

УДК 577.218

TREX-2 КОМПЛЕКС ЧЕЛОВЕКА ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С СУБЪЕДИНИЦАМИ ORC КОМПЛЕКСА

© 2023 г. М. М. Куршакова^{1,*}, академик РАН С. Г. Георгиева¹, Д. В. Копытова¹

Поступило 23.07.2023 г.

После доработки 08.09.2023 г.

Принято к публикации 10.09.2023 г.

Белковый комплекс TREX-2 является важнейшим комплексом, участвующим в экспорте мРНК из ядра в цитоплазму через ядерные поры. Ранее у *D. melanogaster* был выделен совместный белковый комплекс TREX-2 с комплексом ORC, показано, что взаимодействие TREX-2 с ORC необходимо для эффективного экспорта мРНК из ядра в цитоплазму. В данной работе показано, что совместный комплекс TREX2-ORC также образуется в клетках человека.

Ключевые слова: TREX-2, GANP, PCID2, Xmas-2, ORC, Orc3, Orc4, экспорт мРНК

DOI: 10.31857/S2686738923600607, **EDN:** GQISDZ

Экспрессия генов включает этапы синтеза мРНК, формирования зрелой мРНК частицы и экспорта мРНК из ядра в цитоплазму через ядерные поры. В ходе образования мРНК частиц в ее состав входят различные белки, регулируя процессинг, взаимодействие мРНК с ядерными порами и экспорт мРНК. Ранее у *D. melanogaster* в качестве белкового компонента мРНК частиц нами был описан комплекс TREX-2 [1], показано, что TREX-2 ассоциирован с ядерной порой и необходим для экспорта мРНК из ядра в цитоплазму. Комплексы, гомологичные TREX-2, были охарактеризованы у многих эукариот, в том числе у дрожжей и у человека, показано, что TREX-2 играет ключевую роль в экспорте мРНК в различных организмах [2–4]. Комплекс TREX-2 *D. melanogaster* состоит из белков Xmas-2, PCID2, ENY2, Sem1p. Платформой для сборки комплекса является белок Xmas-2, с которым взаимодействуют остальные белки. На основании данных о взаимодействии белков в составе TREX-2, полученных для белка Sac3, гомолога Xmas-2 у дрожжей, и сравнении последовательностей белков предполагают, что на N-конце Xmas-2 располагается РНК-связывающий домен (RRM), далее в области 3'-конца Sac3-GANP домена располагается домен, с которым связываются PCID2 и мРНК, ближе к С-концу белка находится CID-домен, с которым связывается ENY2, ассоциированный с ядерной порой [5–8]. В нашей группе был выде-

лен совместный комплекс TREX-2 с белками ORC комплекса (Origin Recognition Complex) и показана роль этого взаимодействия в экспорте мРНК из ядра [9]. ORC комплекс был впервые описан у почкующихся дрожжей как комплекс, участвующий в инициации репликации [10]. Впоследствии гомологичные комплексы были обнаружены и у других организмов. Комплекс ORC участвует в привлечении на ориджины репликации комплекса Mcm2-7 при участии факторов Cdc6 и Cdt1 [11]. Однако у высших эукариот ORC комплекс и его отдельные субъединицы проявляют дополнительные свойства, не связанные с репликацией [12], в частности, показано взаимодействие белков ORC с различными РНК [13]. В нашей работе было показано, что белки ORC взаимодействуют с мРНК частицей, и это взаимодействие опосредовано комплексом TREX-2 [9]. Было показано, что субъединицы ORC взаимодействуют с адаптером экспорта NXF1 и необходимы для связывания NXF1 с мРНК частицей. Нокдаун компонентов ORC нарушает экспорт мРНК, что выявляет важную роль ORC в экспортном пути мРНК. Однако остается вопрос, насколько универсальным является данный механизм. Чтобы ответить на этот вопрос, мы исследовали существование взаимодействия между субъединицами комплекса TREX-2 и субъединицами комплекса ORC в культуре клеток человека.

У человека TREX-2 комплекс состоит из белка GANP (гомолога Xmas-2), белка PCID2, двух копий белка ENY2, белка DSS1 (гомолога Sem1p), центринов CETN2/CETN3 (гомологов Cdc31 белка дрожжей) [4]. ORC комплекс эволюционно консервативен, состоит из шести субъединиц —

¹Институт молекулярной биологии
Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: kursha@mail.ru

Orc1, Orc2, Orc3, Orc4, Orc5, Orc6 [14]. Хотя белки с Orc2 по Orc5 соосажаются друг с другом из лизатов клеток человека в мягких условиях экстракции, общий комплекс субъединиц трудно выделить [15]. При экстракции в более жестких условиях несколько белков Orc соосажаются со стехиометрическими количествами других неидентифицированных белков, но не с одной из известных субъединиц ORC.

Ранее в очищенном совместном TREX-2-ORC комплексе *D. melanogaster* были найдены субъединицы Orc1, Orc3, Orc4, Orc5, Orc6. Было исследовано прямое взаимодействие каждого из найденных белков ORC с компонентами TREX-2 — Xmas-2, PCID2, ENY2 [9]. Мы показали, что из всех белков ORC субъединица Orc3 является наиболее сильно ассоциированной с TREX-2 комплексом и мРНК частицей, связываясь вместе с ENY2 с С-концом Xmas-2 [9, 16, 17]. Orc4 наиболее эффективно связывается с PCID2 [9]. Основываясь на этих данных, для исследования существования у человека белкового комплекса, гомологичного комплексу TREX-2-ORC, были решено получить антитела к GANP и PCID2 субъединицам TREX-2 человека и к Orc3 и Orc4 субъединицам ORC человека. Была проанализированная доменная структура белков и выбраны участки аминокислотных последовательностей для синтеза антигенов (рис. 1а). Для GANP использовали фрагмент 1050 а.о. — 1247 а.о., содержащий последовательность CID-домена, для PCID2 — фрагмент 11 а.о. — 399 а.о., почти полностью совпадающий с последовательностью полноразмерного белка, для Orc3 и Orc4 — фрагменты 534 а.о. — 711 а.о. и 236 а.о. — 436 а.о., соответственно, перекрывающие С-концевые домены белков, которые содержат ДНК-связывающие WH-домены [11]. Были созданы генетические конструкции, кодирующие фрагменты аминокислотных последовательностей белков в рамке с His-тагом. Затем с полученных конструкций была проведена экспрессия рекомбинантных белков в *E. coli*. Белки были очищены из бактериальных лизатов при помощи Ni-NTA агарозы. Далее была проведена иммунизация кроликов соответствующими очищенными белками, при проведении иммунизации были соблюдены все этические нормы работы с животными. Из сыворотки крови иммунизированных животных были афинно очищены поликлональные антитела к белкам GANP, PCID2, Orc3, Orc4 человека. Специфичность антител была протестирована в Вестерн-блот анализе тотальных лизатов культуры клеток человека линии HEK293T (рис. 1б). Антитела к GANP распознавали полноразмерный белок, а также узнавали протеолитические фрагменты массой около 115 и 80 кДа. Ранее было показано, что в клетках HEK293 GANP способен подвергаться протеолитическому расщеплению с образованием С-концевого фрагмен-

та белка массой около 110–115 кДа, расщепление происходит в области 1024 – 1029 а.о. [18]. Так как наши антитела были получены на участок GANP с 1050 по 1247 а.о., то они способны распознавать как целый белок, так и С-концевые протеолитические фрагменты. Ранее мы показали, что у *D. melanogaster* Xmas-2 также подвергаются разрезанию на N-концевой и С-концевой фрагменты [19]. С-концевой фрагмент Xmas-2 выявлялся в виде полосы 100 кДа, а также полосы 80 кДа, представляющей собой, по-видимому, продукт дальнейшей деградации белка. Таким образом, полученные антитела к GANP специфически распознавали GANP и его С-концевые протеолитические фрагменты. Антитела к Orc3 специфично распознавали белок около 80 кДа, близкий к расчетной массе, антитела к Orc4 специфично распознавали белок около 45 кДа, близкий к расчетной массе. Антитела к PCID2 распознавали как основную форму белка массой около 41 кДа, так и две дополнительные модифицированные формы, массой около 46 и 67 кДа. Ранее нами было показано, что в клетках *D. melanogaster* PCID2 присутствует в виде трех форм массой около 42, 47, 52 кДа: 42 кДа соответствует расчетной массе PCID2, а 47 и 52 кДа являются убиквитинилированными модификациями PCID2 [20]. Можно предположить, что в человеческих клетках PCID2 также присутствует в виде основной и модифицированных форм.

Далее с целью проверить существование взаимодействия между TREX-2 и ORC комплексами в клетках человека были проведены эксперименты по иммуносоосаждению субъединиц TREX-2, GANP и PCID2, совместно с субъединицами ORC, Orc3 и Orc4, из тотальных лизатов линии HEK293T (рис. 2). Для того, чтобы исключить не прямое взаимодействие субъединиц TREX-2 и ORC через связывание с ДНК или РНК, при проведении реакций иммуносоосаждения производилась обработка лизатов ДНКазой I и РНКазой А. Выделение лизатов клеток проводили с добавлением ингибиторов фосфатаз (Sigma) для поддержания фосфорилированного состояния белков. Фосфорилирование белков часто бывает необходимым для образования белковых комплексов и поддержания их структуры.

Все антитела эффективно работали в реакциях иммуносоосаждения, осаждавая белки, к которым были получены. В наших условиях антитела к PCID2 преимущественно осаждали основную низкомолекулярную форму PCID2 массой около 41 кДа, слабо осаждавая две остальные формы PCID2. Антитела к GANP осаждали основную форму белка и также соосаждали фрагмент GANP массой около 115 кДа (рис. 2, нижняя панель). Антитела к GANP соосаждали основную форму PCID2, а антитела к PCID2 соосаждали полноразмерный GANP. У *Drosophila* более высокомо-

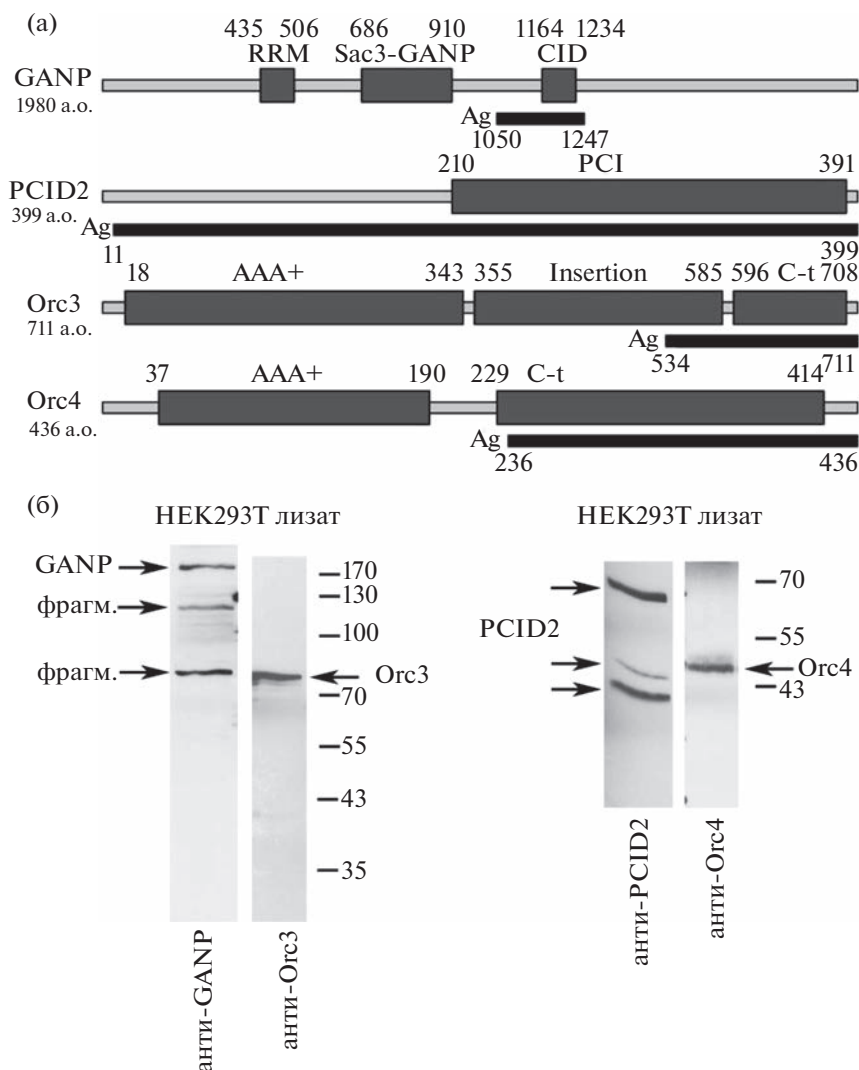


Рис. 1. Получение поликлональных антител к субъединицам TREX-2, ORC комплексов. (а) Схема аминокислотных последовательностей белков GANP, PCID2, Orc3 и Orc4. На схеме указаны основные домены белков. Черными прямоугольниками отмечены участки последовательностей, которые использовали для получения антител (Ag). (б) Анализ специфичности антител. Вестерн-блот анализ лизата HEK293T клеток с использованием афинно-очищенных антител к GANP, PCID2, Orc3 и Orc4. Стрелками указаны формы белков, соответствующие их молекулярной массе, а также протеолитические формы GANP (фрагм.), модифицированные формы PCID2.

лекулярные формы PCID2 являются модификациями основной формы, и в отличие от основной, не связываются с Xmas-2 [20]. GANP также не ассоциировался с высокомолекулярными формами PCID2. GANP и PCID2 связываются в составе TREX-2 комплекса, поэтому в обоих случаях антитела соосаждают TREX-2. При этом антитела к GANP и PCID2 уверенно соосаждали как Orc3, так и Orc4. Антитела к Orc3 и Orc4 слабо соосаждали друг друга, что согласуется с литературными данными о том, что компоненты ORC во многих тканях имеют различный уровень экспрессии и их достаточно трудно выделить вместе в одном комплексе [15]. Антитела к Orc3 и к Orc4 соосаждали полноразмерный белок GANP. Также антитела к Orc3 и к Orc4 соосаждали низкомо-

лекулярную форму PCID2. Таким образом, в HEK293T клетках человека некоторая часть белков ORC ассоциирована с TREX-2 комплексами.

Вероятно, в составе общего комплекса Orc3 может непосредственно взаимодействовать как с GANP, так и с PCID2, так как антитела к обоим белкам достаточно эффективно осаждают Orc3. Интересно, что вместе с Orc4 достаточно эффективно соосаждается PCID2, что может указывать на их прямое взаимодействие в комплексе. Полученные результаты позволяют предположить, что в составе совместного комплекса между субъединицами ORC и субъединицами TREX-2 существуют множественные взаимодействия. Интересно, что при исследовании прямых взаимодействий субъединиц в составе общего TREX-2-ORC комплекса

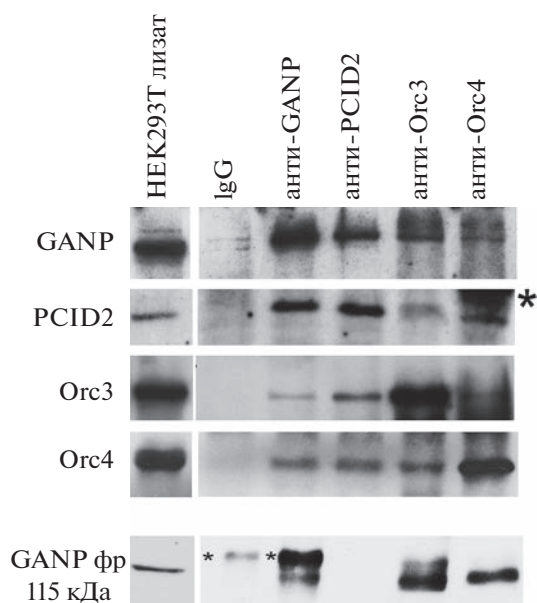


Рис. 2. Анализ взаимодействия компонентов TREX-2 и ORC комплексов. Вестерн-блот анализ иммуноосаждения полноразмерных белков, иммуноосаждения С-концевого фрагмента GANP (нижняя панель) из лизатов HEK293T клеток при помощи антител к субъединицам TREX-2 – белкам GANP, PCID2, антител к субъединицам ORC – белкам Orc3 и Orc4. Указаны детектируемые белки. Бенды, соответствующие сигналам от цепей антител отмечены как “*”.

D. melanogaster было показано, что Orc3 наиболее эффективно связывается с Xmas-2 и ENY2 субъединицами TREX-2 [9]. Orc3 в комплексе с ENY2 ассоциируется с С-концевой областью Xmas-2, содержащей CID-домен [16, 17]. Orc4 наиболее эффективно связывается с PCID2, Orc3 также связывается с PCID2 [9]. Наши данные позволяют предположить, что в клетках человека общий комплекс TREX-2 с белками ORC может иметь сходное строение с TREX-2-ORC комплексом *D. melanogaster*.

Интересно, что при выделении лизатов из HEK 293T клеток в присутствии ингибиторов фосфатаз антитела к Orc3 и Orc4 так же, как и антитела к GANP, соосаждали С-концевой протеолитический фрагмент GANP размером около 115 кДа (рис. 2, нижняя панель). Интересно, что в иммуноосаждениях из лизатов S2 клеток *D. melanogaster* в присутствии ингибиторов фосфатаз антитела к Orc3 также способны соосаждать С-концевой протеолитический фрагмент Xmas-2. Можно предположить, что при определенных условиях белки ORC способны ассоциироваться не только с полноразмерным GANP, но и с его С-концевым протеолитическим фрагментом.

Исследуемые компоненты TREX-2 и ORC также соосаждались в аналогичных условиях в реакциях иммуноосаждения из лизатов клеток человека линии A375. Таким образом, в клетках человека раз-

личных линий было обнаружено взаимодействие между TREX-2 комплексом и субъединицами комплекса ORC. Можно предположить, что у человека существует совместный комплекс TREX-2 с ORC, аналогичный выделенному нами ранее TREX-2-ORC комплексу *D. melanogaster*. Его строение и функции – вопрос, на который должны дать ответ дальнейшие исследования.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа была выполнена при поддержке гранта РНФ № 22-24-00721.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kurshakova M.M., Krasnov A.N., Kopytova D.V. et al. // The EMBO journal. 2007. V. 26. № 24. P. 4956–4965.
2. Fischer T., Strasser K., Racz A. et al. // The EMBO journal. 2002. V. 21. № 21. P. 5843–5852.
3. Rodríguez-Navarro S., Fischer T., Luo M.J. et al. // Cell. 2004. V. 116. № 1. P. 75–86.
4. Jani D., Lutz S., Hurt E., et al. // Nucleic acids research. 2012. V. 40. № 10. P. 4562–4573.
5. Jani D., Lutz S., Marshall N.J., et al. // Molecular cell. 2009. V. 33. № 6. P. 727–737.
6. Ellisdon A.M., Dimitrova L., Hurt E. and Stewart M. // Nature structural & molecular biology. 2012. V. 19. № 3. P. 328–336.
7. Dimitrova L., Valkov E., Aibara S. et al. // Structure. 2015. V. 23. № 7. P. 1246–1257.
8. Jani D., Valkov E., Stewart M. // Nucleic acids research. 2014. V. 42. № 10. P. 6686–6697.
9. Kopytova D., Popova V., Kurshakova M. et al. // Nucleic acids research. 2016. V. 44. № 10. P. 4920–4933.
10. Bell S.P. and Stillman B. // Nature. 1992. V. 357. P. 128–134.
11. Bleichert F. // Current opinions in structural biology. 2019. V. 59. P. 195–204.
12. Sasaki T. and Gilbert D.M. // Current opinions in cell biology. 2007. V. 19. № 3. P. 337–343.
13. Hoshina S., Yura K., Teranishi H. et al. // Journal of Biological Chemistry. 2013. V. 288. P. 30161–30171.
14. Bleichert F., Botchan M.R., Berger J.M. // Nature. 2015. V. 519. P. 321–326.
15. Thome K.C., Dhar S.K., Quintana D.G. et al. // Journal of Biological Chemistry. 2000. V. 275. № 45. P. 35233–35241.
16. Popova V.V., Georgieva S.G., Kopytova D.V. // Biochemistry and molecular biology journal. 2016. V. 2. P. 2–14.
17. Кушакова М.М., Копытова Д.В., Георгиева С.Г. // Доклады АН. 2021. Т. 496, С. 66–69.
18. Wickramasinghe V.O., McMurtrie P., Marr J. et al. // Journal of molecular biology. 2011. V. 406. № 3. P. 355–361.
19. Кушакова М.М., Георгиева С.Г., Копытова Д.В. // Доклады АН. 2023. Т. 509. № 1. С. 166–169.
20. Glukhova A.A., Kurshakova M.M., Nabirochkina E.N. et al. // RNA Biology. 2021. V. 19. P. 1–12.

THE HUMAN TREX-2 COMPLEX INTERACTS WITH SUBUNITS OF THE ORC COMPLEX

M. M. Kurshakova^{a,#}, Academician of the RAS S. G. Georgieva^a, and D. V. Kopytova^a

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

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

The TREX-2 protein complex is the key complex involved in the export of mRNA from the nucleus to the cytoplasm through the nuclear pores. Previously, a joint protein complex of TREX-2 with ORC was isolated in *D. melanogaster*, it was shown that the interaction of TREX-2 with ORC is necessary for efficient mRNA export from the nucleus to the cytoplasm. In this work, we show that the TREX2-ORC joint complex is also formed in human cells.

Keywords: TREX-2, GANP, PCID2, Xmas-2, ORC, Orc3, Orc4, mRNA export