

ментов и биоинформатически предсказываются как нативно развернутые полипептиды. Эксперименты по химической шивке показали, что ни один из перечисленных полипептидов не способен к формированию мультимеров. Данные, полученные для N-концевых доменов белков CTCF при разных концентрациях образцов, приведены в таблице. Видно, что только для белка CTCF *D. melanogaster* молекулярная масса по результатам измерений в несколько раз превосходит молекулярную массу мономера. Почти двукратное превышение наблюдаемой молекулярной массы наблюдается также для CTCF *D. pulex* и *S. purpuratus*, однако мультимеризация этих доменов не подтверждается другими методами, и полученные результаты могут быть следствием того, что для данных доменов измерения проводили при более низких концентрациях, что стало причиной большой погрешности.

Для анализа структурированности исследуемых доменов проводили анализ графиков Кратки ($I \times s^2$ относительно s), форма которых сильно зависит от степени свернутости исследуемого белка. Для структурированных полипептидов характерна куполообразная форма кривой при малых значениях s , в то же время для развернутых полипептидов кривая имеет логарифмическую форму. Помимо *D. melanogaster* куполообразный изгиб наблюдается для N-концевого домена *C. intestinalis*.

Таким образом, при помощи методов кругового дихроизма и малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (SAXS) получены данные о пространственной структуре мультимеризующего N-концевого домена инсуляторного белка CTCF *D. melanogaster*. По аминокислотной последовательности данный домен не имеет гомологии ни с одним известным белковым доменом. По данным кругового дихроизма, N-концевой домен белка CTCF *Drosophila* практически не имеет вторичной структуры. При этом по данным SAXS, этот домен имеет стабильную компактную структуру в растворе и является тетрамером. Получены модели низкого разрешения структуры тетрамера в растворе. Формирование тетрамеров также подтверждается при помощи методов динамического рассеяния света (DLS) и гель-фильтрации. Также при помощи SAXS получены данные о пространственной структуре N-конце-

вых доменов инсуляторных белков CTCF представителей основных филогенетических групп высших многоклеточных. В отличие от N-концевого домена белка CTCF *Drosophila*, являющегося мультимером, аналогичные домены других животных не способны формировать олигомеры *in vitro*, большинство из них являются развернутыми.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-04-00938).

Список литературы

- Bell A., West A., Felsenfeld G. 1999. The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell*. 98 : 387—396.
- Bonchuk A., Maksimenko O., Kyrchanova O., Ivlieva T., Mogila V., Deshpande G., Wolle D., Schedl P., Georgiev P. 2015. Functional role of dimerization and CP190 interacting domains of CTCF protein in *Drosophila melanogaster*. *BMC Biol.* 13 : 63.
- Kyrchanova O., Chetverina D., Maksimenko O., Kullyev A., Georgiev P. 2008. Orientation-dependent interaction between *Drosophila* insulators is a property of this class of regulatory elements. *Nucleic Acids Res.* 36 : 7019—7028.
- Kyrchanova O., Ivlieva T., Toshchakov S., Parshikov A., Maksimenko O., Georgiev P. 2011. Selective interactions of boundaries with upstream region of Abd-B promoter in *Drosophila* bithorax complex and role of dCTCF in this process. *Nucleic Acids Res.* 39 : 3042—3052.
- Martinez S., Miranda J. 2010. CTCF terminal segments are unstructured. *Protein Sci.* 19 : 1110—1116.
- Moon H., Filippova G., Loukinov D., Pugacheva E., Chen Q., Smith S., Munhall A., Grewe B., Bartkuhn M., Arnold R. 2005. CTCF is conserved from *Drosophila* to humans and confers enhancer blocking of the Fab—8 insulator. *EMBO Rep.* 6 : 165—170.
- Pant V., Kurukuti S., Pugacheva E., Shamsuddin S., Mariano P., Renkawitz R., Klenova E., Lobanov V., Ohlsson R. 2004. Mutation of a single CTCF target site within the H19 imprinting control region leads to loss of Igf2 imprinting and complex patterns of *de novo* methylation upon maternal inheritance. *Mol. Cell. Biol.* 24 : 3497—3504.

Поступила 4 VI 2018

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STUDIES OF N-TERMINAL MULTIMERIZATION DOMAINS OF CTCF PROTEINS FROM HIGHER METAZOANS

A. N. Bonchuk,^{1,*} G. S. Kachalova,^{2,3} K. M. Boyko,^{2,3} O. G. Maksimenko,¹ P. G. Georgiev¹

¹ Institute of Gene Biology RAS, Moscow, 119334,

² The Federal Research Center «Fundamentals of Biotechnology» RAS, Moscow, 119071, and

³ National Research Center «Kurchatov Institute», Moscow, 123182;

* e-mail: errinaceus@rambler.ru

Spatial structure of N-terminal domains of CTCF insulator protein from *Drosophila melanogaster* was studied using circular dichroism and small-angle X-ray scattering (SAXS). This domain does not possess homology with any other protein domain. Circular dichroism data suggests that domain is unfolded. Despite that, SAXS data clearly demonstrated that domain has compact fold and is tetrameric in solution, low-resolution *ab initio* models were developed. Tetramer formation was also confirmed in dynamic light scattering and gel-filtration experiments. The same approach was applied to study N-terminal domains from CTCF proteins of animals from main phylogenetic groups of higher metazoans. In contrast to N-terminal domains of *Drosophila* CTCF protein, similar domains from other animals were unable to form oligomers and most of them were unfolded.

Key words: multimerization, small-angle X-ray scattering, chromatin