

УДК 577.218

БЕЛОК XMAS-2, ОСНОВНОЙ БЕЛОК КОМПЛЕКСА ЭКСПОРТА мРНК TREX-2, НЕ ОПРЕДЕЛЯЕТ СПЕЦИФИЧНОСТЬ СВЯЗЫВАНИЯ мРНК *Ras2* КОМПЛЕКСОМ

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

Поступило 04.06.2024 г.

После доработки 20.06.2024г.

Принято к публикации 20.06.2024 г.

Комплекс TREX-2 эукариот отвечает за экспорт из ядра в цитоплазму широкого спектра мРНК. Ранее мы показали, что субъединица комплекса TREX-2 *D. melanogaster*, белок PCID2, имеет домен, специфично взаимодействующий с РНК. Однако, остается неизвестным, участвуют ли другие компоненты комплекса во взаимодействии с целевой мРНК и в ее узнавании. В настоящей работе мы определяли роль Xmas-2, основной структурной субъединицы комплекса, в специфичном распознавании фрагментов мРНК *ras2*. В данной работе мы показали, что Xmas-2 взаимодействует с мРНК *ras2* независимо от других субъединиц комплекса. Мы показали, что РНК-связывающие домены располагаются как в N-концевом домене, так и С-концевом домене Xmas-2. Однако, взаимодействие белка с фрагментами мРНК *ras2* не зависит от последовательности и структуры РНК и является неспецифичным. Таким образом, субъединица Xmas-2 не участвует в распознавании комплексом определенных последовательностей РНК.

Ключевые слова: TREX-2, Xmas-2, экспорт мРНК, транскрипция, EMSA

DOI: 10.31857/S2686738924050174

Эволюционно-консервативный комплекс эукариот TREX-2 отвечает за экспорт мРНК из ядра в цитоплазму [1–5]. У *D. melanogaster* в его состав входят белки Xmas-2, PCID2, ENY2 и Sem1p [6]. В составе комплекса Xmas-2 представляет собой структурную субъединицу, с которой взаимодействуют другие субъединицы комплекса [7, 8–11]. Комплекс отвечает за ядерный экспорт широкого спектра молекул мРНК. Однако, существуют данные, что экспорт не всех мРНК зависит от TREX-2 [12]. В связи с этим встает вопрос, как комплекс узнает свои целевые мРНК и какие белки комплекса отвечают за взаимодействие с определенной мРНК. Недавно мы показали, что у *D. melanogaster* субъединица PCID2 связывает РНК гена *ras64B* (*ras2*) с помощью двух доменов, один из которых специфично связывается с 3'-некодирующей областью мРНК *ras2* [13]. Другой домен PCID2 взаимодействует с мРНК неспецифично, но для его связывания необходим

домен специфичного взаимодействия. Таким образом, первоначальное узнавание последовательности мРНК происходит за счет специфического домена, после чего происходит специфичное взаимодействие PCID2 с мРНК [13].

В данной работе мы исследовали, участвует ли основная структурная субъединица Xmas-2 в специфичном взаимодействии с мРНК *ras2*. На первом этапе была изучено, связывается ли Xmas-2 с какими-то определенными участками целевой мРНК. Для эксперимента по связыванию был взят полноразмерный Xmas-2 и мРНК гена *ras2*, поскольку ранее методом иммунопреципитации РНК было показано взаимодействие Xmas-2 с данной мРНК [6]. Схема деления РНК на фрагменты представлена на Рисунке 1а.

РНК была поделена на четыре фрагмента: 1 — включал в себя 5'-некодирующую область *ras2*, 2 и 3 — последовательные фрагменты кодирующей области, 4 — 3'-некодирующую область *ras2*. Для экспериментов EMSA фрагменты РНК были радиоактивно мечены [32P]УТР. В реакцию связывания с РНК добавляли экспрессированный в бактериальной системе и очищенный полноразмерный Xmas-2, слитый с GST-эпитопом. По результатам эксперимента оказалось, что GST-Xmas-2

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук

*e-mail: d_dmitrieva@mail.ru

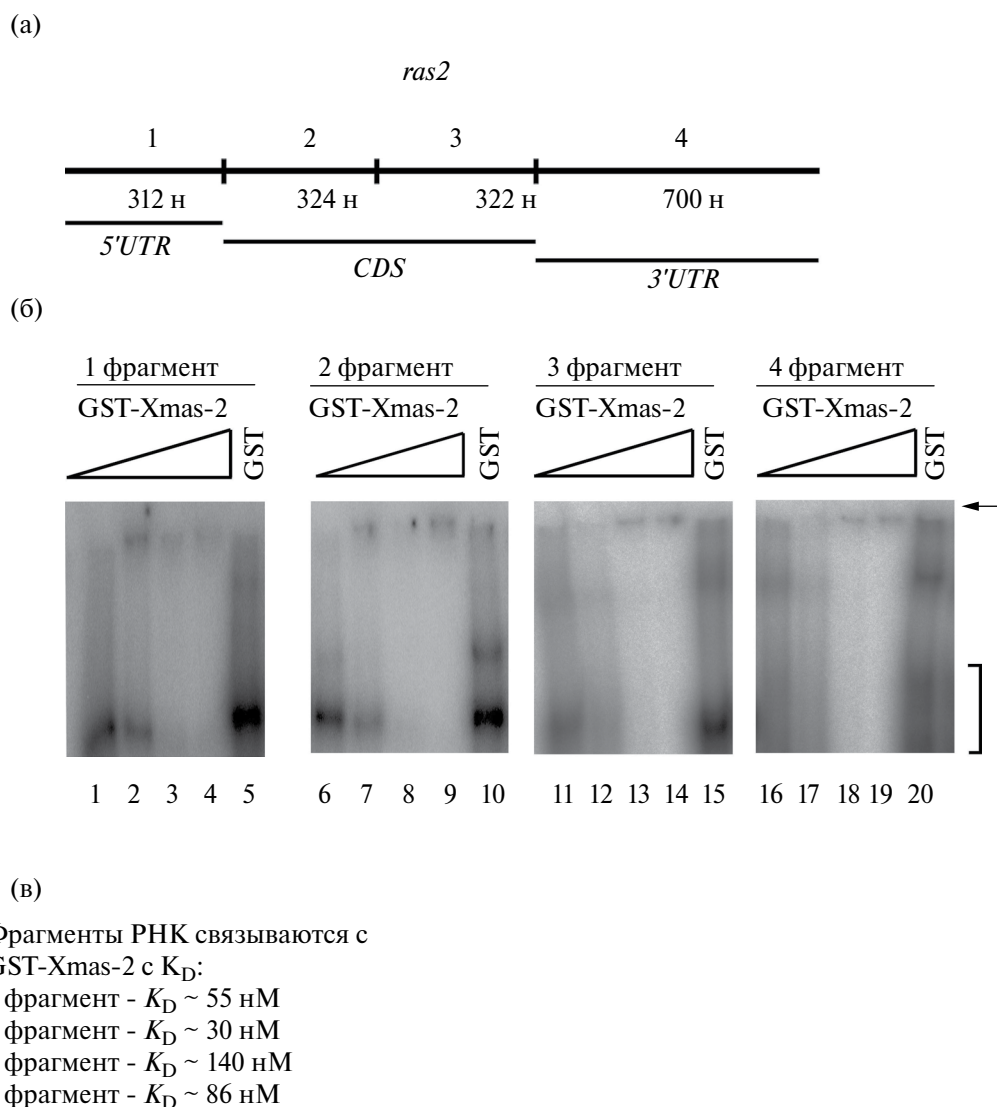


Рис. 1. Анализ взаимодействия полноразмерного Xmas-2 с фрагментами РНК *ras2* гена *D. melanogaster*. (а) Схема деления *ras2* на фрагменты, взятые в эксперимент по связыванию. (б) На рисунке представлены автографы 5% ПААГ. Скобочкой отмечена миграция свободной РНК, а стрелочкой образующиеся комплексы белок-РНК. Концентрация каждого меченого фрагмента РНК в реакции связывания составляла 25 нМ. Представлены результаты взаимодействия GST-Xmas-2: на дорожках 1–5 – с фрагментом 1 *ras2*; 6–10 – с фрагментом 2 *ras2*; 11–15 – с фрагментом 3 *ras2*; 16–20 – с фрагментом 4 *ras2*. На первой дорожке каждой реплики белок отсутствовал (полосы 1, 6, 11, 16), на каждой копии концентрация GST-Xmas-2 составляла 12,5 нМ – на второй дорожке, 25 нМ – на третьей дорожке, 50 нМ – на четвертой дорожке. На пятой дорожке каждой копии представлен результат связывания 7 нМ GST с РНК. (в) На рисунке представлены K_D , посчитанные по результатам, представленным на рис. 1б.

связывает каждый из протестированных фрагментов РНК *ras2* (Рис. 1б, в).

Таким образом, Xmas-2 может взаимодействовать с мРНК независимо от других белков комплекса TREX-2. При этом Xmas-2 связывает фрагменты РНК *ras2* независимо от их последовательности, то есть его взаимодействие с РНК является неспецифичным.

Ранее нами было показано, что в клетке Xmas-2 специфически расщепляется на два белка,

соответствующих его N- и C-концевым последовательностям (N-концевой Xmas-2 около 80 кДа, C-концевой около 100 кДа) [14]. N-концевой фрагмент включает в себя SAC3-GANP домен, отвечающий за взаимодействие с PCID2 и РНК, а C-концевой фрагмент содержит домен CID, отвечающий за взаимодействие с ENY2 и ядерной порой. Можно предположить, что за взаимодействие с РНК отвечают домены, расположенные только в одном из фрагментов Xmas-2,

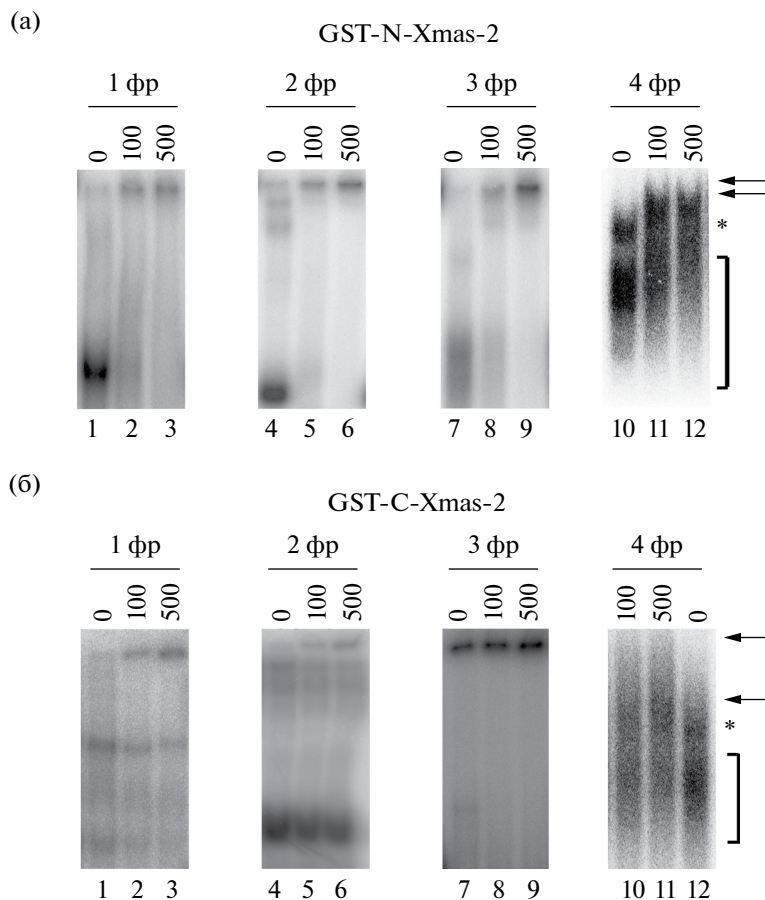


Рис. 2. Анализ взаимодействия С-Xmas-2 и N-Xmas-2 с фрагментами мРНК *ras2*. (а, б) Комплексы, образующиеся при связывании N-Xmas-2 и С-Xmas-2 с фрагментами *ras2* РНК анализировали на 5% ПААГ. На рисунке представлены автографы. Скобочкой и, в случае белка GST, звездочкой, отмечена миграция свободной РНК, а стрелочкой отмечены образующиеся комплексы белок-РНК. Концентрация меченых $[^{32}\text{P}]\text{UTP}$ фрагментов мРНК *ras2* в реакции связывания составляла 25 нМ. (а) РНК инкубировали с увеличивающимися количествами очищенного GST-N-Xmas-2: дорожки 1, 4, 7, 10 – белок в реакцию не добавлялся; 2, 5, 8, 11 – 5 нМ белка было добавлено в реакцию связывания; 3, 6, 9, 12 – 50 нМ белка было добавлено в реакцию связывания. (б) РНК инкубировали с увеличивающимися количествами очищенного GST-C-Xmas-2: дорожки 1, 4, 7, 12 – белок в реакцию не добавлялся; 2, 5, 8, 10 – 5 нМ белка было добавлено в реакцию связывания; 3, 6, 9, 11 – 50 нМ белка было добавлено в реакцию связывания.

или N- и С-концевой домены взаимодействуют с РНК с различной эффективностью. Для проверки данного предположения были созданы конструкции, содержащие кодирующие последовательности N-концевой части Xmas-2 (1-594 ак) и С-концевой части Xmas-2 (595-1370 ак), слитые с GST-эпитопом. Сверхэкспрессированные в бактериальной системе очищенные белки связывали с радиоактивно мечеными фрагментами РНК *ras2*, использованными ранее в экспериментах по связыванию полноразмерного Xmas-2 (Рис. 1а). В реакциях EMSA как N-Xmas-2 (Рис. 2а), так и С-Xmas-2 (Рис. 2б), слитые с GST-эпитопом, связывали каждый из фрагментов *ras2* РНК, взятый в эксперимент.

Таким образом, Xmas-2 имеет домены взаимодействия с РНК как в N-концевой, так и в С-концевой

части. Оба домена белка могут связывать фрагменты РНК *ras2* независимо друг от друга.

Для проверки того, взаимодействуют ли N-концевая и С-концевая части Xmas-2 с мРНК *in vivo* были проведены эксперименты по иммунопреципитации мРНК *ras2* из S2 клеток *D. melanogaster*. В S2 клетках были сверхэкспрессированы N-Xmas-2 и С-Xmas-2, слитые с тремя FLAG-эпитопами (Рис. 3а).

Из ядерного экстракта S2 клеток была проведена иммунопреципитация РНК, с использованием антител к FLAG-эпитопу. Как N-Xmas-2, так и С-Xmas-2 эффективно осаждали РНК *ras2* из лизата клеток (Рис. 3б). Таким образом, оба фрагмента Xmas-2, сверхэкспрессированные в S2 клетках *D. melanogaster*, взаимодействуют

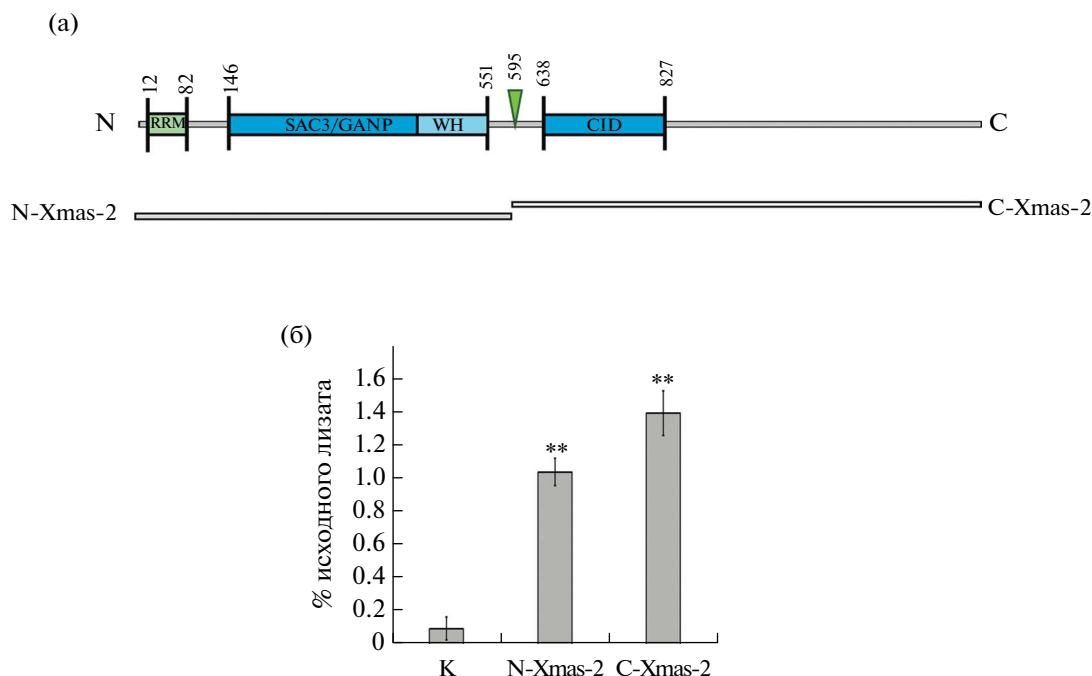


Рис. 3. N-Xmas-2 и C-Xmas-2 осаждают мРНК *ras2* из ядерного экстракта S2 клеток. (а) Схема доменной организации белка Xmas-2. На схеме отмечены моделирующие расщепление Xmas-2 сверхэкспрессированные с FLAG-эпитопами белки, содержащие N- и C-концевые фрагменты Xmas-2. (б) Реакции иммунопреципитации мРНК (RIP) *ras2* были проведены с использованием антител к FLAG-эпиту из ядерных экстрактов S2 клеток с сверхэкспрессированными белками FLAG-N-Xmas-2 и FLAG-C-Xmas-2. В качестве контроля был использован неиммунный IgG.

с РНК, что подтверждает данные, полученные в EMSA.

Таким образом, мы показали, что белок Xmas-2 имеет несколько доменов связывания мРНК *ras2*, расположенных в N- и C-концевых частях белка. Присутствие домена взаимодействия с РНК в N-концевой части Xmas-2 было также показано для дрожжей [9]. В данной работе впервые показано, что у высших эукариот существуют два участка взаимодействия. Мы также показали, что взаимодействие Xmas-2 с РНК *in vitro* неспецифично. Вероятно, за специфичность взаимодействия комплекса TREX-2 с РНК отвечают другие белки комплекса. Одним из них, как было показано нами ранее, является PCID2 [13].

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была выполнена с использованием оборудования ЦКП ИМБ РАН.

ИНФОРМАЦИЯ О КОНФЛИКТЕ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. 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.
3. 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.

4. Luna R., Gonzalez-Aguilera C., Aguilera A. Transcription at the proximity of the nuclear pore: a role for the THP1-SAC3-SUS1-CDC31 (THSC) complex. // RNA biology. United States, 2009. Vol. 6, № 2. P. 145–148.
5. Wickramasinghe V.O. et al. mRNA export from mammalian cell nuclei is dependent on GANP. // Current biology : CB. England, 2010. Vol. 20, № 1. P. 25–31.
6. 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.
7. Gordon J.M.B., Aibara S., Stewart M. Structure of the Sac3 RNA-binding M-region in the Saccharomyces cerevisiae TREX-2 complex. // Nucleic acids research. 2017. Vol. 45, № 9. P. 5577–5585.
8. Aibara S., Bai X.-C., Stewart M. The Sac3 TPR-like region in the Saccharomyces cerevisiae TREX-2 complex is more extensive but independent of the CID region. // Journal of structural biology. 2016. Vol. 195, № 3. P. 316–324.
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. Jani D. et al. Sus1, Cdc31, and the Sac3 CID region form a conserved interaction platform that promotes nuclear pore association and mRNA export. // Molecular cell. United States, 2009. Vol. 33, № 6. P. 727–737.
11. Stewart M. Structure and Function of the TREX-2 Complex. // Sub-cellular biochemistry. United States, 2019. Vol. 93. P. 461–470.
12. Wickramasinghe V.O. et al. Selective nuclear export of specific classes of mRNA from mammalian nuclei is promoted by GANP. // Nucleic acids research. England, 2014. Vol. 42, № 8. P. 5059–5071.
13. 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.
14. Kurshakova M.M., Georgieva S.G., Kopytova D.V. The Xmas-2 Protein of Drosophila melanogaster Undergoes Cleavage into Two Fragments. // Doklady Biochemistry and biophysics. United States, 2023. Vol. 509, № 1. P. 37–40.

XMAS-2 PROTEIN, A CORE PROTEIN OF THE TREX-2 MRNA EXPORT COMPLEX, IS NOT DETERMINED THE SPECIFICITY OF RAS2 MRNA BINDING BY THE COMPLEX

M. M. Kurshakova, Y. A. Vdovina, Academician of the RAS S. G. Georgieva, D. V. Kopytova

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

*e-mail: d_dmitrieva@mail.ru

The TREX-2 complex of eukaryotes is responsible for the export of a wide range of mRNAs from the nucleus to the cytoplasm. Previously, we showed that a subunit of the *D. melanogaster* TREX-2 complex, the PCID2 protein, has a domain that specifically interacts with RNA. However, it remains unknown whether other components of the complex are involved in interaction with and recognition of the target mRNA. In the present work, we determined the role of Xmas-2, the core structural subunit of the complex, in the specific recognition of *ras2* mRNA fragments. In this work, we showed that Xmas-2, interacts with *ras2* mRNA independently of other subunits of the complex. We showed that RNA-binding domains are located in both the N-terminal domain and the C-terminal domain of Xmas-2. However, the interaction of the protein with *ras2* mRNA fragments is independent of RNA sequence and structure and is nonspecific. Thus, the Xmas-2 subunit is not involved in the recognition of specific RNA sequences by the complex.

Keywords: TREX-2, Xmas-2, mRNA export, transcription, EMSA