

УДК 577.218

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ Xmas-2, ОСНОВНОГО БЕЛКА TREX-2 КОМПЛЕКСА ЭКСПОРТА мРНК, И БЕЛКА Orc3, СУБЪЕДИНИЦЫ ORC КОМПЛЕКСА *D. melanogaster*

© 2021 г. М. М. Куршакова^{1,*}, Д. В. Копытова¹, член-корреспондент РАН С. Г. Георгиева¹

Поступило 23.09.2020 г.

После доработки 29.09.2020 г.

Принято к публикации 30.09.2020 г.

Белковый комплекс TREX-2 является ключевым участником экспорта мРНК из ядра в цитоплазму через ядерные поры. Ранее у *D. melanogaster* был выделен белковый комплекс, состоящий из комплекса TREX-2 и комплекса ORC. Было показано, что в составе TREX-2-ORC комплекса белок Xmas-2, который является платформой для сборки TREX-2, взаимодействует с белком Orc3. Целью данной работы было исследовать, какие участки аминокислотной последовательности Xmas-2 участвуют во взаимодействии с Orc3. Показано, что для взаимодействия Xmas-2 с Orc3 необходим участок С-концевой последовательности Xmas-2, расположенный с 3'-стороны от CID-домена.

Ключевые слова: Xmas-2, Orc3, TREX-2, mRNA export

DOI: 10.31857/S2686738921010145

Экспорт мРНК из ядра в цитоплазму является важным этапом экспрессии генов. С мРНК на разных стадиях ее созревания и экспорта связываются различные белки, формируя так называемую мРНК частицу. Белки в составе мРНК частицы регулируют процессинг и экспорт мРНК через ядерные поры [1]. Ключевым участником экспорта является эволюционно консервативный белковый комплекс TREX-2, который ассоциирован с ядерной порой и необходим для экспорта мРНК.

Комплекс TREX-2 был впервые выделен у дрожжей. Центральной субъединицей комплекса является белок Sac3, который служит платформой для сборки остальных субъединиц комплекса – белков Cdc31, Thp1, двух молекул белка Sus1, а также кофактора Sem1p. [2, 3]. Делеция любой из субъединиц TREX-2 приводит к нарушениям экспорта мРНК [2–5]. Комплексы, гомологичные TREX-2 дрожжей, были обнаружены у растений и человека [6, 7]. В нашей группе был описан TREX-2 *D. melanogaster* [8], показано, что TREX-2 ассоциирован с ядерной порой и необходим для экспорта мРНК из ядра в цитоплазму. Основой комплекса является белок Xmas-2, гомологичный Sac3, с которым взаимодействуют белки ENY2 и

PCID2, соответствующие дрожжевым Sus1 и Thp1. Затем в нашей группе был выделен совместный комплекс TREX-2 с ORC комплексом. ORC комплекс эволюционно консервативен, состоит из шести субъединиц – Orc1, Orc2, Orc3, Orc4, Orc5, Orc6 [9]. У дрожжей ORC комплекс распознает сайты начала репликации и необходим для инициации репликации. Однако у высших эукариот гомологичные ORC комплексы проявляют дополнительные свойства, не связанные с репликацией [10]. Было показано, что белки ORC взаимодействуют с мРНК частицей TREX-2-зависимым образом и необходимы для экспорта мРНК. Субъединицы ORC взаимодействуют с экспортным адаптером NXF1 и влияют на связывание NXF1 с мРНК частицей. Было высказано предположение, что белки ORC совместно с TREX-2 входят в состав мРНК частицы, участвуя на каком-то этапе в экспортном пути мРНК.

Ранее было показано, что в составе TREX-2-ORC комплекса белок Orc3 физически взаимодействовал с белками Xmas-2 и ENY2, а также с мРНК [9, 11]. Было высказано предположение, что взаимодействие Xmas-2 и Orc3 отвечает за взаимодействие TREX-2 и ORC комплексов [11]. С целью понять, как происходит взаимодействие TREX-2 и ORC, в данной работе была поставлена задача исследовать, какие области аминокислотной последовательности Xmas-2 участвуют в связывании белка Orc3.

С целью выделить функциональные домены Xmas-2 был проведен сравнительный анализ ами-

¹ Федеральное государственное учреждение науки
Институт биологии гена Российской академии наук,
Москва, Россия

*e-mail: kursha@mail.ru

нокислотных последовательностей Xmas-2 и его гомолога у человека белка GANP, для которого определены области взаимодействия с белками TREX-2 комплекса человека и мРНК [7, 12, 13]. На N-конце Xmas-2 расположены RRM-домен и M-домен, гомологичные домены у GANP осуществляют взаимодействие с мРНК. M-домен и расположенный внутри него WH-домен у GANP участвуют во взаимодействии с PCID2. В С-концевой части Xmas-2 находится CID-домен, который у GANP необходим для связывания двух молекул ENY2. Последовательность на С-конце Xmas-2 варьируема между различными эукариотическими организмами и не содержит определенного мотива.

Были созданы экспрессионные конструкции Xmas-2-N, Xmas-2-C, Xmas-2-dRRM, Xmas-2-dM, Xmas2-dCID, кодирующие различные участки белка Xmas-2 в одной рамке считывания с FLAG-эпитопом (рис. 1а). Xmas-2-N конструкция содержала N-концевую половину последовательности Xmas-2 (1–670 а.о.), Xmas-2-C конструкция кодировала С-концевую половину последовательности Xmas-2 (673 а.о.–1359 а.о.), которая включала CID-домен. В конструкции Xmas-2-dRRM (253–1359 а.о.) отсутствовал фрагмент N-концевой последовательности Xmas-2, содержащий RRM-домен, но последовательности, кодирующие M-домен и CID-домен, оставались ненарушенными. Конструкция Xmas-2-dM (440–1359 а.о.) представляла собой укороченный с N-конца вариант Xmas-2-dRRM и содержала WH-домен и CID-домен, при этом M-домен был нарушен. Конструкция Xmas2-dCID (835–1359 а.о.) содержала С-концевой участок Xmas-2, расположенный с 3'-стороны от CID-домена. Участки кодирующей последовательности Xmas-2 были клонированы в вектор pAc5.1/V5 His B (Invitrogen) в одной рамке считывания с тремя FLAG-эпитопами на N-конце. Трансформация S2 клеток *D. melanogaster* конструкциями проводилась при помощи MACSfectin Reagent (Miltenyi Biotec) по протоколу производителя.

Далее определяли, с каким фрагментом Xmas-2-FLAG взаимодействует эндогенный Orc3 (рис. 1б). В качестве положительного контроля использовался полноразмерный Xmas-2-FLAG (full). Все фрагменты Xmas-2-FLAG успешно экспрессировались, что было подтверждено их осаждением антителами к FLAG-эпитопу из тотальных лизатов S2 клеток. Далее методом иммуноосаждения проверили, какие фрагменты Xmas-2 взаимодействуют с Orc3. Антитела к Orc3 [9] соосаждали вместе с Orc3 все тестируемые Xmas-2-FLAG фрагменты, кроме N-концевого фрагмента. Взаимодействие между эндогенным Orc3 и фрагментами Xmas-2-C, Xmas-2-dRRM, Xmas-2-dM, Xmas2-dCID детектировалось на одинаковом уровне. Все эти фрагменты содержали участок

С-концевой аминокислотной последовательности Xmas-2, 835–1359 а.о., расположенный с 3'-стороны от CID-домена. Следовательно, С-концевой участок Xmas-2 был достаточен для связывания эндогенного Orc3, при этом наличие CID-домена не являлось необходимыми для взаимодействия.

Весь эндогенный Orc3 находится в составе комплекса ORC, вследствие чего другие белки комплекса могут влиять на исследуемое взаимодействие. Поэтому на следующем этапе мы исследовали прямое взаимодействие оверэкспрессированных Xmas-2-FLAG фрагментов и оверэкспрессированного (свободного от других белков комплекса ORC) Orc3, слитого с HA-эпитопом (Orc3-HA) (рис. 1в). В качестве положительного контроля использовался полноразмерный Xmas-2-FLAG (full). Все фрагменты Xmas-2-FLAG были осаждены антителами к FLAG-эпитопу. Orc3-HA был соосажен с фрагментами Xmas-2-dRRM и Xmas-2-C, но не детектировался с Xmas-2-dCID. Антитела к HA-эпитопу осадили Orc3-HA и соосадили фрагменты Xmas-2-C, Xmas-2-dRRM и Xmas2-dCID. Взаимодействие между Orc3-HA и фрагментом Xmas-2-dM-FLAG обнаружить не удалось, что может быть объяснено низким уровнем экспрессии этого фрагмента в S2 клетках. Взаимодействие между Orc3-HA и Xmas-2-N не было детектировано.

Полученные результаты позволяют предположить, что взаимодействие Xmas-2 и Orc3 в составе TREX-2-ORC комплекса осуществляется через С-концевую область Xmas-2, расположенную с 3'-стороны от CID-домена. N-конец Xmas-2 и содержащиеся там RRM-, M-, WH-домены не являются необходимыми для взаимодействия Xmas-2 с Orc3.

Для взаимодействия С-концевого участка Xmas-2 с эндогенным Orc3 наличие CID-домена не являлось необходимым. Однако взаимодействие оверэкспрессированных Xmas-2 фрагментов и Orc3-HA друг с другом при наличии CID-домена улучшалось. В первом случае Xmas-2 фрагмент связывается с Orc3, который находится в составе ORC комплекса и ассоциирован с ENY2 [9, 11], а во втором оверэкспрессированные фрагменты Xmas-2 и Orc3 взаимодействуют без участия других белков. Было показано, что в составе TREX-2-ORC комплекса Orc3 непосредственно связывается с двумя молекулами ENY2, а ENY2 ассоциируется с С-концевой частью Xmas-2, вероятно, в области CID-домена [8, 11]. Можно предположить, что ассоциация эндогенного Orc3 с ENY2 и другими белками ORC изменяет конформацию Orc3, улучшая его способность взаимодействовать с С-концевой областью Xmas-2. Дальнейшие исследования общего комплекса TREX-2-ORC и его взаимодействия с мРНК ча-

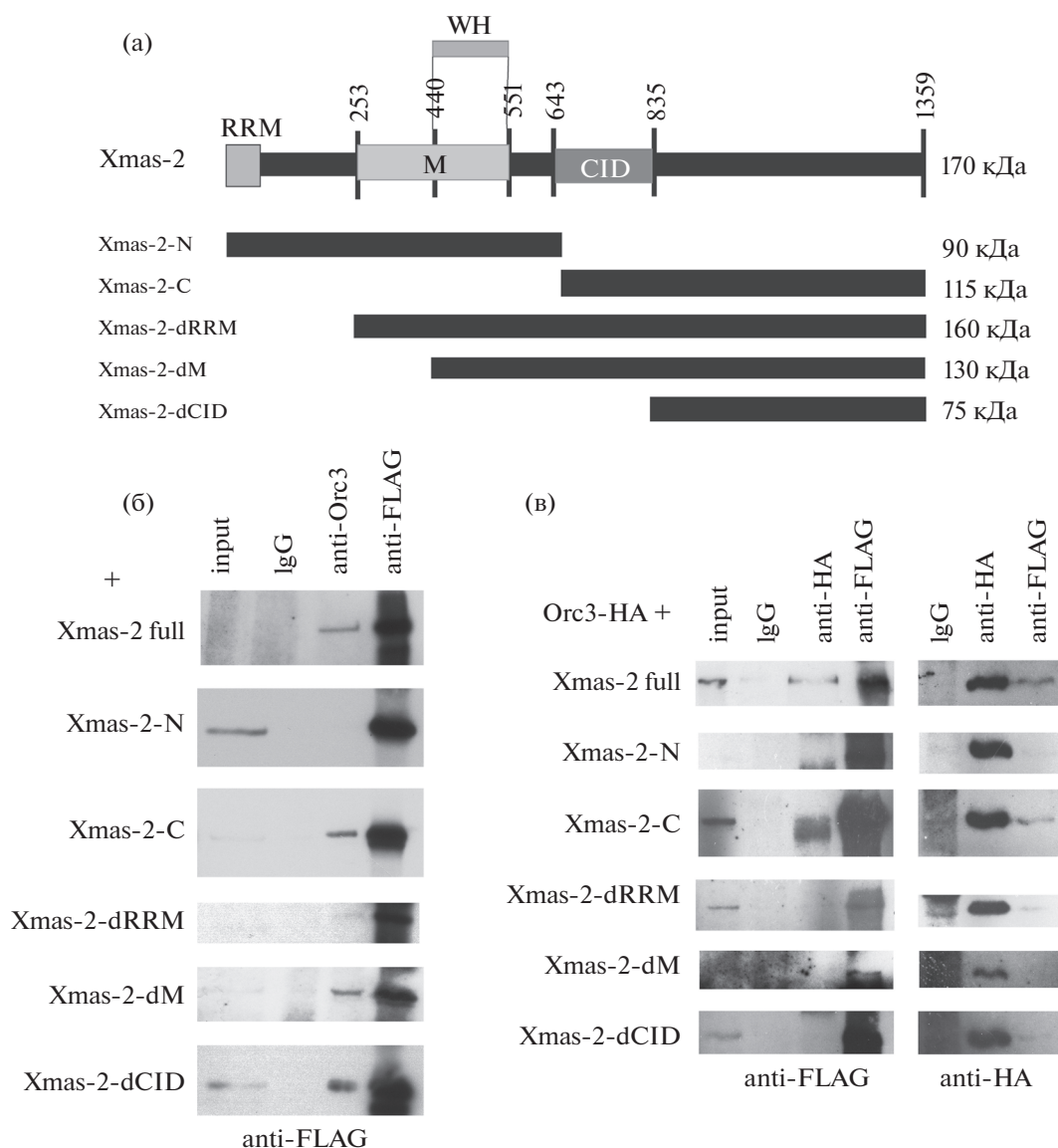


Рис. 1. Взаимодействие фрагментов Xmas-2 с Orc3. (а) Схема доменной организации белка Xmas-2 и последовательностей тестируемых Xmas-2-FLAG фрагментов, указаны названия фрагментов и молекулярные массы сверхэкспрессированных белков. (б) Вестерн-блот анализ взаимодействия фрагментов Xmas-2-FLAG и эндогенного Orc3 в реакциях иммуноосаждения из тотальных лизатов трансформированных S2 клеток с использованием антител к FLAG-эпиту. В качестве отрицательного контроля проводили реакцию с использованием IgG. Антителами к FLAG-эпиту были осаждены соответствующие рекомбинантные белки: Xmas-2 full – массой около 170 кДа, Xmas-2-N ~ 90 кДа, Xmas-2-C ~ 115 кДа, Xmas-2-dRRM ~ 160 кДа, Xmas-2-dM ~ 130 кДа, Xmas-2-dCID ~ 75 кДа. Поликлональными антителами к Orc3 был осажден Orc3 и соосаждены Xmas-2-FLAG фрагменты, содержащие С-концевой участок Xmas-2 с 3'-стороны от CID-домена. (в) Вестерн-блот анализ взаимодействия фрагментов Xmas-2-FLAG и Orc3-HA в реакциях иммуноосаждения с использованием антител к FLAG- и HA-эпитомам из тотальных лизатов котрансформированных S2 клеток. Детекция проводилась при помощи антител к FLAG- и HA-эпитомам. В качестве отрицательного контроля проводили реакцию с использованием IgG.

стицей внесут вклад в понимание механизмов экспорта мРНК.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была выполнена с использованием оборудования ЦКП ИБГ РАН.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-04-00861.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Куршакова М.М., Георгиева С.Г., Копытова Д.В. // Молекулярная биология. 2016. V. 50. №. 5. P. 723–729.
2. Fischer T., Strasser K., Racz A., et al. // The EMBO journal. 2002. V. 21. P. 5843–5852.
3. Fischer T., Rodriguez-Navarro S., Pereira G., et al. // Nature cell biology. 2004. V. 6. P. 840–848.
4. Rodriguez-Navarro S., Fischer T., Luo M., et al. // Cell. 2004. V. 116. P. 75–86.
5. Jani D., Lutz S., Marshall N.J., et al. // Molecular cell. 2009. V. 33. P. 727–737.
6. Lu Q., Tang X., Tian G., et al. // The Plant journal: for cell and molecular biology. 2010. V. 61. P. 259–270.
7. Jani D., Lutz S., Hurt E., et al. // Nucleic acids research. 2012. V. 40. P. 4562–4573.
8. Kurshakova M.M., Krasnov A.N., Kopytova D.V., et al. // The EMBO journal. 2007. V. 26. P. 4956–4965.
9. Kopytova D., Popova V., Kurshakova M., et al. // Nucleic acids research. 2016. V. 44. P. 4920–4933.
10. Popova V., Brechalov A. // Nonreplicative functions of the origin recognition complex 2018. V. 9. P. 460–473.
11. Popova V., Georgieva S., Kopytova D. // Biochemistry and molecular biology journal. 2016. V. 2. P. 2–14.
12. Ellisdon A.M., Dimitrova L., Hurt E. et al. // Nat Struct Mol Biol. 2012. V. 19. P. 328–336.
13. Jani D., Valkov E., Stewart M. // Nucleic acids research. 2014. V. 42. P. 6686–6697.

STUDY OF THE INTERACTION BETWEEN Xmas-2, THE MAIN PROTEIN OF TREX-2 mRNA EXPORT COMPLEX, AND THE Orc3 PROTEIN, A SUBUNIT OF ORC COMPLEX OF *D. melanogaster*

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

^a Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

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

The TREX-2 protein complex is a key participant in the export of mRNA from the nucleus to the cytoplasm through nuclear pores. Previously, in *D. melanogaster* a protein complex consisting of TREX-2 and ORC complexes was purified. It was shown that in the TREX-2-ORC complex Xmas-2 protein, which is the platform for TREX-2 assembly, interacts with the Orc3 protein. The aim of this work was to investigate which regions of the Xmas-2 amino acid sequence are involved in the interaction with Orc3. It was demonstrated that the interaction of Xmas-2 with Orc3 requires a C-terminal region of Xmas-2 located downstream of the CID domain.

Keywords: Xmas-2, Orc3, TREX-2, mRNA export