

УДК 577.218

ТОЧЕЧНЫЕ МУТАЦИИ В М-ДОМЕНЕ PCID2 НАРУШАЮТ ЕГО ФУНКЦИИ В ЭКСПОРТЕ мРНК У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© 2024 г. Ю. А. Вдовина, академик РАН С. Г. Георгиева, Д. В. Копытова*

Поступило 15.04.2024 г.

После доработки 03.05.2024 г.

Принято к публикации 07.05.2024 г.

Белок PCID2 входит в состав комплекса TREX-2 эукариот, отвечающего за экспорт мРНК из ядра в цитоплазму. Ранее, мы показали, что PCID2 *D. melanogaster* участвует в специфичном распознавании мРНК и выявили ключевые аминокислоты, отвечающие за взаимодействие с РНК гена *ras2*. В данной работе мы показываем, что точечные мутации данных аминокислот нарушают взаимодействие белка с РНК клетки и экспорт полиА-содержащей мРНК из ядра в цитоплазму в клетках *D. melanogaster*.

Ключевые слова: PCID2, TREX-2, экспорт мРНК, транскрипция

DOI: 10.31857/S2686738924050013

Ядерная фаза экспрессии генов завершается экспортом зрелых мРНК через ядерные поры в цитоплазму [1]. Комплекс TREX-2 представленный у всех эукариот, отвечает за экспорт мРНК, а также выполняет ряд других биологических функций, включая предотвращение нестабильности генома [2–7]. Кроме того, в почкующихся дрожжах комплекс TREX-2 опосредует локализацию активно экспрессируемых генов, таких как GAL1, а у многоклеточных способствует как локализации, так и обеспечению быстрого перемещения к ядерным порам и ядерному экспорту мРНК генов БТШ [4, 7–11]. Нокдаун субъединиц комплекса приводит к перераспределению мРНК, которая в норме локализуется большей частью в цитоплазме, а при нокдауне субъединиц комплекса задерживается в ядре [4, 7, 11]. У *D. melanogaster* комплекс TREX-2 состоит из четырех белков: Xmas-2, PCID2, ENY2 и Sem1p [4, 12, 13].

Недавно было показано, что в специфичном распознавании мРНК в составе комплекса участвует белок PCID2 [14]. PCID2 содержит два домена взаимодействия с мРНК, которые располагаются в М- и С-концевой части белка. Домен, локализованный на С-конце PCID2, специфично

связывает фрагмент 3'-некодирующей области мРНК гена *ras2*. А делеция С-концевой последовательности PCID2 приводит к нарушению экспорта мРНК из ядра в цитоплазму [15]. Был также найден ранее неизвестный домен, находящийся в центральной части белка (М), неспецифично взаимодействующий с мРНК. Точечные мутации в М-домене PCID2 приводили к резкому снижению взаимодействия PCID2 с *ras2* мРНК [14].

В данной работе мы исследовали влияют ли эти мутации в белке на взаимодействие белка с РНК в клетке, а не только в системе *in vitro*. Кроме того, мы предполагали выяснить, влияет ли это на связывание с широким спектром РНК (с которым взаимодействует PCID2). Также была цель изучить влияние данных мутаций на общий экспорт мРНК из ядра в цитоплазму.

Консервативные аминокислоты, отвечающие по нашим результатам за взаимодействие с РНК *ras2*, находятся в положениях Arg191 и Arg216 (Рис. 1а).

Каждая аминокислота была заменена на Ala в мутантных белках (PCID2^{R191A} и PCID2^{R216A}). На рис. 1б представлена предсказанная структура белка PCID2 *D. melanogaster*, на которой отмечены заменяемые аминокислоты. Обе аминокислоты находятся в канавке, участвующей во взаимодействии PCID2 с РНК. Как было показано в предыдущей работе, эти замены приводят к резкому снижению связывания PCID2 с РНК гена *ras2* *in vitro*.

Федеральное государственное учреждение науки
Институт Молекулярной Биологии Российской
академии наук, Москва, Российская Федерация

*e-mail: d_dmitrieva@mail.ru

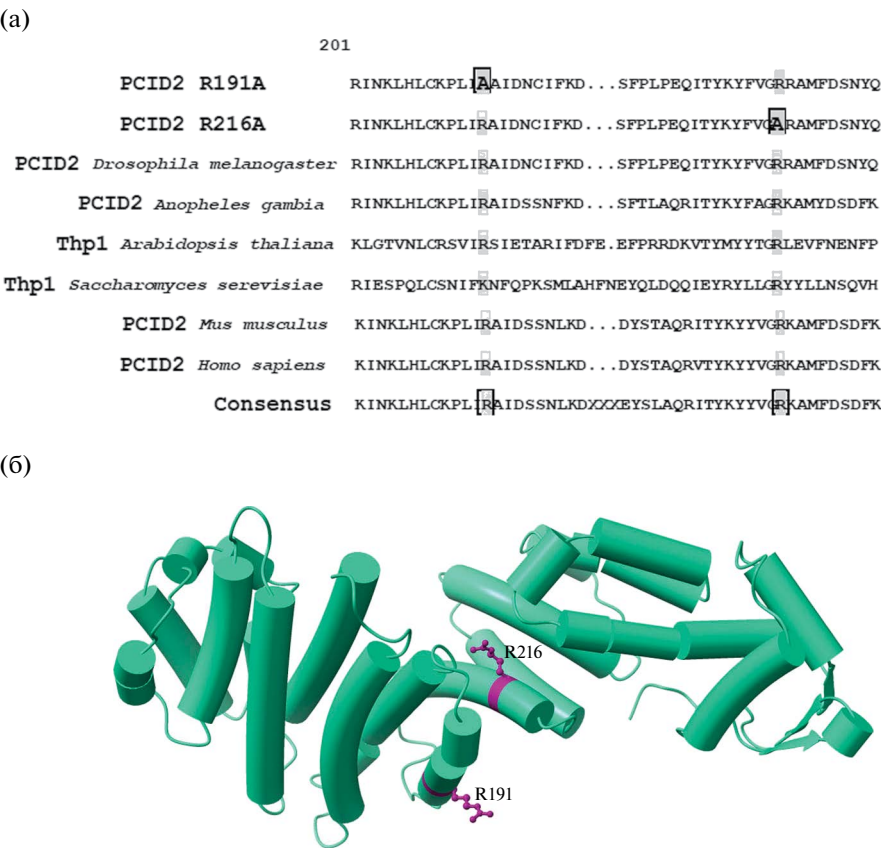


Рис. 1. Предсказанные сайты связывания с РНК на молекуле PCID2. (а) Эволюционное выравнивание последовательности М-домена PCID2 у некоторых видов эукариот. Аминокислоты, замененные в мутантных белках PCID2^{R191A} и PCID2^{R216A}, выделены и обведены в рамку. (б) Предсказанная структура PCID2 *D. melanogaster* из базы данных AlphaFold Protein Structure Database. Аминокислоты в М-доме белка, замененные в мутантных белках PCID2^{R191A} и PCID2^{R216A}, указаны на предсказанной структуре PCID2.

На первом этапе работы было проверено, нарушают ли данные мутации связывание PCID2 с РНК клетки. Для этого культуру клеток S2 растили в среде с добавлением 5-этинилуридина 2 часа [13]. Тотальную РНК, меченную 5-этинилуридином и биотином, выделяли из клеток на колонках со стрептавидин-агарозой [13]. Далее, одинаковое количество меченой РНК, иммобилизованной на стрептавидин-агарозе, инкубировали с лизатами белков PCID2 дикого типа или мутированных форм PCID2^{R191A} и PCID2^{R216A}, наработанными в бактериальной системе (рис. 2а).

В аналогичном эксперименте меченную тотальную РНК инкубировали с экстрактом клеток, трансформированных конструкциями для экспрессии PCID2 дикого типа или мутированных форм PCID2: PCID2^{R191A} и PCID2^{R216A} (рис. 2б). После инкубации материал отмывали от несвязавшегося белка высоко-солевым раствором, содержащим 500 мМ KCl. Ассоциированные с РНК белки детектировали с помощью разделения

в ПААГ и вестерн-блот гибридизации с антителами к PCID2 (рис. 2а, б).

Эксперимент по взаимодействию тотальной РНК клетки с формами PCID2, экспрессированными в бактериях, показал, что белок PCID2 дикого типа, как и мутантные формы, связываются с РНК. Однако, мутантные формы PCID2 хуже осаждались за РНК, что говорит об их худшем связывании. Связывание обоих мутантных белков с новосинтезированной РНК было слабее по сравнению с контролем. Однако мутация R216A приводила к наибольшему ослаблению взаимодействия (рис. 2 а,б), что соответствует результатам, полученным ранее [14]. При инкубации тотальной меченной РНК с ядерными экстрактами клеток, в которых экспрессировали PCID2, PCID2^{R191A} или PCID2^{R216A}, были получены аналогичные результаты (рис. 2 б). Таким образом, можно заключить, что мутации данных аминокислот нарушают связывание PCID2 с РНК в белковом экстракте аналогично тому, как это было показано *in vitro*. Более того, данные мутации нарушают связывание

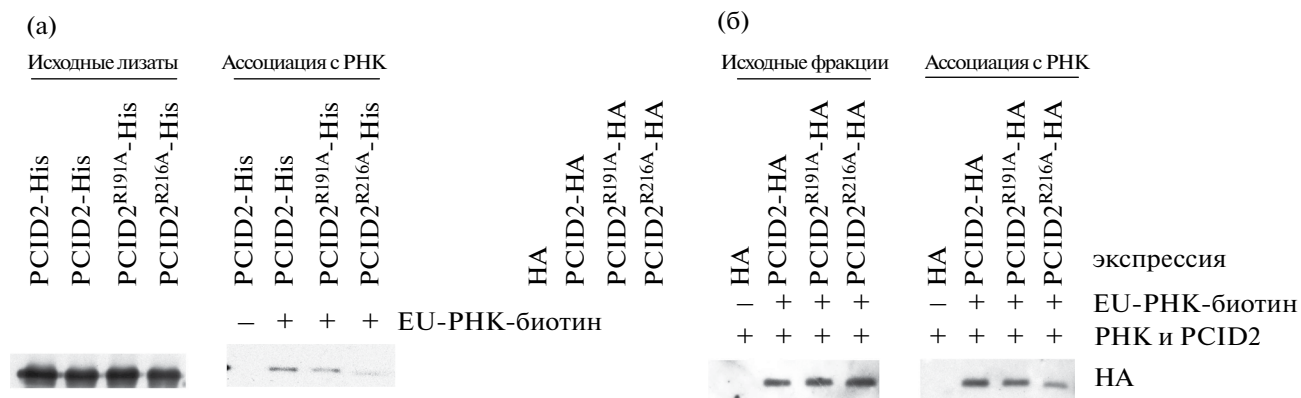


Рис. 2. Нарушение ассоциации PCID2 с точечными мутациями в М-домене с новосинтезированной РНК. Меченую биотином EU-РНК инкубировали с лизатами клеток, содержащих PCID2, или PCID2^{R191A}, или PCID2^{R216A}, экспрессированными в (а) бактериальной системе и (б) в S2 клетках *D. melanogaster*. Меченная биотином EU-РНК со связавшимися белками была иммобилизована на стрептавидин-агарозе. Ассоциированные с РНК белки детектировали вестерн-блот анализом.

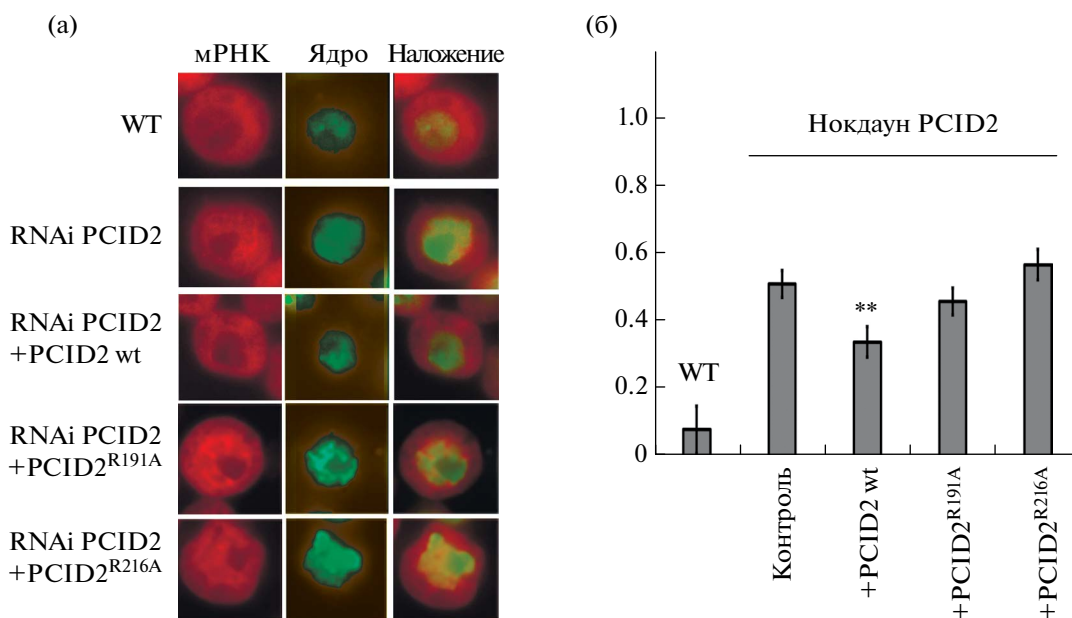


Рис. 3. PCID2 с точечными мутациями в М-домене не способен выполнять свои функции в экспорте мРНК. (а) Распределение мРНК в S2 клетках в контрольных клетках (wt) и при нокдауне PCID2 (контроль). В экспериментах клетки, в которых проводился нокдаун PCID2, были трансфицированы полноразмерным PCID2 или PCID2^{R191A}, или PCID2^{R216A}. Примеры распределения мРНК (красное окрашивание) и клеточных ядер (зеленое окрашивание) и соответствующие слитые изображения показаны для контрольных клеток и клеток после нокдауна PCID2 и трансфекции с PCID2wt, PCID2^{R191A}, PCID2^{R216A} (увеличение, x1000). Для выявления поли(А) РНК проводили РНК FISH с использованием меченного Су3-олиго-dТ праймера. Ядра окрашивали DAPI. Изображения были перекрашены в программе Photoshop для лучшей визуализации. (б) Процент клеток, в которых мРНК оставалась в ядре. На гистограмме представлены результаты эксперимента, описанного на Рисунке 3а. Каждый эксперимент был проведен в четырех повторах. В каждой реплике вслепую подсчитывали около 200 клеток и вычисляли среднее значение. Сравнение между экспериментальными группами проводилось с помощью t-критерия Стьюдента. Все данные представлены как средние $\pm$ SD (столбцы ошибок) не менее чем для четырех независимых экспериментов. Звездочки указывают на то, что данные статистически значимы при *P < 0,05 или **P < 0,01.

с тотальной РНК, а не только для РНК *ras2*, для которой это было показано ранее *in vitro*.

Влияние мутантных белков на экспорт мРНК было изучено на клетках S2 *D. melanogaster*. В клетках был проведен нокдаун эндогенного белка PCID2 методом РНК интерференции. Распределение мРНК в клетке выявлялось с помощью FISH с меченым Су3-oligo-dT праймером [4]. В контрольных клетках основная часть мРНК выявлялась в цитоплазме (рис. 3а), в то время как при нокдауне PCID2 мРНК перераспределялась, концентрируясь в ядре и вокруг ядра в цитоплазме, демонстрируя паттерн распределения, показанный ранее [12].

Чтобы понять, влияют ли исследуемые мутации PCID2 на экспорт мРНК, в клетках с нокдауном эндогенного PCID2 были экспрессированы полно-размерный PCID2 дикого типа, мутантный белок PCID2^{R191A} или мутантный белок PCID2^{R216A}, слитые с НА-эпитопом.

При нокдауне PCID2 51% клеток имеют нарушения в экспорте мРНК (рис. 3б). При экспрессии в клетках с нокдауном эндогенного PCID2 рекомбинантного PCID2, количество клеток с нарушениями уменьшалось до 34%, что указывает на его способность восстанавливать экспорт мРНК. Наоборот, экспрессия мутантного белка PCID2^{R191A} только незначительно восстанавливала экспорт мРНК: количество клеток с нарушениями уменьшалось до 46%. При экспрессии белка PCID2^{R216A} количество клеток с нарушениями даже незначительно увеличивалось (до 57%), сами же клетки теряли свою округлую форму (рис. 3а, б). Эти эксперименты показывают, что мутантные формы PCID2, R191A и R216A, не способны заменить эндогенный PCID2 в ядерном экспорте мРНК.

Таким образом, роль аминокислот Arg191 и Arg216 М-домена PCID2 во взаимодействии с *ras2* мРНК, показанная ранее в системе *in vitro*, подтвердилась на экспериментах, проведенных в клетке на полиА-содержащей мРНК. Более того, нарушение этого взаимодействия приводит к нарушению экспорта мРНК в ядре. Данные результаты показывают, что правильное взаимодействие М-домена PCID2 с молекулой РНК, необходимо для работы всего комплекса экспорта мРНК TREX-2.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была выполнена с использованием оборудования ЦКП ИМБ РАН.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа была выполнена при поддержке гранта РНФ № 22-14-00270.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Данная статья не содержит исследований с участием животных или людей, проведенных кем-либо из авторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kramer S.* Nuclear mRNA maturation and mRNA export control: from trypanosomes to opisthokonts. // *Parasitology*. England, 2021. Vol. 148, № 10. P. 1196–1218.
2. *Wilmes G.M. et al.* A genetic interaction map of RNA-processing factors reveals links between Sem1/Dss1-containing complexes and mRNA export and splicing. // *Molecular cell*. United States, 2008. Vol. 32, № 5. P. 735–746.
3. *Santos-Pereira J.M. et al.* A genome-wide function of THSC/TREX-2 at active genes prevents transcription-replication collisions. // *Nucleic acids research*. England, 2014. Vol. 42, № 19. P. 12000–12014.
4. *Kurshakova M.M. et al.* SAGA and a novel Drosophila export complex anchor efficient transcription and mRNA export to NPC // *EMBO Journal*. 2007. Vol. 26, № 24.
5. *Lu Q. et al.* Arabidopsis homolog of the yeast TREX-2 mRNA export complex: components and anchoring nucleoporin. // *The Plant journal : for cell and molecular biology*. England, 2010. Vol. 61, № 2. P. 259–270.
6. *Fischer T. et al.* The mRNA export machinery requires the novel Sac3p-Thp1p complex to dock at the nucleoplasmic entrance of the nuclear pores. // *The EMBO journal*. England, 2002. Vol. 21, № 21. P. 5843–5852.
7. *Rodríguez-Navarro S. et al.* Sus1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore-associated mRNA export machinery. // *Cell*. United States, 2004. Vol. 116, № 1. P. 75–86.
8. *Chekanova J.A. et al.* Sus1, Sac3, and Thp1 mediate post-transcriptional tethering of active genes to the nuclear rim as well as to non-nascent mRNP. // *RNA* (New York, NY). 2008. Vol. 14, № 1. P. 66–77.
9. *Ellisdon A.M. et al.* Structural basis for the assembly and nucleic acid binding of the TREX-2 transcription-export complex. // *Nature structural & molecular biology*. United States, 2012. Vol. 19, № 3. P. 328–336.
10. *Fischer T. et al.* Yeast centrin Cdc31 is linked to the nuclear mRNA export machinery. // *Nature cell biology*. England, 2004. Vol. 6, № 9. P. 840–848.
11. *Jani D. et al.* Functional and structural characterization of the mammalian TREX-2 complex that links transcription with nuclear messenger RNA export. //

- Nucleic acids research. England, 2012. Vol. 40, № 10. P. 4562–4573.
12. *Glukhova A.A. et al.* PCID2, a subunit of the *Drosophila* TREX-2 nuclear export complex, is essential for both mRNA nuclear export and its subsequent cytoplasmic trafficking // *RNA Biology*. United States, 2021. Vol. 18, № 11. P. 1969–1980.
13. *Kopytova D. et al.* ORC interacts with THSC/TREX-2 and its subunits promote Nxf1 association with mRNP and mRNA export in *Drosophila* // *Nucleic Acids Research*. 2016. Vol. 44, № 10.
14. *Vdovina Y.A. et al.* PCID2 Subunit of the *Drosophila* TREX-2 Complex Has Two RNA-Binding Regions. // *Current issues in molecular biology*. Switzerland, 2023. Vol. 45, № 7. P. 5662–5676.
15. *Vdovina Y.A., Georgieva S.G., Kopytova D.V.* Interaction of mRNA with the C-Terminal Domain of PCID2, a Subunit of the TREX-2 Complex, Is Required for Its Export from the Nucleus to the Cytoplasm in *Drosophila melanogaster*. // *Doklady Biochemistry and biophysics*. United States, 2023. Vol. 513, № 1. P. 328–331.

POINT MUTATIONS IN THE M-DOMAIN OF PCID2 IMPAIR ITS FUNCTION IN MRNA EXPORT IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Y. A. Vdovina, Academician of the RAS S. G. Georgieva, D. V. Kopytova[#]

Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

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

PCID2 protein is a component of the eukaryotic TREX-2 complex responsible for mRNA export from the nucleus to the cytoplasm. Previously, we showed that PCID2 of *D. melanogaster* is involved in specific mRNA recognition and identified key amino acids responsible for interaction with the RNA of the *ras2* gene. In this work, we show that point mutations of these amino acids disrupt the interaction of the protein with cellular RNA and the export of polyA-containing mRNA from the nucleus to the cytoplasm in *Drosophila* cells.

Keywords: PCID2, TREX-2, mRNA export, transcription