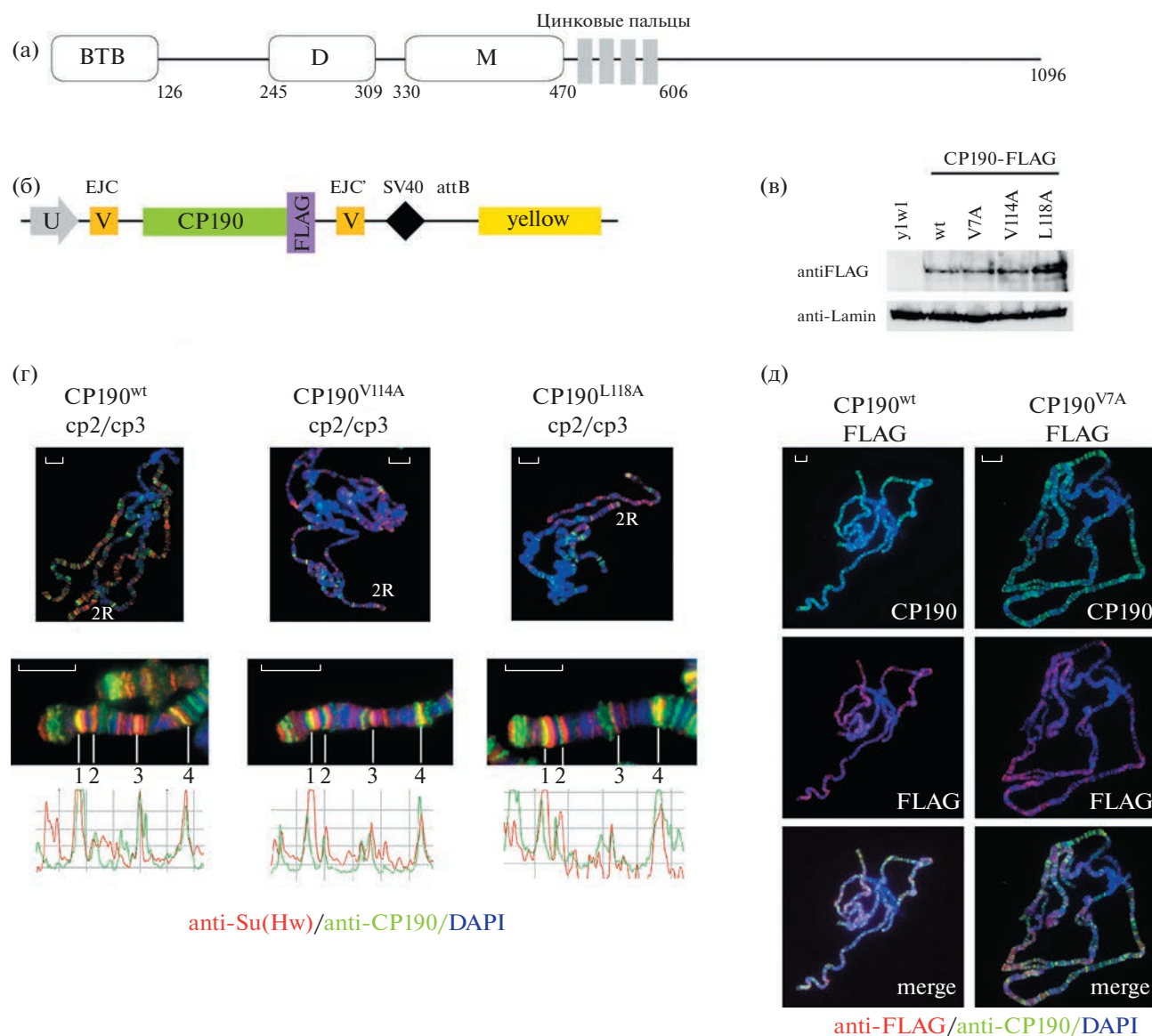


Рис. 1. Исследование влияния мутаций в BTB домене белка CP190 на его связывание с геномными сайтами. (а) Доменная структура белка CP190. Указаны порядковые номера аминокислотных остатков, соответствующих границам доменов. (б) Схема генетических конструкций, используемых для создания трансгенных мух, экспрессирующих варианты белка CP190, слитые с FLAG-эпитопом. U – промотор Ubi63E; V – интрон; EJC – сайт соединения экзонов; SV40 – сигнал полиаденилирования SV40; attB – сайт ϕ C31-опосредованной рекомбинации; yellow – безынtronный вариант гена yellow, используемый в качестве селективного маркера. (в) Вестерн-блот белковых экстрактов из 2–3 дневных самцов, экспрессирующих различные варианты белка CP190, окрашенные антителами к FLAG-эпитопу или ламину. (г) Политенные хромосомы слюнных желез личинок мух, экспрессирующих CP190^{wt}, CP190^{V114A}, CP190^{L118A} на фоне мутаций $Cr190^2/Cr190^3$. Политенные хромосомы были окрашены антителами к белкам Su(Hw) [11] и CP190 [5]. Цифрами 1–4 показано положение одних и тех же геномных локусов на разных препаратах политенных хромосом. (д) Политенные хромосомы личинок мух, экспрессирующих слитые с FLAG белки CP190^{wt} и CP190^{V7A}, окрашенные антителами к CP190 и FLAG. Масштаб 10 μ м.

биквитинового (Ubi) промотора с широким профилем экспрессии (*Ubi-CP190^{wt}*, *Ubi-CP190^{V114A}*, *Ubi-CP190^{L118A}*, *Ubi-CP190^{V7A}*) (рис. 16). Для экспрессии CP190 белков все трансгенные векторы были вставлены в одну и ту же область 38D на 2-й хромосоме с использованием системы интеграции на основе ϕ C31 [16]. С этой целью трансгенные конструкции были инъектированы в эмбрионы преblastодермы линии, которая содержит сайт для

специфической системы интеграции в локусе 38D. Появившихся взрослых особей F0 скрещивали с мухами *uasw¹¹⁸*, и потомство, несущее трансген в области 38D, идентифицировали по экспрессии маркерного гена yellow (пигментированная кутикула тела и крыльев).

Вестерн-блоттинг показал, что все варианты CP190 имели схожий уровень экспрессии в транс-

генных линиях мух (рис. 1в). Для проверки того, как мутации в домене ВТВ влияют на функцию CP190 *in vivo*, были использованы ранее охарактеризованные ноль-мутации в гене *Crp190*: *Crp190²* и *Crp190³* [17]. У гетерозигот *Crp190²/Crp190³* наблюдается личиночная смертность, но некоторые из мутантов доживают до поздней кукольной стадии [17].

Каждый трансген на второй хромосоме вводили на комбинацию мутаций *Crp190²/Crp190³* (3 хромосома) с использованием линии, содержащей балансерные 2 и 3 хромосомы (*CyO/If*; *Tm6,Tb/Sb*). Даже введение одной копии конструкции CP190^{wt}-FLAG приводило к полному восстановлению нормальной жизнеспособности *Crp190²/Crp190³* мух. Линия *Ubi-CP190^{wt}/Ubi-CP190^{wt}*; *Crp190²/Crp190³* была стабильна на протяжении не менее 10 поколений без изменений жизнеспособности или фенотипа. Аналогичные результаты были получены с трансгенами, экспрессирующими два мутантных варианта белка CP190 (*CP190^{V114A}* и *CP190^{L118A}*). Таким образом, мутантные CP190^{V114A} и CP190^{L118A} белки являются полностью функциональными, как CP190^{wt}.

Для сравнения связывания с хроматином CP190^{wt} и мутантных белков была использована модельная система политечных хромосом слюнных желез личинок. Белок CP190 связывается с большей частью междисков политечных хромосом, которые преимущественно соответствуют промоторам генов домашнего хозяйства [18, 19]. Было показано, что экспрессирующийся с трансгена белок CP190^{wt}-FLAG демонстрирует паттерн связывания на политечных хромосомах, сходный с эндогенным белком CP190 (рис. 1д). Анализ распределения сайтов связывания мутантных белков CP190^{V114A} и CP190^{L118A} на политечных хромосомах показал, что связывание мутантных белков не отличалось от CP190^{wt} на фоне генетических мутаций *Crp190²/Crp190³* (рис. 1г). Таким образом, результаты, полученные на политечных хромосомах, показывают, что мутанты CP190 сохраняют способность эффективно связываться с хроматином.

В отличие CP190^{V114A} и CP190^{L118A}, экспрессия CP190^{V7A} не приводит к восстановлению нормальной выживаемости *Crp190²/Crp190³* линии. В потомстве от скрещивания *Ubi-CP190^{V7A}/CyO*; *Crp190²/CyO* и *Ubi-CP190^{V7A}/CyO*; *Crp190³/CyO* было получено среди 1748 потомков только 8 мух с генотипом *Ubi-CP190^{V7A}/CyO*; *Crp190²/Crp190³*. Гомозиготы *Crp190²/Crp190³* в основном погибали на стадии личинки. Выжившие *Ubi-CP190^{V7A}/CyO*; *Crp190²/Crp190³* имаго умерли через 5–8 дней после вылупления из куколок. При этом они были бесплодны и имели множественные фенотипические изменения: нарушение

пропорций тела, уплощение грудной клетки, пузыри на крыльях. В отличие от мух, экспрессирующих белок CP190^{wt}, не было найдено мух, гомозиготных по конструкции *Ubi-CP190^{V7A}*, что позволяет предположить доминантно-негативное влияние сильной экспрессии мутантного CP190^{V7A} белка на жизнеспособность мух.

Поскольку личинки *Crp190²/Crp190³*, экспрессирующие CP190^{V7A}-FLAG, имели редуцированные слюнные железы и низкую политенизацию хромосом, было проведено сравнение связывания CP190^{wt}-FLAG и CP190^{V7A}-FLAG с политечными хромосомами у гетерозиготных *Crp190²/+* личинок (рис. 1д). Существует вероятность того, что мутантный белок может димеризоваться с белком дикого типа через ВТВ домен, но недавнее исследование [20] демонстрирует, что ВТВ-домены предпочтительно моментально образуют гомодимеры со своей копией, транслируемой с той же мРНК. Меченные FLAG-эпитопом белки CP190^{wt} и CP190^{V7A} связывались со всеми видимыми сайтами CP190 на политечных хромосомах. Таким образом, замена V7A не влияет на стабильность мутантного белка или его способность связывать регуляторные элементы. Следовательно, мутация V7A нарушает функции белка CP190, которые не связаны с его способностью связываться с регуляторными элементами. Можно предположить, что мутация V7A приводит к нарушению связывания ВТВ домена с неизвестным транскрипционным комплексом. В таком случае связывание с промоторами мутантного белка CP190^{V7A} может негативно влиять на транскрипцию.

В целом результаты демонстрируют, что нарушение взаимодействия архитектурных белков с ВТВ^{V114A} или ВТВ^{L118A} не влияет на способность мутантных вариантов CP190 связываться с геномными регуляторными элементами. Это можно объяснить тем, что CP190 имеет два дополнительных домена, D и M, которые участвуют во взаимодействии CP190 с некоторыми архитектурными белками [9, 13] (рис. 1а). Согласно нашей модели промоторы и инсультаторы состоят из различных комбинаций мотивов связывания архитектурных белков, значительная часть из которых может независимо рекрутировать белок CP190 [1]. В результате создается стабильный механизм функционирования регуляторных элементов, при котором ВТВ, D и M домены белка CP190 одновременно взаимодействуют с несколькими архитектурными белками на каждом промоторе.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kyrchanova O., Georgiev P. // *Int J Mol Sci.* 2021. V. 22. № 2. P. 671.
2. Pai C.Y., Lei E.P., Ghosh D., Corces V.G. // *Mol. Cell.* 2004. V. 16. P. 737–748.
3. Cubenas-Potts C., Rowley M.J., Lyu X., et al. // *Nucleic Acids Res.* 2017. V. 45. № 4. P. 1714–1730.
4. Bartkuhn M., Straub T., Herold M., et al. // *EMBO J.* 2009. V. 28. P. 877–888.
5. Sabirov M., Kyrchanova O., Pokholkova G., et al. // *Epigenetics Chromatin.* 2021. V. 22. № 14 (1). P. 16.
6. Plevock K.M., Galletta B.J., Slep K.C., Rusan N.M. // *PLoS One.* 2015. V. 10. e0144174.
7. Bonchuk A., Denisov S., Georgiev P., Maksimenko O. // *J Mol Biol.* 2011. V. 23. № 412 (3). P. 423–36.
8. Oliver D., Sheehan B., South H. et al. // *BMC Cell Biol.* 2010. V. 11. P. 101.
9. Maksimenko O., Bartkuhn M., Stakhov V. et al. // *Genome Res.* 2015. V. 25. P. 89–99.
10. Kyrchanova O., Klimenko N., Postika N., et al. // *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.* 2021. V. 1864. № 10. 194733.
11. Melnikova L., Kostyuchenko M., Molodina V., et al. // *Chromosoma.* 2018. V. 127. № 1. P. 59–71.
12. Bag I., Chen S., Rosin L.F., et al. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. P. 4170.
13. Sabirov M., Popovich A., Boyko K., et al. // *Int J Mol Sci.* 2021. V. 22. № 22. 12400.
14. Ahmad K., Melnick A., Lax S., et al. // *Mol. Cell.* 2003. V. 12. P. 1551–1564.
15. Ghetu A., Corcoran C., Cerchietti L., et al. // *Mol. Cell.* 2008. V. 29. P. 384–391.
16. Bischof J., Maeda R., Hediger M., et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007. V. 27. № 104 (9). P. 3312–7.
17. Butcher R., Chodagam S., Basto R., et al. // *J Cell Sci.* 2004. V. 117. Pt. 7. P. 1191–9.
18. Demakova O., Demakov S., Boldyreva L., et al. // *Chromosoma.* 2020. V. 129. № 1. P. 25–44.
19. Zykova T., Levitsky V., Belyaeva E., et al. // *Curr. Genomics.* 2018. V. 19. № 3. P. 179–191.
20. Bertolini M. et al. // *Science.* 2021. V. 371. P. 57–64.

STUDY OF THE *IN VIVO* FUNCTIONAL ROLE OF MUTATIONS IN THE BTB DOMAIN OF THE CP190 PROTEIN OF DROSOPHILA MELANOGASTER

A. A. Fedotova^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

The *Drosophila* transcription factor CP190 is one of the key proteins that determine the activity of house-keeping gene promoters and insulators. CP190 has an N-terminal BTB domain that allows for dimerization. Many of known *Drosophila* architectural proteins interact with the hydrophobic peptide-binding groove in the BTB domain, which is supposed to be one of the mechanisms for recruiting CP190 to regulatory elements. To study the role of the BTB domain in the interaction with architectural proteins, we obtained transgenic flies expressing CP190 variants with mutations in the peptide-binding groove, which disrupts their interaction with architectural proteins. As a result of the studies, it was found that mutations in the BTB domain do not affect binding of the CP190 protein to polytene chromosomes. Thus, our studies confirm the previously obtained data that CP190 is recruited to regulatory elements by several transcription factors interacting in addition to BTB with other CP190 domains.

Keywords: architectural C2H2 proteins, zinc-finger proteins, transcription factor, POZ domain