

УДК 577.218

КОМПЛЕКС TREX-2-ORC *D. MELANOASTER* УЧАСТВУЕТ В ЯДЕРНОМ ЭКСПОРТЕ МРНК ГИСТОНОВ

© 2024 г. М. М. Куршакова*, Ю. А. Якушева, академик РАН С. Г. Георгиева

Поступило 09.10.2023 г.

После доработки 17.10.2023 г.

Принято к публикации 21.10.2023 г.

Белковый комплекс TREX-2-ORC *D. melanogaster* необходим для экспорта большей части синтезирующихся молекул поли(А)-содержащей мРНК из ядра в цитоплазму через ядерные поры. Однако, роль данного комплекса в экспорте других групп РНК остается неизвестным. Нами показано, что TREX-2-ORC участвует в ядерном экспорте мРНК гистонов: он ассоциирован с мРНК частицами гистонов, связывается с мРНК гистона H3 в 3'-концевой части кодирующей области и участвует в экспорте мРНК гистонов из ядра в цитоплазму.

Ключевые слова: TREX-2, ORC, TREX-2-ORC, Xmas-2, PCID2, ENY2, экспорт мРНК, мРНК гистонов

DOI: 10.31857/S2686738924010089, **EDN:** IKTUYXA

Экспрессия генов состоит из нескольких этапов: синтез мРНК, формирование зрелой мРНК частицы и экспорт мРНК из ядра в цитоплазму через ядерные поры. Экспортный рецептор NXF1 рекрутируется на мРНК через адаптерные белки, которые могут связываться с мРНК во время транскрипции, сплайсинга, формирования 3'-конца, внутриядерного транспорта мРНК к ядерным порам. NXF1 образует гетеродимер с белком p15 (гетеродимер Mex67-Mtr2 в дрожжах). Гетеродимер рецептора ядерного экспорта обеспечивает транслокацию мРНК через ядерную пору, взаимодействуя с нуклеопоринами, содержащими FG-повторы.

Одним из ключевых регуляторов экспорта мРНК является белковый комплекс TREX-2. Гомологичные TREX-2 комплексы были охарактеризованы у многих эукариот, в том числе у дрожжей и у человека. TREX-2 способен связываться с мРНК, ассоциируется с ядерными порами и необходим для экспорта мРНК в различных организмах [1–7]. Комплекс TREX-2 *D. melanogaster* состоит из белков Xmas-2, PCID2, ENY2, Sem1p [8]. Белок Xmas-2 служит платформой для сборки комплекса, с ним взаимодействуют остальные белки. Ранее в нашей

группе был очищен общий комплекс TREX-2 с белками ORC (Origin Recognition Complex) и показана роль ORC субъединиц в экспорте мРНК из ядра [9]. ORC комплекс был впервые описан у почкующихся дрожжей как комплекс, который связывается с ориджинами репликации и участвует в привлечении комплекса Mcm2–7. Впоследствии гомологичные комплексы были обнаружены и у других организмов [10]. Однако было обнаружено, что у высших эукариот ORC комплекс и его отдельные субъединицы выполняют множество различных функций, не связанных с репликацией, в частности, показано взаимодействие белков ORC с различными РНК [11]. В нашей группе было показано, что белки ORC взаимодействуют с мРНК частицами и это взаимодействие опосредовано комплексом TREX-2. Было показано, что субъединицы ORC взаимодействуют с рецептором экспорта NXF1 и необходимы для связывания NXF1 с мРНК частицей. Нокдаун компонентов ORC, так же как нокдаун компонентов TREX-2, приводит к нарушению экспорта поли(А)-содержащей РНК (мРНК) из ядра. Таким образом, было показано, что белковый комплекс TREX-2-ORC *D. melanogaster* привлекает экспортный рецептор NXF1 в состав мРНК частиц и является ключевым участником экспорта основной части синтезирующихся молекул мРНК [9]. В данной работе была поставлена задача исследовать участие TREX-2-ORC в экспорте неполиаденилируемых мРНК, кодируемых генами репликационно-зависимых гистонов.

Институт Молекулярной Биологии им. В. А. Энгельгардта
Российской Академии Наук, Москва, Россия

*E-mail: kursha@mail.ru

мРНК репликационно-зависимых генов гистонов синтезируются в начале S фазы клеточного цикла и являются единственными мРНК эукариот, которые не подвергаются полиаденилированию [12]. В дальнейшем для краткости мы будем именовать их просто мРНК гистонов. Пре-мРНК гистонов не содержат интронов, их созревание включает в себя только экспирование и эндонуклеолитическое расщепление 3'-конца. На 3'-конце пре-мРНК гистонов содержат шпильчатую структуру и HDE-элемент, которые направляют сборку специфического аппарата процессинга [13]. Со шпилькой связывается белок SLBP (stem-loop binding protein). С HDE-последовательностью ассоциируется 5'-конец U7 мРНК, которая образует U7 мРНК вместе с белковым комплексом, состоящим из белков слайсосомы Sm, в котором два белка SmD1 и SmD2 заменены на белки Lsm10 и Lsm11. У млекопитающих белок Lsm11 взаимодействует своим протяженным N-концом с N-концевой областью белка FLASH. Общая поверхность FLASH с Lsm11 привлекает на U7 мРНК комплекс процессинга HCC (histone cleavage complex), содержащий факторы Symplekin, CPSF73, CPSF100, CPSF160, WRD33, Cst64. Расщепление пре-мРНК гистонов осуществляется эндонуклеазой CPSF73 на расстоянии 4–5 нуклеотидов от шпильки. После расщепления зрелые мРНК гистонов быстро экспортируются из ядра в цитоплазму. Несмотря на специфическое строение мРНК гистонов было показано, что они также экспортируются при помощи рецептора NXF1 [14,15]. В данной работе мы показали, что комплекс TREX-2-ORC, ассоциирован с мРНК частицами гистонов, связывается с мРНК гистона H3 в 3'-концевой части кодирующей области и участвует в экспорте мРНК.

TREX-2-ORC комплекс ассоциирован с мРНК частицами гистонов

Была поставлена задача исследовать взаимодействие комплекса TREX-2-ORC с мРНК частицами гистонов. Ранее в очищенном общем TREX-2-ORC комплексе были найдены ORC субъединицы Orc1, Orc3, Orc4, Orc5, Orc6 [9]. Взаимодействие комплекса с мРНК гистонов было протестировано для TREX-2 субъединиц Xmas-2, PCID2, ENY2 и для ORC белков Orc3, Orc5, Orc6. Для этого был применен метод соосаждения РНП частиц антителами (RIP) из ядерного экстракта S2 клеток. Антитела к белкам — компонентам TREX-2 и ORC эффективно осаждали мРНК генов гистонов H2A и H3 (рис. 1, а), что указывает на взаимодействие комплекса TREX-2-ORC с мРНК частицами данных гистонов. Аналогичные данные были получены для мРНК H4 и H2B. В качестве положительного

контроля показано взаимодействие TREX-2-ORC с поли(А)-содержащей мРНК β -тубулина, которое было продемонстрировано ранее [9].

Далее взаимодействие было подтверждено с помощью альтернативного подхода: мРНК частицы, содержащие транскрипт гена H3, выделяли из ядерного экстракта S2 клеток при помощи биотинилированного антисмыслового РНК-зонда к мРНК гистона H3 (рис. 1, б). Антисмысловый РНК-зонд специфически ассоциируется с соответствующей эндогенной РНК в экстракте, осаждая РНП частицу. Связавшие с РНК-зондом мРНК частицы осаждали из экстракта при помощи стрептавидин-агарозы, белки мРНК анализировали при помощи Вестерн-блот анализа с антителами к компонентам TREX-2 и ORC. В качестве отрицательного контроля проводили осаждение с антисмысловой последовательностью к РНК белка YFP (K-). Субъединицы комплексов TREX-2 и ORC, белки Xmas-2, PCID2, ENY2, Orc3, Orc6, а также факторы процессинга CPSF73, CPSF100 соосаждались с H3 мРНК, но отсутствовали в отрицательном контроле. Таким образом, комплекс TREX-2-ORC способен ассоциироваться с мРНК частицами гистонов.

TREX-2-ORC ассоциируется с мРНК H3 в 3'-концевой части кодирующей области

С целью локализовать участок мРНК H3, с которым ассоциируется TREX-2-ORC, биотинилированные смысловые РНК-зонды, соответствующие различным участкам последовательности РНК H3 инкубировали с ядерным экстрактом S2 клеток и далее определяли связавшиеся с РНК-зондами белки. Зонды соответствовали полноразмерному (H3), N- и C-концевым участкам кодирующей области длиной 411 нт (CDS1: 1–204 нт и CDS2: 204–411 нт, соответственно) и 3'-нетранслируемой области пре-мРНК H3 (3'UTR: 412–595 нт) (рис. 1в). Белки Xmas-2, PCID2, Orc3 и Orc6 преимущественно ассоциировались с CDS2 последовательностью. Используемые в качестве контрольных факторы процессинга CPSF73, CPSF100 ассоциировались с 3'UTR зондом, в котором содержатся шпильчатая структура и HDE-элемент, направляющие сборку аппарата процессинга, что подтверждает специфичность выявленных взаимодействий. ENY2 соосаждался как с CDS2, так и с 3'UTR РНК-зондом, что можно объяснить свойством ENY2 привлекаться в различные белковые комплексы. Белки не взаимодействовали с контрольным РНК-зондом. Таким образом, белки TREX-2-ORC комплекса ассоциируются с кодирующей последовательностью РНК гистона H3 в 3'-концевой части кодирующей области.

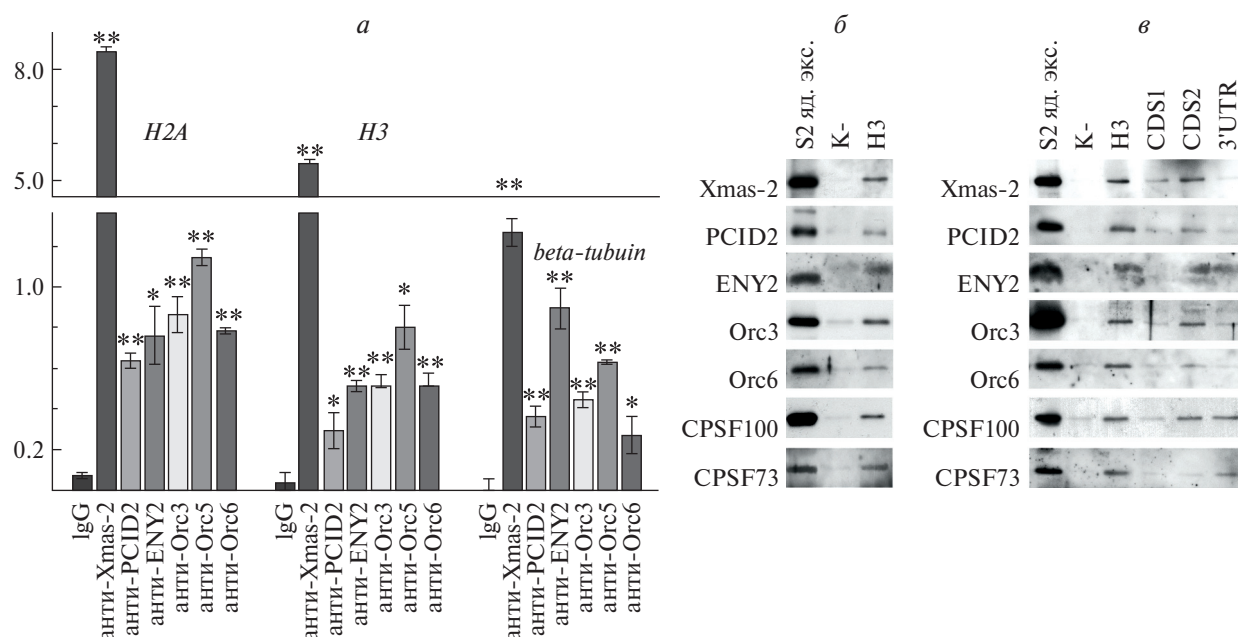


Рис.1. TREX-2-ORC ассоциирован с мРНК гистонов. (а) Результаты иммуноосаждения мРНК частиц генов *H2A*, *H3* и β -tubulin антителами к субъединицам TREX-2-ORC, в качестве отрицательного контроля использованы IgG. Результаты представлены в процентах от исходного материала. Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение, для сравнения контроля и эксперимента использовался t-критерий Стьюдента. (*) указывает на статистическую значимость с p -value < 0.05 , (**) указывает на статистическую значимость с p -value < 0.01 . (б) Вестерн-блот анализ сосаждения *H3* мРНК частиц с биотинилированным антисмысловым РНК-зондом к мРНК гистона *H3* с использованием антител к Xmas-2, PCID2, ENY2, Orc3, Orc6, CPSF100, CPSF73. В отрицательном контроле (К-) использован РНК-зонд с антисмысловой последовательностью к РНК белка YFP. (в) Вестерн-блот анализ сосаждения белков с биотинилированными смысловыми РНК-зондами к последовательностям мРНК гистона *H3*: полноразмерной (*H3*), CDS1, CDS2, 3'UTR, с использованием антител к Xmas-2, PCID2, ENY2, Orc3, Orc6, CPSF100, CPSF73. В отрицательном контроле (К-) использован РНК-зонд с антисмысловой последовательностью к РНК YFP.

TREX-2-ORC участвует в экспорте мРНК гистонов

Затем мы исследовали участие TREX-2-ORC в экспорте мРНК гистонов из ядра в цитоплазму. Белок Xmas-2 является платформой, с которой ассоциированы остальные белки TREX-2-ORC комплекса: PCID2 ассоциирован с областью Xmas-2 вблизи GANP-домена, ENY2 — с CID-доменом Xmas-2, из всех ORC субъединиц комплекса Orc3 сильнее всего связывается Xmas-2, взаимодействуя вместе с ENY2 с С-концом Xmas-2 [16,17].

Поэтому с целью снизить уровень TREX-2-ORC комплекса был проведен нокдаун Xmas-2 в S2 клетках методом РНК-интерференции. При нокдауне Xmas-2 уровень экспрессии белка значительно снижался, при этом уровни экспрессии субъединиц PCID2, ENY2, Orc3, Orc6 заметно не изменялись (рис. 2, а). Методом RIP-анализа было исследовано, нарушает ли нокдаун Xmas-2 взаимодействие TREX-2-ORC с мРНК гистонов. Нокдаун Xmas-2 приводил к уменьшению количества ассоциированных с мРНК гистонов как Xmas-2, так и белков

PCID2, ENY2, Orc3, Orc6, то есть к уменьшению связывания TREX-2-ORC с мРНК частицами гистонов. Результаты приведены для *H3* мРНК (рис. 2, б).

Далее было исследовано, как влияет нарушение взаимодействия мРНК гистона *H3* с TREX-2-ORC комплексом на ее экспорт из ядра в цитоплазму. Для этого был проведен анализ распределения мРНК *H3* в клетках S2 при нокдауне ключевых для взаимодействия комплекса с NXF1 и мРНК частицей субъединиц Xmas-2 и Orc3 методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) с DIG-меченой антисмысловой РНК-пробой к кодирующей последовательности гена *H3* (рис. 2, в, 2, д). Так как мРНК гистонов синтезируется в S фазе и подвергается деградации после окончания S фазы, FISH-сигнал мРНК детектировался только в части клеток. В контрольном эксперименте FISH-сигнал *H3* мРНК детектировался в основном в цитоплазме клеток. Нокдаун NXF1 приводил к задерживанию *H3* мРНК в ядре, как и было показано в литературе [15]. Нокдаун Xmas-2 и нокдаун Orc3 также приводили к нарушениям экспорта мРНК в некоторой части клеток с *H3* FISH-сигналом (около 20–30%):

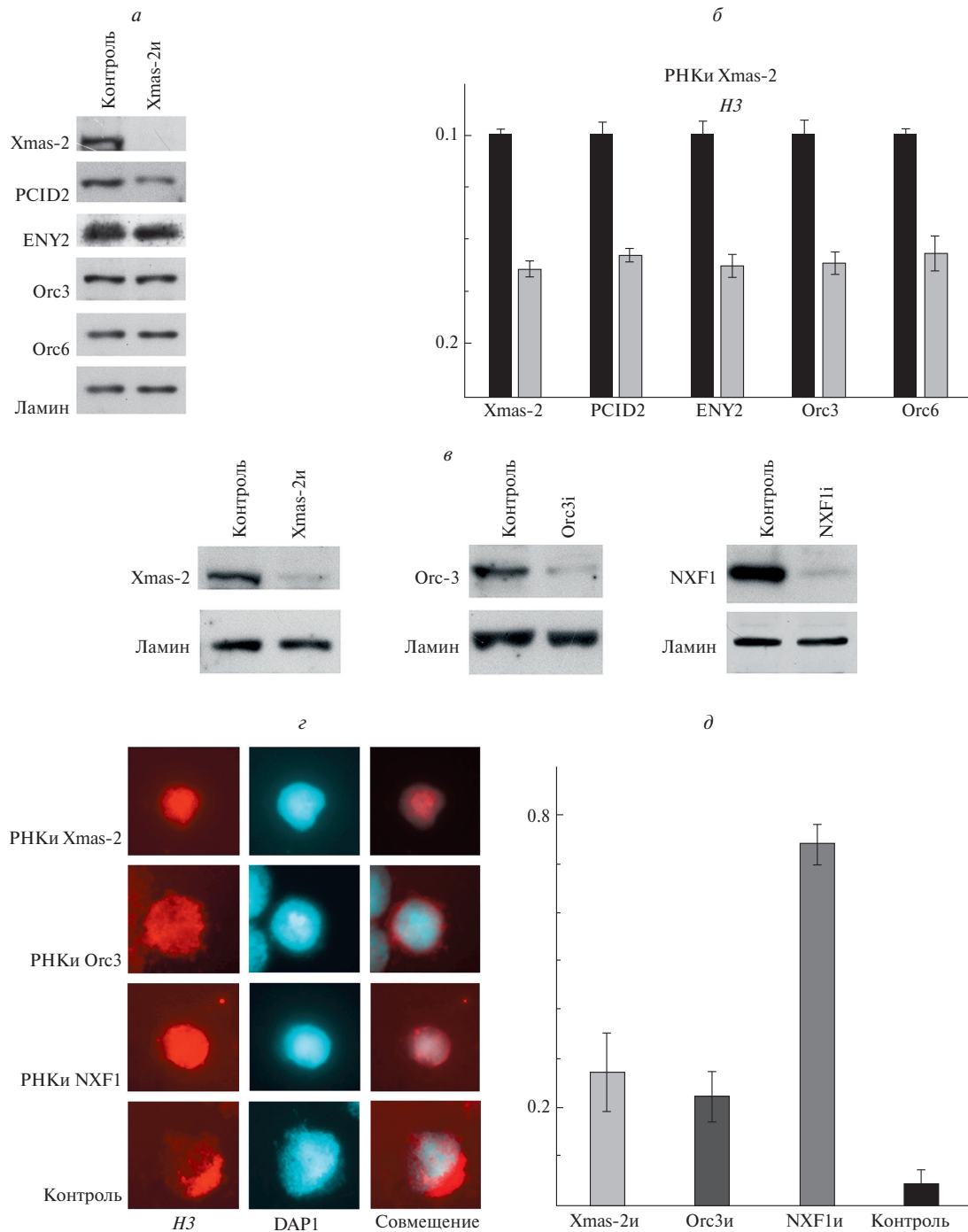


Рис. 2. Эффект нокдауна субъединиц TREX-2-ORC на экспорт мРНК гистонов. (а) Вестер-блот анализ уровней экспрессии белков при РНК-интерференциях Xmas-2, Orc3 в S2 клетках при помощи соответствующих антител. В качестве выравнивающего контроля использовано окрашивание антителами к ламину Dm0. (б) Результаты иммуноосаждения мРНК частиц гистонов при РНК-интерференции Xmas-2 с антителами к субъединицам TREX-2-ORC, в качестве отрицательного контроля использованы IgG. Результаты представлены в процентах от исходного материала. Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение, для сравнения контроля и эксперимента использовался t-критерий Стьюдента. (*) указывает на статистическую значимость с p -value < 0.05 , (**) указывает на статистическую значимость с p -value < 0.01 . (в) Вестер-блот анализ РНК-интерференций Xmas-2, Orc3, NXF1 с использованием антител к одноименным белкам. В качестве выравнивающего контроля использовано окрашивание антителами к ламину Dm0. (г) FISH-гибридизация с антисмысловой РНК-пробой к H3 мРНК при РНК-интерференциях (РНКи) Xmas-2, Orc3, NXF1 в S2 клетках. В качестве отрицательного контроля (Контроль) проведена РНК-интерференция с дцРНК белка GFP. (д) Доля S2-клеток с нарушениями экспорта H3 мРНК при нокдаунах Xmas-2, Orc3, NXF1 или GFP (Контроль).

накоплению РНК в ядре или равномерному распределению между ядром и цитоплазмой. (рис. 2г, 2д). Таким образом, снижение количества TREX-2-ORC, связанного с мРНК частицами гистонов, приводит к нарушению ядерного экспорта их мРНК. То, что нарушение экспорта наблюдается только в части клеток можно объяснить тем, что в привлечении NXF1 на мРНК гистонов кроме комплекса TREX-2-ORC участвуют и другие адаптеры: SR-белки 9G8 и SRp20 [18] и белок ALYREF [19].

Ранее мы показали, что TREX-2-ORC комплекс ассоциируется с основным рецептором экспорта NXF1 и служит адаптером для связывания NXF1 с поли-А-содержащими мРНК генов [9]. мРНК гистонов экспортируются при помощи NXF1 [15]. Мы показали, что TREX-2-ORC комплекс входит в состав мРНК и связывается с неполиаденилируемыми мРНК гистонов. То, что нокдаун комплексообразующих субъединиц TREX-2-ORC приводит к нарушению связывания комплекса с мРНК гистонов и нарушению их экспорта в некоторой части S2 клеток, позволяет предположить, что TREX-2-ORC также служит одним из адаптеров для NXF1-зависимого экспорта неполиаденилируемых мРНК гистонов, возможно, участвуя в экспорте на определенном этапе регуляции экспрессии в ходе клеточного цикла.

Ранее было обнаружено несколько адаптеров, через взаимодействие с которыми экспортный рецептор NXF1 привлекается на мРНК гистонов. В клетках млекопитающих и ооцитах лягушки было показано, что SR-белки 9G8 и SRp20 связываются со специфическим транспортным цис-элементом в кодирующей области H2A мыши [18]. В клетках человека основной экспортный адаптер ALYREF связывается с гистоновой мРНК в области, расположенной в 5'-конца от места расщепления, с пиком в области 50 нт [19]. По нашим данным TREX-2-ORC также преимущественно связывается с мРНК гистонов в 3'-концевой части кодирующей области. Но в то время, как связывание ALYREF с мРНК гистонов происходит котранскрипционно и ассоциировано с посадкой аппарата процессинга [19], TREX-2-ORC может привлекаться в мРНК гистонов не в ходе транскрипции, а на более позднем этапе экспортного пути мРНК частиц в ядре от сайтов транскрипции до ядерных пор. На это указывают данные о том, что нокдаун компонентов TREX-2 не влияет на процессинг поли(А)-содержащих модельных мРНК [20].

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fischer T., Strasser K., Racz A., et al. // The EMBO journal. 2002. V. 21. № 21. P. 5843–5852.
2. Rodríguez-Navarro S., Fischer T., Luo M.J., et al. // Cell. 2004. V. 116. № 1. P. 75–86.
3. Jani D., Lutz S., Hurt E., et al. // Nucleic acids research. 2012. V. 40. № 10. P. 4562–4573.
4. Jani D., Lutz S., Marshall N.J., et al. // Molecular cell. 2009. V. 33. № 6. P. 727–737.
5. Ellisdon A.M., Dimitrova L., Hurt E. and Stewart M. // Nature structural & molecular biology. 2012. V. 19. № 3. P. 328–336.
6. Dimitrova L., Valkov E., Aibara S., et al. // Structure. 2015. V. 23. № 7. P. 1246–1257.
7. Jani D., Valkov E., Stewart M. // Nucleic acids research. 2014. V. 42. № 10. P. 6686–6697.
8. Kurshakova M.M., Krasnov A.N., Kopytova D.V., et al. // The EMBO journal. 2007. V. 26. № 24. P. 4956–4965.
9. Kopytova D., Popova Vol., Kurshakova M., et al. // Nucleic acids research. 2016. V. 44. № 10. P. 4920–4933.
10. Bleichert F. // Current opinions in structural biology. 2019. V. 59. P. 195–204.
11. Popova Vol., Brechalov A. // Nonreplicative functions of the origin recognition complex. 2018. V. 9. P. 460–473.
12. Duronio R.J., Marzluff W.F. // RNA biology. 2017. V. 14. № 6. P. 726–738.
13. Sun Y., Zhang Y., Aik W.S., et al. // Science. 2020b. V. 367. P. 700–703.
14. Huang Y., Gattoni R., Stevenin J. and Steitz J.A. // Molecular Cell. 2003. V. 11. P. 837–843.
15. Erkmann J.A., Sanchez R., Treichel N., et al. // RNA. 2005. V. 11. P. 45–58.
16. Popova Vol.V., Georgieva S.G., Kopytova D.V. // Biochemistry and molecular biology journal. 2016. V. 2. P. 2–14.
17. Куршакова М. М., Копытова Д. В., Георгиева С. Г. // Доклады АН. 2021. Т. 496. С. 66–69.
18. Huang Y., Steitz J.A. // Molecular Cell. 2001. V. 7. P. 899–905.
19. Fan J., Wang K., Du X., et al. // The EMBO Journal. 2019.
20. Kopytova D.V., Orlova A.V., Krasnov A.N., et al. // Genes and Development. 2009. V. 24. P. 86–96.

TREX-2-ORC COMPLEX OF *D. MELANOGASTER* PARTICIPATES IN NUCLEAR EXPORT OF HISTONE MRNA

M. M. Kurshakova[#], Y. A. Yakusheva, Academician of the RAS S. G. Georgieva

Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow, Russian Federation

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

The TREX-2-ORC protein complex of *D. melanogaster* is necessary for the export of the bulk of synthesized poly(A)-containing mRNA molecules from the nucleus to the cytoplasm through the nuclear pores. However, the role of this complex in the export of other types of RNA remains unknown. We have shown that TREX-2-ORC participates in the nuclear export of histone mRNAs: it associates with histone mRNPs, binds to histone H3 mRNA at the 3'-terminal part of the coding region, and participates in the export of histone mRNAs from the nucleus to the cytoplasm.

Keywords: TREX-2, ORC, TREX-2-ORC, Xmas-2, PCID2, ENY2, mRNA export, histone mRNA