ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2023, том 513, с. 586–589

УДК 577.218

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МРНК С С-КОНЦЕВЫМ ДОМЕНОМ PCID2, СУБЪЕДИНИЦЕЙ КОМПЛЕКСА TREX-2, НЕОБХОДИМО ДЛЯ ЕЕ ЭКСПОРТА ИЗ ЯДРА В ЦИТОПЛАЗМУ У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© 2023 г. Ю. А. Вдовина[1,*], академик РАН С. Г. Георгиева[1], Д. В. Копытова[1,**]

Поступило 24.07.2023 г.
После доработки 08.09.2023 г.
Принято к публикации 08.09.2023 г.

После этапа транскрипции новосинтезированная мРНК экспортируется из ядра в цитоплазму и далее к месту трансляции. Комплекс TREX-2 принимает участие на этапе экспорта мРНК из ядра в цитоплазму. Этот комплекс у *Drosophila melanogaster* состоит из четырех белков: Xmas-2, PCID2, ENY2, Sem1p. В нашей работе мы показали, что делеция С-концевой последовательности PCID2 приводит к уменьшению взаимодействия белка с РНК и к нарушению экспорта мРНК из ядра в цитоплазму у *D. melanogaster*.

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

DOI: 10.31857/S268673892360053X, **EDN:** GPVOWL

Процесс экспрессии генов состоит из множества этапов, на каждом из которых действуют определенные комплексы белков, регулирующие этот процесс. Комплекс TREX-2, участвующий в экспорте мРНК из ядра, у *D. melanogaster* состоит из четырех белков: Xmas-2, PCID2, ENY2, Sem1p [1–3]. Некоторые из субъединиц комплекса участвуют и в других этапах экспрессии генов. Известно, что одна из субъединиц комплекса, белок ENY2 также входит в состав комплекса SAGA и взаимодействует с комплексом THO, таким образом, участвуя и в этапе инициации, и в этапе элонгации транскрипции [4–6]. dENY2 также участвует в барьерной активности различных инсуляторов [7, 8]. Белок же PCID2 не только участвует в экспорте мРНК в ядре, но и участвует в транспорте мРНК в цитоплазме [9, 10]. В составе комплекса PCID2 взаимодействует с мРНК в реакциях иммунопреципитации РНК и, возможно, определяет специфичность взаимодействия TREX-2 с мРНК [10]. Несмотря на исследование функций комплекса TREX-2 в течение продолжительного времени, остается не ясным, как комплекс взаимодействует с мРНК [11–17]. При исследованиях на дрожжах было обнаружено, что гомологи Xmas-2 и PCID2 вместе связывают РНК, образуя общую поверхность связывания [18]. У гомолога PCID2 дрожжей за связывание с РНК отвечает домен, располагающийся на С конце белка. Были определены аминокислоты,

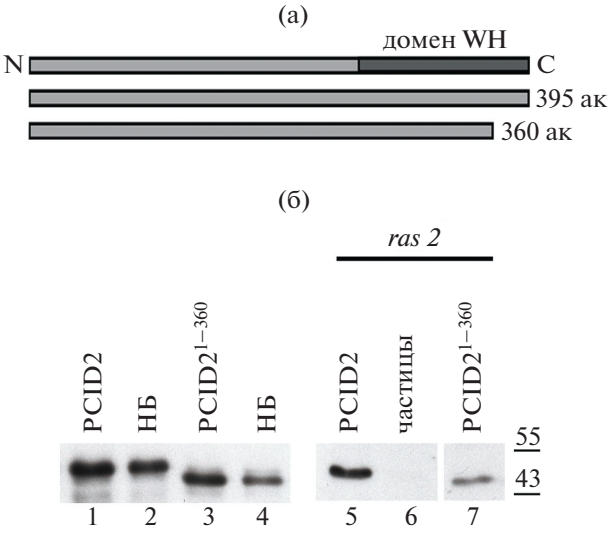

Рис. 1. С-концевой домен PCID2 взаимодействует с мРНК *ras2* в экспериментах Pull-down. (а) – доменная структура белка PCID2. На рисунке отмечены взятые в эксперимент полноразмерный белок и PCID2$^{1-360}$, у которого на С-конце удалены 35 аминокислот. (б) – фореграмма Вестерн-блот-анализа связывания белков с биотинилированной мРНК *ras2*. Мембрана была гибридизована с антителами к PCID2 [1]. Дорожки 1, 3 – экспрессированные белки, взятые на связывание; 2, 4 – НБ – фракции белков, не связавшихся с мРНК *ras2*; 5, 7 – фракции, содержащие связавшиеся с мРНК *ras2* белки; 6 – фракция связывания мРНК *ras2* со стрептавидин-агарозой.

[1]*Федеральное Государственное Учреждение науки Институт молекулярной биологии Российской академии наук, Москва, Российская Федерация*
**e-mail: yuvdov2020@gmail.com*
***e-mail: d_dmitrieva@mail.ru*

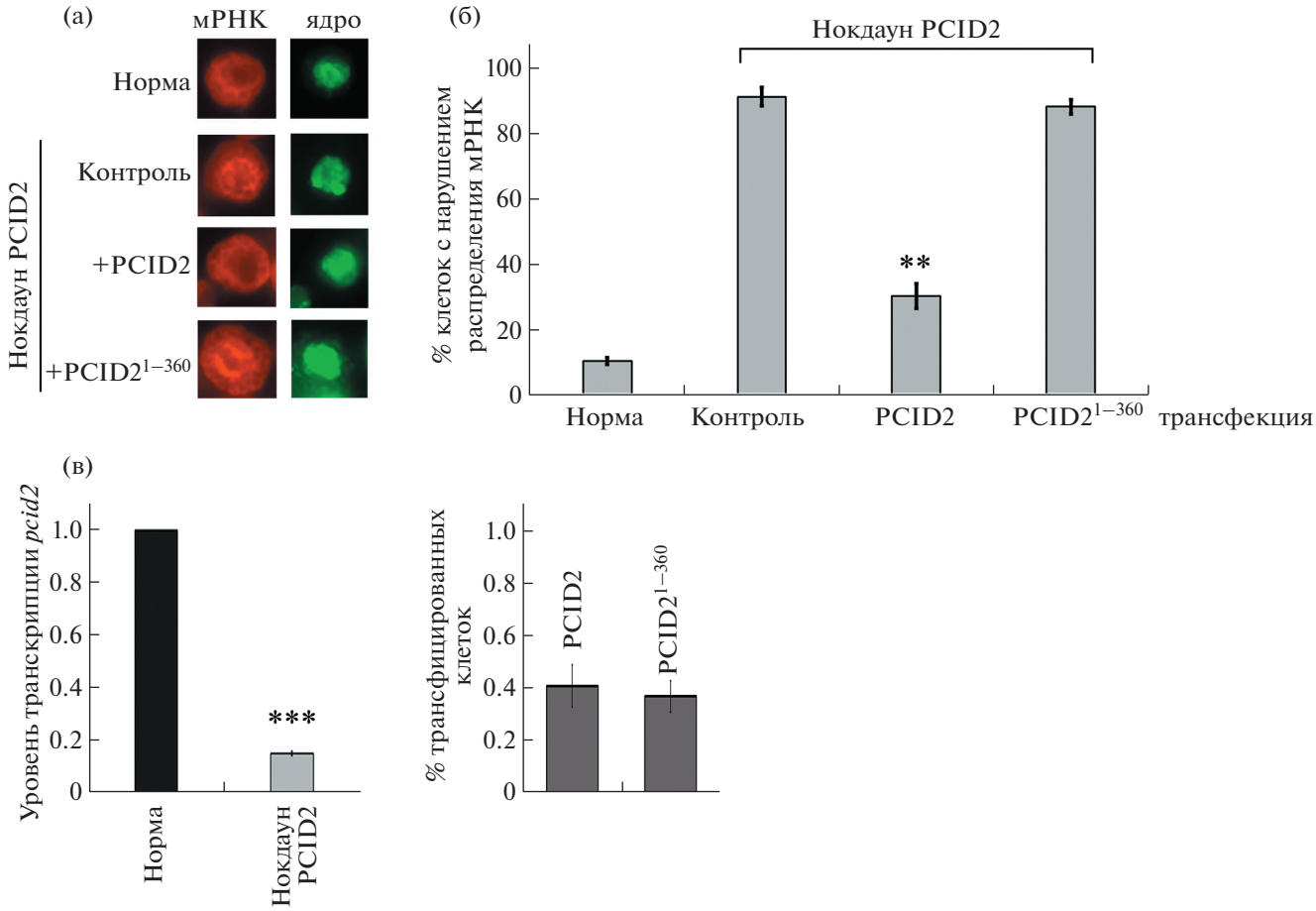

Рис. 2. С-концевой домен PCID2 необходим для экспорта мРНК. (а) РНК FISH был выполнен с использованием Cy3-меченного oligo-dT-праймера для визуализации полиА РНК, ядра были окрашены DAPI. Клетки были обработаны двуцепочечной РНК, соответствующей PCID2. Клетки с нокдауном PCID2 были использованы в эксперименте в качестве положительного контроля. Распределение мРНК (зеленый сигнал), клеточное ядро (красный сигнал) показаны для необработанных клеток (норма), при нокдауне PCID2 (контроль), при нокдауне и трансфекции клеток с нокдауном PCID2 полноразмерным PCID2 (+PCID2), при нокдауне PCID2 и трансфекции PCID2$^{1-360}$ (+PCID2$^{1-360}$) (1000× увеличение). (б) Количественное представление результатов эксперимента на рис. 2а. Столбики показывают процент клеток с нарушенным экспортом мРНК (около 200 клеток было исследовано). (в) – Гистограммы уровня интерференции мРНК *pcid2* и уровня трансфекции интерферированных S2 клеток PCID2 и PCID2$^{1-360}$.

участвующие во взаимодействии [18]. В нашей работе мы исследовали, принимает ли участие в связывании с РНК данный домен у PCID2 *D. melanogaster* и необходим ли этот домен для выполнения основных функций PCID2. Исследование взаимодействия PCID2 с мРНК у *D. melanogaster* проводили, используя метод Pull-down с биотинилированной РНК.

В качестве модельной РНК, с которой было исследовано связывание, была использована мРНК гена *ras2,* меченная биотином. Так как взаимодействие PCID2 в составе комплекса с данной мРНК было показано ранее в реакциях иммунопреципитации РНК [10]. В эксперименте были использованы экспрессированные в бактериальной системе белки: полноразмерный PCID2 и PCID2$^{1-360}$ (PCID2, у которого были удалены 35 аминокислот на С-конце белка). Схема белков представлена на рис. 1а.

Белки связывали с биотинилированой мРНК *ras2*, затем инкубировали со стрептавидин-агарозой и отмывали от несвязавшегося белка раствором, содержащим высокую соль. Связавшийся с мРНК белок был визуализирован при разделении в ПААГ и Вестерн блот гибридизацией с антителами к PCID2 (рис. 1б). Оказалось, что форма PCID2$^{1-360}$ связывается с мРНК *ras2* гораздо менее эффективно, чем полноразмерный PCID2. Таким образом, у PCID2 *D. melanogaster* на С-конце белка располагается домен связывания РНК, в тех 35 аминокислотах, которые были удалены. Однако, поскольку связывание белка с РНК *ras2* не ис-

чезало совсем, можно предположить, что у PCID2 есть и другой домен связывания РНК.

Влияние данной делеции на основную функцию PCID2 – экспорт мРНК из ядра в цитоплазму было изучено на S2 клетках *D. melanogaster*. В клетках были проведены нокдаун PCID2 с помощью метода интерференции РНК и трансфекция клеток конструкцией pAC-PCID2$^{1-360}$ с HA эпитопом. В качестве контрольных клеток были использованы клетки с нокдауном PCID2 и трансфекцией конструкцией pAC-PCID2 с HA эпитопом (рис. 2а, б).

Анализ уровня нокдауна белка проводился с помощью Вестерн блот гибридизации, процент трансфицированных клеток определялся по количеству клеток при иммуноокрашивании их антителами к HA эпитопу, представлены в виде гистограмм (рис. 2в). В нормальных, необработанных клетках мРНК распределяется неравномерно, преимущественно в цитоплазме. Нокадаун PCID2 приводил к задержке в ядре и перераспределению мРНК в 91% случаев. Трансфекция полноразмерным белком на фоне нокдауна приводила к уменьшению количества аберрантных клеток до 27%. В то же время трансфекция белком PCID2$^{1-360}$ не приводила к данному эффекту и количество клеток с задержкой и перераспределением мРНК не менялось (88%). Исходя из данного эксперимента можно предположить, что С-концевой домен необходим для выполнения функций PCID2 в ядре.

Таким образом, в нашей работе мы показали, что С-концевой домен PCID2 *D. melanogaster* отвечает за взаимодействие белка с РНК и необходим для эффективного экспорта мРНК из ядра в цитоплазму. Представленные данные также показали, что в отличие от гомолога PCID2 дрожжей, у PCID2 *D. melanogaster* существует(ют) еще домен(ы) связывания РНК.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была выполнена с использованием оборудования ЦКП ИМБ РАН.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kopytova D., Popova V., Kurshakova M., 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. V. 44. №10. P. 4920–4933.
2. *Kurshakova M.M., Krasnov A.N., Kopytova D.V., et al.* SAGA and a novel Drosophila export complex anchor efficient transcription and mRNA export to NPC // EMBO Journal. 2007. V. 26, № 24. P. 14956–65.
3. *Stewart M.* Structure and Function of the TREX-2 Complex. // Sub-cellular biochemistry. United States, 2019. V. 93. P. 461–470.
4. *Pascual-Garcia P., Govind C.K., Queralt E., al.* Sus1 is recruited to coding regions and functions during transcription elongation in association with SAGA and TREX2. // Genes & development. United States, 2008. V. 22. № 20. P. 2811–2822.
5. *Georgieva S., Nabirochkina E., Dilworth F.J., et al.* The novel transcription factor e(y)2 interacts with TAF(II)40 and potentiates transcription activation on chromatin templates. // Molecular and cellular biology. United States, 2001. V. 21. № 15. P. 5223–5231.
6. *Kopytova D.V., Orlova A.V., Krasnov A.N., et al.* Multifunctional factor ENY2 is associated with the THO complex and promotes its recruitment onto nascent mRNA. // Genes & development. United States, 2010. V. 24. № 1. P. 86–96.
7. *Kurshakova M., Maksimenko O., Golovnin A., et al.* Evolutionarily conserved E(y)2/Sus1 protein is essential for the barrier activity of Su(Hw)-dependent insulators in Drosophila. // Molecular cell. United States, 2007. V. 27. № 2. P. 332–338.
8. *Maksimenko O., Kyrchanova O., Bonchuk A., et al.* Highly conserved ENY2/Sus1 protein binds to Drosophila CTCF and is required for barrier activity. // Epigenetics. 2014. V. 9. № 9. P. 1261–1270.
9. *Farny N.G., Hurt J.A., Silver P.A.* Definition of global and transcript-specific mRNA export pathways in metazoans. // Genes & development. United States, 2008. V. 22. № 1. P. 66–78.
10. *Glukhova A.A., Kurshakova M.M., Nabirochkina E.N. 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. V. 18, № 11. P. 1969–1980.
11. *Jani D., Lutz S., Hurt E., 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. V. 40. № 10. P. 4562–4573.
12. *Jani D., Lutz S, Marshall N.J., 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. V. 33. № 6. P. 727–737.
13. *Jani D., Valkov E., Stewart M.* Structural basis for binding the TREX2 complex to nuclear pores, GAL1 localisation and mRNA export. // Nucleic acids research. England, 2014. V. 42. № 10. P. 6686–6697.
14. *Fischer T., Strasser K., Racz A., 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. V. 21. № 21. P. 5843–5852.
15. *Gonzalez-Aguilera C., Tous C., Gomez-Gonzalez B., et al.* The THP1-SAC3-SUS1-CDC31 complex works in

transcription elongation-mRNA export preventing RNA-mediated genome instability. // Molecular biology of the cell. United States, 2008. V. 19. № 10. P. 4310–4318.

16. *Lu Q., Tang X., Tian G., 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. V. 61. № 2. P. 259–270.

17. *Rodríguez-Navarro S., Fischer T., Luo M.-J., et al.* Sus1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore-associated mRNA export machinery. // Cell. United States, 2004. V. 116. № 1. P. 75–86.

18. *Ellisdon A.M., Dimitrova L., Hurt E., 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. V. 19. № 3. P. 328–336.

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*

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

[a] *Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

[#] *e-mail: yuvdov2020@gmail.com*

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

Following the transcription step, the newly synthesized mRNA is exported from the nucleus to the cytoplasm and further to the translation site. The TREX-2 complex is involved in the step of mRNA export from the nucleus to the cytoplasm. This complex in *Drosophila melanogaster* consists of four proteins: Xmas-2, PCID2, ENY2, Sem1p. In our work, we have shown that deletion of the C-terminal sequence of PCID2 leads to a decrease in the interaction of the protein with RNA and to impaired mRNA export from the nucleus to the cytoplasm in *D. melanogaster*.

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