

# БИОХИМИЯ, БИОФИЗИКА, МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 575.22:595.773.4

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЖДУ БЕЛКОМ MOD(MDG4)-67.2 И ДРУГИМИ ИЗОФОРМАМИ БЕЛКА MOD(MDG4) В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ *Drosophila melanogaster*

М. В. Костюченко, Л. С. Мельникова, академик РАН П. Г. Георгиев, А. К. Головин

Поступило 25.01.2019 г.

Обнаружено, что в эмбриональных клетках *D. melanogaster* изоформы белка Mod(mdg4) способны взаимодействовать между собой через домены ВТВ. Однако такое неспецифичное взаимодействие разрушается при рекрутировании белковых комплексов на сайты хроматина.

**Ключевые слова:** Mod(mdg4), домены ВТВ, межбелковые взаимодействия, дрожжевая двугибридная система, коиммунопреципитация.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524862247-254>

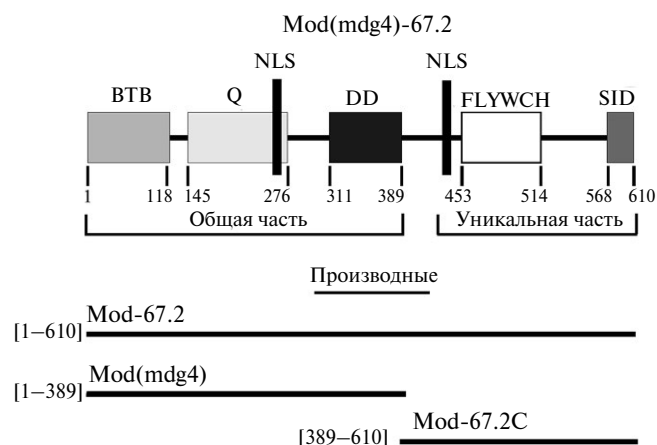
У *Drosophila melanogaster* ген *mod(mdg4)*, также известный как *E(var)3-93D*, кодирует большое семейство белковых изоформ, влияющих на разные биологические процессы [1–3]. Изоформы *mod(mdg4)* содержат общую N-концевую последовательность размером 402 ак, которая кодируется четырьмя 5'-экзонами. Однако С-концевые последовательности изоформ, кодируемые альтернативными 3'-экзонами, различны. Большинство С-концов содержит консервативный белковый мотив Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>, названный FLYWCH [4, 5]. Все мРНК для альтернативных изоформ Mod(mdg4) в основном образуются путём транс-сплайсинга [6]. Общая N-концевая последовательность изоформ включает [1, 7] домен ВТВ/POZ, димеризующий домен и обогащённый глутамином район (рис. 1).

В представленной работе мы изучили механизм взаимодействия между белком Mod(mdg4)-67.2 (изоформа Т) и 11 другими изоформами белка Mod(mdg4). Мы показали, что в эмбриональных клетках дрозофилы различные изоформы Mod(mdg4) могут взаимодействовать между собой через ВТВ-домены, однако такое неспецифичное взаимодействие гораздо слабее, чем взаимодействие С-конца белка Mod(mdg4)-67.2 с белком Su(Hw). Взаимодействие между ВТВ-доменами разрушается при рекрутировании белковых комплексов на хроматин.

Институт биологии гена Российской Академии наук,  
Москва

\*E-mail: lsm73@mail.ru

До сих пор детально изучены функциональные роли только двух изоформ Mod(mdg4). Изоформа Mod(mdg4)-56.3/MNM (Modifier of Mdg4 in Meiosis) необходима для нормального мейоза у самцов [3], тогда как изоформа Mod(mdg4)-67.2 является одним из основных компонентов инсультатора Su(Hw) и необходима для его энхансерблокирующей актив-



**Рис. 1.** Схематическое изображение доменов белка Mod(mdg4)-67.2 и его производных форм. ВТВ — домен ВТВ/POZ, отвечающий за гомо- и гетеродимеризацию; Q — обогащённый глутамином район; NLS — сигнал ядерной локализации; DD — домен, отвечающий за димеризацию белков локуса *mod(mdg4)*; FLYWCH — домен “цинковый палец” типа FLYWCH; SID — домен, взаимодействующий с белком Su(Hw). Линии под схемой показывают, какие домены белка входили в состав использованных в работе производных. Цифрами обозначены аминокислотные остатки, ограничивающие домены и производные формы.

ности [2]. Инсуляторы дрозофилы и позвоночных были идентифицированы как регуляторные элементы, которые препятствуют взаимодействию энхансера с промотором, если расположены между ними [8]. Ещё одним основным компонентом инсулятора Su(Hw) является белок CP190 [9]. Взаимодействие Mod(mdg4)-67.2 с белками Su(Hw) и CP190 способствует стабильному связыванию инсуляторного комплекса со специфичными сайтами хроматина [10, 11]. Значительную роль в таких взаимодействиях и рекрутировании самого белка на Su(Hw)-зависимые сайты играют ВТВ- и Q-домены Mod(mdg4)-67.2 [11].

Транскрипционные комплексы, с которыми взаимодействуют иные изоформы белка Mod(mdg4), ещё не описаны. Изучение мутантных производных различных изоформ и локализация их сайтов связывания на полигенных хромосомах показывают, что функциональная специфичность изоформ Mod(mdg4) определяется (рис. 1) их вариабельными С-концевыми последовательностями [1, 3]. Эти уникальные для каждой изоформы последовательности, вероятно, могут специфично взаимодействовать с различными белками [2, 12, 13].

Общий для всех изоформ домен ВТВ/POZ, участвующий в белок-белковых взаимодействиях, консервативен. Он обнаружен в составе множества транскрипционных факторов, участвующих в развитии, ремоделировании хроматина, функционировании инсуляторов и канцерогенезе [14]. Все известные домены ВТВ млекопитающих формируют облигатные димеры и реже тетрамеры [14]. Домен ВТВ Mod(mdg4) относится к группе “tk”, которая содержит несколько высококонсервативных последовательностей, не найденных в других ВТВ-доменах [15]. Домены ВТВ из группы “tk” способны мультемеризоваться [15]. Это позволяет предположить, что изоформы Mod(mdg4) могут участвовать в поддержании взаимодействий между дистанцированными сайтами отдельных локусов или хромосомами [15]. Однако вопрос о взаимодействии различных изоформ белка Mod(mdg4) между собой до сих пор оставался открытым.

Целью представленной работы явилось изучение механизма взаимодействия белка Mod(mdg4)-67.2 с другими изоформами, кодируемыми локусом *mod(mdg4)*.

В первую очередь мы протестировали прямые взаимодействия между белком Mod(mdg4)-67.2 и рядом изоформ Mod(mdg4) с помощью дрожжевой дигибридной системы (ДДС, табл. 1). Для этого на основе вектора pGBT9, содержащего промотор гена *Adh* и ДНК-связывающий домен дрожжевого белка

GAL4, создали рекомбинантные конструкции, экспрессирующие в дрожжах разные изоформы белка Mod(mdg4) — pGBT9–Mod\*. Кодировшую полноразмерный белок Mod(mdg4)-67.2 кДНК (рис. 1) клонировали в вектор pGDA, в составе которого присутствовал активационный домен GAL4 (pGDA–Mod-67.2). Эффективность экспрессии тестируемых белков в составе конструкций подтвердили с помощью Вестерн-блоттинга. Для детекции использовали антитела против ДНК-связывающего домена GAL4 (в конструкциях pGBT9–Mod\*) или антитела против уникального С-концевого домена белка Mod(mdg4)-67.2 (в конструкции pGDA–Mod-67.2). Затем дрожжи штамма pJ69-4A котрансформировали конструкциями pGBT9–Mod\* и pGDA–Mod-67.2. Трансформированные клетки высевали на три вида селективной среды. Две из них не содержали триптофан (продуцируется pGBT9), лейцин (продуцируется pGDA) и гистидин (продуцируется в результате белок-белковых взаимодействий), но в них добавляли 3-аминотриазол, конкурент гистидина в путях дрожжевого метаболизма, в концентрации 5 и 10 мМ/л (среды –3<sup>5</sup> и –3<sup>10</sup>). Третья не содержала 3-аминотриазол, но была дополнительно лишена аденина (среда –4). В результате мы наблюдали рост клонов на всех видах селективной среды при всех тестируемых взаимодействиях (табл. 1). Для подтверждения выявленных взаимодействий мы провели реципрокные эксперименты: кДНК выбранных изоформ Mod(mdg4) клонировали в вектор pGDA, а кДНК белка Mod(mdg4)-64.2 переклонировали в вектор pGBT9. Затем взаимодействия между белками тестировали в соответствии с описанной выше схемой экспериментов. Полученные результаты полностью подтвердили наличие межбелковых взаимодействий. Следовательно, в ДДС все взятые нами изоформы Mod(mdg4) были способны напрямую взаимодействовать с белком Mod(mdg4)-67.2.

Чтобы подтвердить полученные методом ДДС данные, мы протестировали взаимодействие между белком Mod(mdg4)-67.2 и выбранными изоформами в экспериментах по иммунопреципитации белков (IP) из лизата культуры эмбриональных клеток дрозофилы S2. Для использования в IP кДНК изучаемых белков клонировали в экспрессионный вектор pAc5.1. Белок Mod(mdg4)-67.2 экспрессировался в общей рамке считывания с эпитопом FLAG, а прочие изоформы белка Mod(mdg4) — в общей рамке с эпитопом V5. Далее культуру S2-клеток котрансфицировали полученными конструкциями. Для иммунопреципитации использовали антитела к эпитопу FLAG, а для детекции в процессе Вестерн-блот-

**Таблица 1.** Результаты прямых экспериментов по тестированию взаимодействий между белком Mod(mdg4)-67.2 и другими изоформами белка Mod(mdg4) в ДДС

pGBT9-Mod*	pGDA- Mod-67.2 <sup>1-610</sup> (T)	pGDA- Mod(mdg4) <sup>1-389</sup>	pGDA- Mod-67.2C <sup>389-610</sup>
Mod-67.2 <sup>1-610</sup> (T)	+	+	+
Mod(mdg4) <sup>1-389</sup>	+	+	—
Mod-67.2C <sup>389-610</sup>	+	—	+/-
Mod-67.2ΔBTV	+	—	+/-
Mod-67.2ΔQ	+	+	—
Mod-54.6 (B)	+	+	—
Mod-56.3 (H)	+	+	—
Mod-51.3 (J)	+	+	—
Mod-52.1 (R)	+	+	—
Mod-62.3 (V)	+	+	—
Mod-54.8 (Y)	+	+	—
Mod-64.9 (E)	+	+	—
Mod-52.2 (L)	+	+	—
Mod-55.3(M)	+	+	—
Mod-53.3 (A)	+	+	—
Mod-58.0 (C)	+	+	—
Mod-B C end	+/-	—	—
Mod-H C end	—	—	—
Mod-I C end	—	—	—
Mod-J C end	—	—	—
Mod-R C end	—	—	—
Mod-V C end	—	—	—
Mod-Y C end	—	—	—
Mod-E C end	—	—	—
Mod-L C end	—	—	—
Mod-M C end	—	—	—
Mod-A C end	—	—	—
Mod-C C end	—	—	—

Примечание. Мод\* обозначает варианты белка Mod(mdg4)-67.2 и других изоформ Mod(mdg4), указанные в левой колонке. “C end” — производная включала только уникальный С-концевой район изоформы Mod(mdg4). Обозначения белковых доменов и последовательностей белка Mod(mdg4)-67.2, как и на рис. 1. Сила взаимодействия: “+” сильное взаимодействие, “+/-” слабое взаимодействие, “—” отсутствие взаимодействия. В реципрокных экспериментах были получены аналогичные результаты.

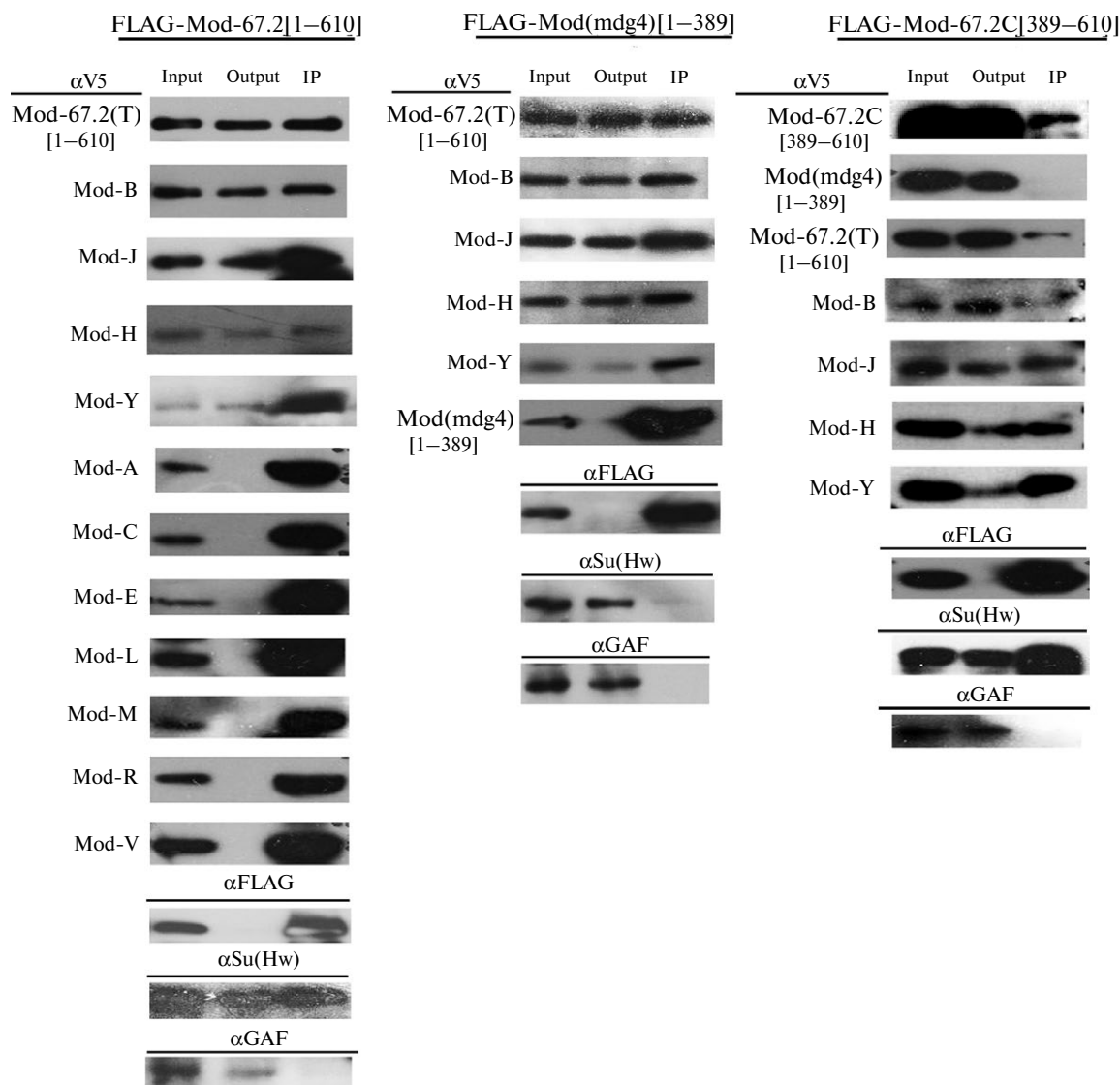
тинга — антитела к эпитопу V5. Полученные результаты подтвердили присутствие изучаемых белков в составе общего комплекса (рис. 2). Таким образом, в клетках S2 дрозофилы может формироваться мультибелковый комплекс, включающий разные изоформы белка Mod(mdg4).

Чтобы выяснить, может ли мультимеризация доменов ВТВ служить механизмом, обеспечивающим

образование такого комплекса, с помощью ДДС мы протестировали (рис. 1) возможность гомодимеризации общей для всех изоформ части белка (производная Mod(mdg4)<sup>1-389</sup>) и взаимодействие Mod(mdg4)<sup>1-389</sup> с полноразмерными изоформами Mod(mdg4) (табл. 1). Общая часть белка взаимодействовала сама с собой именно через ВТВ-домены, поскольку при делеции одного из доменов ВТВ

(производная Mod-67.2ΔВТВ) такое взаимодействие исчезло. Однако при делеции Q-домена (производная Mod-67.2ΔQ), общие части Mod(mdg4) по-прежнему взаимодействовали. Также мы наблюдали прямое взаимодействие между производной Mod(mdg4)<sup>1–389</sup> и всеми полноразмерными изоформами. Значит, специфичные С-концевые последовательности изоформ не влияли на димеризацию доменов ВТВ. Полученные в ДДС результаты полностью подтвердились в IP (рис. 2).

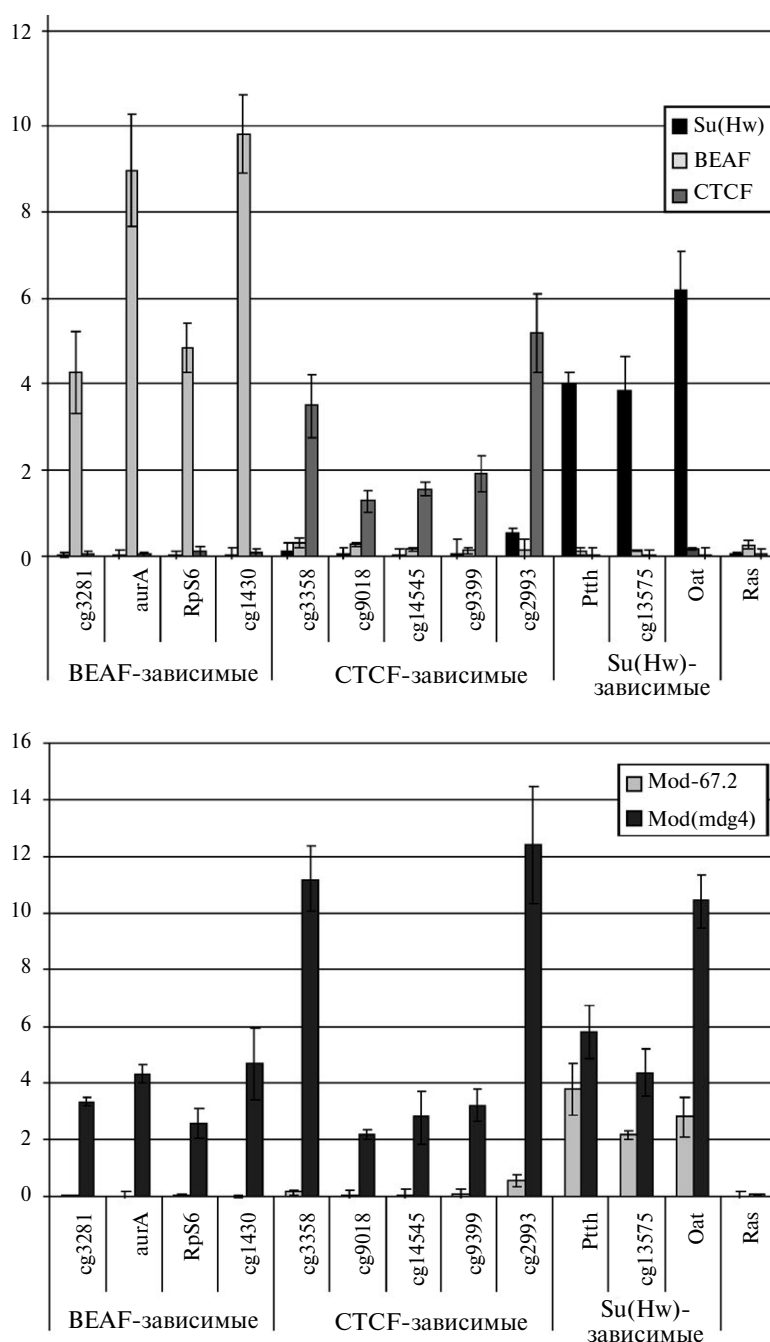
Далее мы решили выяснить, может ли С-концевая последовательность белка Mod(mdg4)-67.2 обеспечивать не только его связывание с Su(Hw)-зависимым комплексом, но также избирательно взаимодействовать с какими-либо изоформами Mod(mdg4). В первую очередь с помощью ДДС мы протестировали взаимодействие между доменами SID и FLYWCH белка Mod(mdg4)-67.2 (вариант Mod-67.2C<sup>389–610</sup>) и уникальными С-концевыми последовательностями прочих изоформ (см. табл. 1).



**Рис. 2.** Проверка взаимодействия между белками методом IP из лизата S2-клеток. Иммунопреципитацию проводили с помощью антител против эпитопа FLAG, детекцию — с помощью антител против эпитопа V5 (αV5). Input — 10% от лизата клеток, использованного в IP; Output — супернатант после IP. Наличие полосы в колонке IP означает, что тестируемые белки входят в состав общего комплекса. Перед загрузкой в SDS-PAGE для Вестерн-блоттинга IP-комплексы промывали 300 мМ KCl-содержащими буферами. Мембрану PVDF последовательно гибридизовали с антителами против эпитопа V5 для тестирования присутствия белка в общем комплексе с производными Mod(mdg4)-67.2; против эпитопа FLAG (αFLAG) для контроля загрузки белка; против белка Su(Hw) (αSu(Hw)) в качестве положительного контроля; против белка GAF (αGAF) в качестве отрицательного контроля. Результаты контролей для всех тестируемых взаимодействий в каждом столбце были аналогичными.

Мы обнаружили, что уникальный С-концевой район белка Mod(mdg4)-67.2 был способен лишь к слабой гомодимеризации и не взаимодействовал с С-концевыми районами ни одной из 11 тестируемых изоформ. Далее мы проверили способность производного варианта Mod-67.2C<sup>389–610</sup> связываться с общей

частью белка и с полноразмерным белком Mod(mdg4)-67.2. Оказалось, что С-концевой район Mod(mdg4)-67.2 хорошо взаимодействует с полноразмерным белком, но не с его общей частью. Интересно, что при делеции ВТВ-домена такое взаимодействие ослабевало, а при делеции домена Q



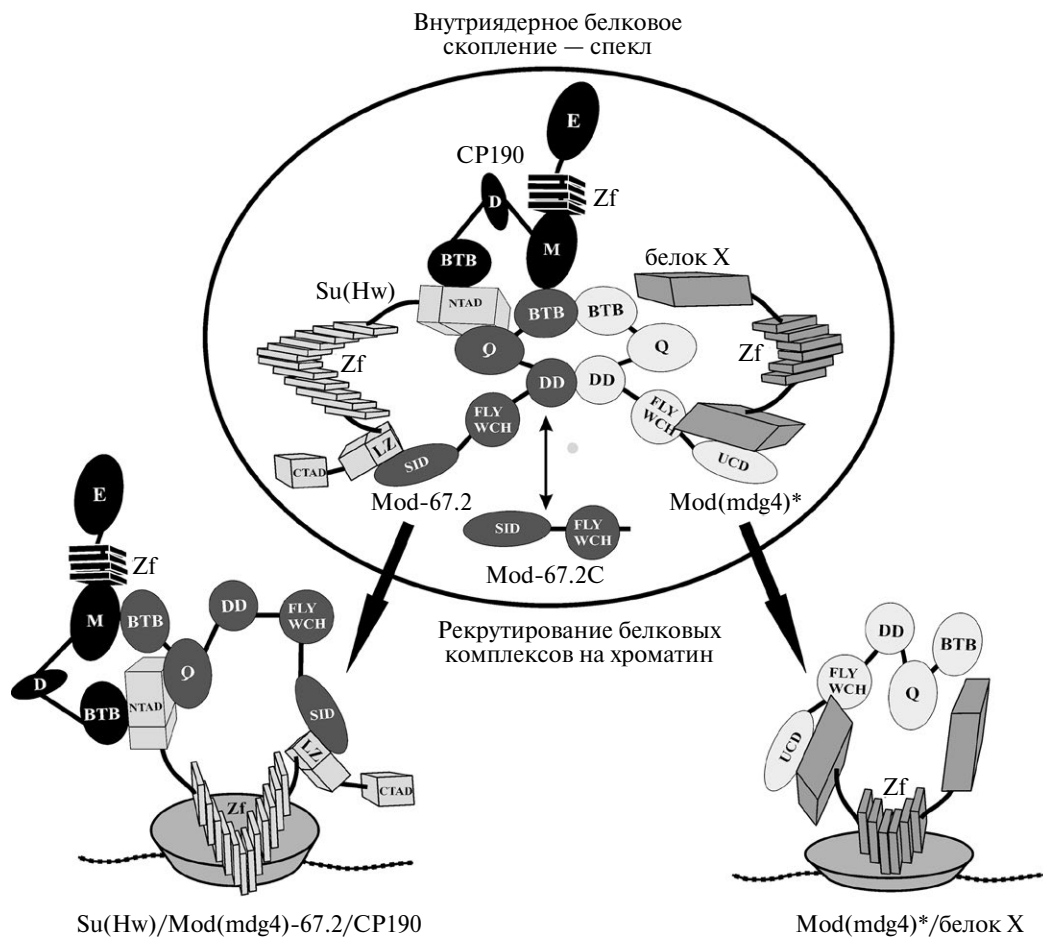
**Рис. 3.** Тестирование связывания белков с сайтами хроматина методом ChIP. В экспериментах использовали антитела против белков Su(Hw), BEAF-32, dCTCF, С-концевой области белка Mod(mdg4)-67.2 (Mod-67.2) и общей для всех изоформ Mod(mdg4) области белка (Mod(mdg4)). Кодированная область гена *ras64B* (Ras) использовалась как контроль, не содержащий сайты связывания тестируемых белков. Процент обогащения иммунопреципитированной ДНК (ось ординат) рассчитывали относительно количества загруженной ДНК. Внизу (ось абсцисс) указаны названия генов, возле которых расположены сайты связывания соответствующих белков, определённые в проекте modENCODE. Показано стандартное отклонение для трёх независимых биологических повторностей.

полностью исчезало. Вероятно, конформация белка Mod(mdg4)-67.2 влияет на взаимодействие С-концевой части с полноразмерным белком. Поскольку производная Mod-67.2C<sup>389–610</sup> взаимодействовала с полноразмерным белком Mod(mdg4)-67.2, мы протестировали её связывание с остальными 11 полноразмерными изоформами, но не обнаружили прямого взаимодействия между этими белками (табл. 1).

Однако в клетках S2 не связывающиеся напрямую белки могут взаимодействовать с общими для них белками-посредниками и входить в состав одного и того же мультибелкового комплекса. Поэтому мы протестировали взаимодействие С-концевой последовательности белка Mod(mdg4)-67.2 с полноразмерными изоформами Т, В, Н, J и Y в IP. Неожиданно оказалось, что все эти изоформы могут присутствовать в общем комплексе с производной Mod-67.2C<sup>389–610</sup>. Таким образом, результаты

IP-экспериментов позволяют предположить, что взаимодействие белка Mod(mdg4)-67.2 с разными изоформами белка Mod(mdg4) будет обеспечивать его рекрутирование не только на Su(Hw)-зависимые сайты, но и на другие регуляторные последовательности генома.

Чтобы проверить такую возможность, с помощью иммунопреципитации хроматина (ChIP) мы протестировали связывание белка Mod(mdg4)-67.2 и других изоформ Mod(mdg4) с различными регуляторными последовательностями генома в клетках S2. Мы использовали сайты связывания BEAF-, CTCF- и Su(Hw)-зависимых белковых комплексов (рис. 3). Сначала мы показали, что белок Su(Hw), с которым через домен SID взаимодействует Mod(mdg4)-67.2, присутствовал только на Su(Hw)-зависимых сайтах. Затем мы выяснили, как с выбранными последовательностями ДНК связывается



**Рис. 4.** Модель взаимодействия между белком Mod(mdg4)-67.2 и другими изоформами Mod(mdg4) в клетках S2. NTAD — N-концевой кислый домен; CTAD — C-концевой кислый домен; Zf — домены “цинковых пальцев”; LZ — мотив с “лейциновой молнией”; BTB — домен BTB/POZ; D — домен, обогащённый аспарагином; M — домен, взаимодействующий с centrosomой; E — C-концевой домен, обогащённый глутамином; Mod(mdg4)\* — разные изоформы белка Mod(mdg4); белок X — белки с “цинковыми пальцами”, взаимодействующие с изоформами Mod(mdg4). Остальные обозначения как на рис. 1.

белок Mod(mdg4)-67.2 и все иные изоформы Mod(mdg4). Для детекции Mod(mdg4)-67.2 мы использовали антитела против его уникальной С-концевой последовательности, а для детекции других изоформ Mod(mdg4) — антитела к общей части белка. В результате мы обнаружили, что белок Mod(mdg4)-67.2, как и белок Su(Hw), присутствовал только на Su(Hw)-зависимых последовательностях. В то же время мы детектировали наличие разных изоформ Mod(mdg4) на всех тестируемых сайтах. Следовательно, наблюдаемое нами IP-взаимодействие между Mod(mdg4)-67.2 и другими изоформами Mod(mdg4) не способствует рекрутированию белка Mod(mdg4)-67.2 в какие-либо регуляторные комплексы. Белок Mod(mdg4)-67.2 рекрутируется на хроматин исключительно за счёт взаимодействия его уникального SID-домена с белком Su(Hw).

Вероятно, в IP-экспериментах мы наблюдали взаимодействие между полноразмерным белком Mod(mdg4)-67.2 или его С-концом и другими изоформами Mod(mdg4), реализуемое во внутриядерных белковых скоплениях — спеклах (рис. 4). Спеклы являются своеобразными “депо” различных, в том числе и инсультных, белков. В них происходит предварительная сборка Su(Hw)-зависимого и других регуляторных белковых комплексов, которые затем, уже частично сформировавшись, связываются с хроматином. Находящиеся в спеклах изоформы Mod(mdg4) неспецифично взаимодействуют с Mod(mdg4)-67.2 через домены ВТВ. Однако такое взаимодействие гораздо слабее, чем специфичное взаимодействие между белками Mod(mdg4)-67.2 и Su(Hw), оно распадается при связывании Su(Hw)-зависимого комплекса с ДНК (рис. 4). Таким образом, реализуемые через домены ВТВ неспецифичные взаимодействия между разными изоформами белка Mod(mdg4) хотя и возникают в клетке, не играют роли в формировании функциональных белковых комплексов.

Кроме того, мы выяснили, что уникальный С-концевой район белка Mod(mdg4)-67.2 способен взаимодействовать только с самим белком Mod(mdg4)-67.2. Возможно, это имеет значение для организации дистанционных взаимодействий между Su(Hw)-зависимыми комплексами. В этом случае С-концы белка Mod(mdg4)-67.2 в составе дистанцированных комплексов отвечают за специфичность контактов, а взаимодействие между ВТВ-доменами Mod(mdg4)-67.2 стабилизирует их.

**Источник финансирования.** Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда 18–14–00295.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Buchner K., Roth P., Schotta G., et al. // *Genetics*. 2000. V. 155. № 1. P. 141–157.
2. Gerasimova T.I., Gdula D.A., Gerasimov D.V., Simonova O., Corces V.G. // *Cell*. 1995. V. 82. № 4. P. 587–597.
3. Thomas S.E., Soltani-Bejnood M., Roth P., et al. // *Cell*. 2005. V. 123. № 4. P. 555–568. DOI: 10.1016/j.cell.2005.08.043.
4. Dorn R., Krauss V. // *Genetica*. 2003. V. 117. № 2/3. P. 165–177.
5. Gause M., Morcillo P., Dorsett D. // *Mol. Cell Biol.* 2001. V. 21. № 14. P. 4807–4817. DOI: 10.1128/MCB.21.14.4807–4817.2001.
6. Dorn R., Reuter G., Loewendorf A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. № 17. P. 9724–9729. DOI: 10.1073/pnas.151268698.
7. Golovnin A., Mazur A., Kopantseva M., et al. // *Mol. Cell Biol.* 2007. V. 27. № 3. P. 963–974. DOI: 10.1128/MCB.00795–06.
8. Kyrchanova O., Georgiev P. // *FEBS Lett.* 2014. V. 588. № 1. P. 8–14. DOI: 10.1016/j.febslet.2013.10.039.
9. Pai C.Y., Lei E.P., Ghosh D., Corces V.G. // *Mol. Cell*. 2004. V. 16. № 5. P. 737–748. DOI: 10.1016/j.molcel.2004.11.004.
10. Melnikova L., Kostyuchenko M., Molodina V., et al. // *Open Biol.* 2017. V. 7. № 10. pii: 170150. DOI: 10.1098/rsob.170150.
11. Melnikova L., Kostyuchenko M., Molodina V., Parshikov A., Georgiev P., Golovnin A. // *Chromosoma*. 2018. V. 127. № 1. P. 59–71. DOI: 10.1007/s00412–017–0645–6.
12. Головнин А.К., Дворецкий Е.В., Костюченко М.В., Шамсутдинов М.Ф., Георгиев П.Г., Мельникова Л.С. // *ДАН*. 2013. Т. 452. № 1. С. 96–99. DOI: 10.7868/S0869565213260216.
13. Головнин А.К., Костюченко М.В., Георгиев П.Г., Мельникова Л.С. // *ДАН*. 2016. Т. 466. № 1. С. 101–104. DOI: 10.7868/S0869565216010254.
14. Stogios P.J., Downs G.S., Jauhal J.J., et al. // *Genome Biol.* 2005. V. 6. № 10. R82. DOI: 10.1186/gb-2005–6–10-r82.
15. Bonchuk A., Denisov S., Georgiev P., Maksimenko O. // *J. Mol. Biol.* 2011. V. 412. № 3. P. 423–436. DOI: 10.1016/j.jmb.2011.07.052.

**STUDYING INTERACTIONS BETWEEN THE MOD(MDG4)-67.2 PROTEIN  
AND OTHER ISOFORMS OF THE MOD(MDG4)  
IN THE EMBRYONIC CELLS OF *Drosophila melanogaster***

**M. V. Kostyuchenko, L. S. Melnikova, Academician of the RAS P. G. Georgiev, A. K. Golovnin**

*Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

Received January 25, 2019

It was found that in the embryonic cells of *D. melanogaster*, the isoforms of the Mod(mdg4) protein is able to interact with each other through the BTB domains. However, this non-specific interaction is destroyed when protein complexes recruiting to chromatin sites.

**Keywords:** Mod(mdg4), BTB domains, protein interactions, yeast two-hybrid system, coimmunoprecipitation.