

УЧАСТИЕ БЕЛКОВ КОМПЛЕКСА CPSF В ПОЛИАДЕНИЛИРОВАНИИ ТРАНСКРИПТОВ, СЧИТЫВАЕМЫХ РНК-ПОЛИМЕРАЗой III С SINE

© 2024 г. И. Г. Устьянцев^{а, *}, О. Р. Бородулина^а, Д. А. Крамеров^{а, **}^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: ustian@mail.ru

**e-mail: kramеров@eimb.ru

Поступила в редакцию 19.10.2023 г.

После доработки 16.11.2023 г.

Принята к публикации 22.11.2023 г.

SINE — мобильные генетические элементы многоклеточных эукариот, возникавшие в ходе эволюции из различных тРНК, а также из 5S рРНК и 7SL РНК. Подобно генам этих РНК, SINE транскрибируются РНК-полимеразой III. Транскрипты некоторых SINE млекопитающих обладают уникальной для транскриптов РНК-полимеразы III способностью подвергаться AAUAAA-зависимому полиаденилированию. Несмотря на определенное сходство с каноническим полиаденилированием мРНК (транскриптов РНК-полимеразы II), эти процессы имеют, по-видимому, и существенные различия. В данной работе оценена важность белков комплекса CPSF, образованного субкомплексом mPSF и mCF и направляющего полиаденилирование мРНК, для полиаденилирования транскриптов SINE. В клетках HeLa при помощи siРНК проводили нокдаун компонентов CPSF, после чего клетки трансфицировали плазмидными конструкциями, содержащими SINE. Методом нозерн-гибридизации оценивали снижение эффективности полиаденилирования транскриптов SINE в результате нокдауна того или иного белка. Оказалось, что такие компоненты CPSF, как Wdr33 и CPSF30, вносят вклад в полиаденилирование транскриптов SINE, тогда как нокдаун CPSF100, CPSF73 и симплекина не снижает полиаденилирование этих транскриптов. Wdr33 и CPSF30, наряду с исследованными нами ранее CPSF160 и Fip1, входят в состав субкомплекса mPSF, ответственного за полиаденилирование мРНК. Таким образом, имеющиеся данные свидетельствуют о важности всех белков mPSF для полиаденилирования транскриптов SINE. В то же время CPSF100, CPSF73 и симплекин, образующие субкомплекс mCF, ответственны за разрезание пре-мРНК, поэтому их неучастие в полиаденилировании транскриптов SINE представляется вполне естественным.

Ключевые слова: SINE, ретротранспозоны, некодирующие РНК, РНК-полимераза III, полиаденилирование, факторы полиаденилирования, нокдаун, млекопитающие

DOI: 10.31857/S0026898424030083, EDN: JCNEYR

ВВЕДЕНИЕ

Полиаденилирование — это процесс нематричного синтеза поли(А) на 3'-конце РНК. Существует несколько типов поли- или олигоаденилирования РНК. Наиболее важным в жизнедеятельности клетки и, как следствие, наиболее хорошо изученным

является каноническое полиаденилирование, которому подвергаются пре-мРНК и большинство других транскриптов, генерируемых РНК-полимеразой II (см. обзоры [1–4]). Оно также называется AAUAAA-зависимым, поскольку для него критически важен главный сигнал полиаденилирования (PAS), гексануклеотид AAUAAA (или, реже, один из его минорных вариантов) в 3'-нетранслируемой области пре-мРНК. Такое полиаденилирование осуществляется в ядре непосредственно после разрезания пре-мРНК в сайте, расположенном на 20–30 нуклеотидов ниже PAS. Вместе эти два события называются 3'-процессингом. Разрезание РНК приводит к замедлению транскрипции гена РНК-полимеразой II, а затем и к ее полной остановке [2]. Важную роль в описываемых событиях играет и сама РНК-полимераза II, так как с ее большой субъединицей связаны белковые факторы, осуществляющие 3'-процессинг. Основным белком, направляющим оба процесса, является

Сокращения: CPSF (Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor) — фактор специфичности разрезания и полиаденилирования; mCF (mammalian Cleavage Factor) — фактор разрезания у млекопитающих; mPSF (mammalian Polyadenylation Specificity Factor) — фактор специфичности полиаденилирования у млекопитающих; CFIm (Cleavage Factor I mammalian) — фактор разрезания I у млекопитающих; CPE (Cytoplasmic Polyadenylation Element) — элемент цитоплазматического полиаденилирования; DSE (Downstream Sequence Element) — нижерасположенный элемент; USE — вышерасположенный элемент; PAS (Polyadenylation Signal) — сигнал полиаденилирования; SINE (Short Interspersed Elements) — короткие, рассеянные по геному элементы; siРНК — малая интерферирующая РНК.

мультисубъединичный комплекс CPSF [5]. В последнее время стало ясно, что этот комплекс подразделяется на два субкомплекса [6]. Первый, mCF, отвечает за разрезание пре-мРНК и состоит из трех субъединиц: симплекина (symplekin), CPSF73 и CPSF100. Второй, mPSF, способствует полиаденилированию и объединяет субъединицы CPSF160, CPSF30, Wdr33 и Fip1 [7]. Помимо CPSF, полиаденилирование и разрезание помогают осуществлять и другие факторы, все вместе объединяемые в комплекс 3'-процессинга. Это CStF, взаимодействующий с последовательностями, лежащими ниже сайта разрезания (DSE), наибольшая субъединица РНК-полимеразы II, а также CFIm и CFIIIm [5]. CFIm связывается с определенными последовательностями (USE), лежащими выше сайта разрезания и PAS, и наряду с mPSF способствует полиаденилированию [8]. Нужно отметить, что USE играют роль вспомогательного элемента и имеются только у половины мРНК человека [9]. Вместе CFIm и mPSF обеспечивают работу ключевого компонента комплекса 3'-процессинга, поли(А)-полимеразы, позволяя ей осуществлять процессивный синтез поли(А)-хвоста на 3'-конце свежеразрезанной пре-мРНК [2].

Значение канонического полиаденилирования заключается в увеличении времени жизни мРНК в клетке; кроме того, поли(А)-хвост способствует экспорту мРНК из ядра, а также циклизации мРНК при трансляции, обеспечивая ее реинициацию [5, 10]. Длина поли(А)-хвоста служит регуляторным механизмом, причем, как это ни странно, более длинные (свыше 100 остатков) хвосты представлены у более редких и короткоживущих мРНК [11]. Помимо канонического, существуют и другие виды полиаденилирования. Ближе всего к каноническому стоит, вероятно, полиаденилирование с участием особой поли(А)-полимеразы STAR-PAP вместо обычных. Этот тип полиаденилирования примечателен иным нуклеотидным составом USE и DSE, а также отсутствием участия в нем комплекса CFIm. Его проходят мРНК, транскрибируемые с генов, связанных с ответом на окислительный стресс и апоптозом [12, 13]. Цитоплазматическое полиаденилирование — еще один тип неканонического полиаденилирования. мРНК, претерпевающие его, сначала деаденилируются, а затем запасаются в таком виде в цитоплазме. Для повторного полиаденилирования, т.е. для подготовки этих мРНК к трансляции, привлекается белок CREB, связывающий последовательность CRE. Поли(А)-полимераза в данном случае также особая, неканоническая — RAPD4. Тем не менее для цитоплазматического полиаденилирования требуется комплекс CPSF и, возможно, CFIm [14, 15].

В описанных процессах так или иначе участвуют транскрипты РНК-полимеразы II, прежде всего мРНК (однако многие длинные некодирующие РНК, синтезируемые этой полимеразой, также

полиаденилируются). В большинстве своем перечисленные типы полиаденилирования направлены на продление времени жизни транскрипта в клетке. Для транскриптов других РНК-полимераз известны другие типы полиаденилирования (обычно олигоаденилирования), приводящие, напротив, к деградации транскриптов [1, 16]. В нашей лаборатории описан еще один неканонический тип полиаденилирования, которому подвергаются РНК, синтезируемые не РНК-полимеразой II, а РНК-полимеразой III. Речь идет о транскриптах некоторых SINE млекопитающих [17].

SINE — это небольшие (сотни нуклеотидов) мобильные генетические элементы, не кодирующие собственные белки [18]. SINE называют также короткими ретропозонами, так как их жизненный цикл включает стадию РНК. РНК SINE подвергается обратной транскрипции, которая осуществляется ферментом, закодированным в одном из мобильных генетических элементов класса LINE. Синтезированная таким образом ДНК оказывается встроенной в новый сайт генома. Транскрипты всех разновидностей SINE синтезируются РНК-полимеразой III, поскольку SINE происходят от коротких клеточных РНК, также транскрибируемых полимеразой III, — тРНК, 5S рРНК или 7SL РНК. Сходство с этими РНК прослеживается в 5'-концевой части SINE, называемой головой. Эта часть несет внутренний промотор РНК-полимеразы III, соответствующий типу клеточной РНК, который дал начало данному семейству SINE. Происходящий от тРНК или от 7SL РНК промотор состоит из двух боксов (А и В), разделенных последовательностью длиной 30–40 п.н. За головой SINE следует его тело — последовательность, специфичная для каждого семейства SINE, а затем А-богатый хвост. Большое количество остатков А в хвосте SINE необходимо для взаимодействия РНК с обратной транскриптазой LINE-партнера, L1, и тем самым для успешной ретропозиции.

SINE присущи большинству высших эукариот и часто составляют заметную долю их геномов — они содержат сотни тысяч копий этих мобильных элементов. Большое разнообразие SINE наблюдается у млекопитающих — распространение одного семейства SINE во многих случаях ограничивается одним отрядом млекопитающих [19, 20]. Наиболее известен и хорошо изучен SINE Alu, происходящий от 7SL рРНК, характерный для приматов, включая человека [21]. Однако большинство SINE млекопитающих происходят от тРНК. Среди таких SINE есть особая группа, примечательная строением хвостовой части. В этой части SINE содержится один или несколько гексануклеотидов AATAAA (т.е. PAS), а также терминатор транскрипции РНК-полимеразы III — последовательность, содержащая более трех остатков Т подряд. Эти особенности позволяют выделить подобные SINE в особый

класс T^+ (семейства таких SINE возникли независимо друг от друга, как и большинство SINE в целом). Другие SINE причисляются к классу T^- ; терминация транскрипции последних происходит на случайных олиго(T) в 3'-фланкирующих последовательностях [22]. Уникальной особенностью T^+ SINE, описанной в нашей лаборатории, является их способность полиаденилироваться AAUAAA-зависимым путем подобно пре-мРНК. В ранних опытах нами показано, что инактивация PAS путем замены T на C (AACAAA) приводит к прекращению полиаденилирования транскриптов SINE. На нозерн-блоте это проявлялось в исчезновении гетерогенной по длине фракции, расположенной выше полосы, соответствующей неполиаденилированному транскрипту SINE [17]. Полиаденилирование транскриптов SINE существенно удлиняет время жизни этих РНК в клетках [17, 23, 24]. Кроме того, наличие длинного поли(A)-хвоста у транскриптов SINE играет, видимо, решающую роль в их обратной транскрипции ферментом, кодируемым LINE-1 [21, 25–27].

Мы установили, что гексануклеотид AAUAAA необходим, но не достаточен для полиаденилирования транскриптов SINE. Кроме него требуются две вспомогательные последовательности (аналоги USE): район β , лежащий ниже бокса В промотора, и район τ , предшествующий А-богату хвосту. Инактивация одной из этих последовательностей в различных T^+ SINE посредством протяженных замен или делеций ослабляла полиаденилирование транскриптов, а обеих сразу — почти полностью прекращала его; удаление других участков SINE практически не влияло на эффективность полиаденилирования [24, 28]. Для более тщательного исследования мы выбрали два T^+ SINE — B2 из генома мыши и Ves из генома летучей мыши — с несхожими районами β и τ , и в результате идентифицировали β - и τ -сигналы, т.е. участки β - и τ -районов, непосредственно обеспечивающие полиаденилирование транскриптов этих SINE [29]. Кроме того, в отдельных опытах также использовали T^+ SINE Ege из генома лошади [28]. В B2 β -сигнал представлен последовательностью ACCACATgg, в Ves — caaGGGCATGTa, а τ -сигнал в B2 — GCTACagTGTACTTACAT (заглавными жирными буквами выделены наиболее важные для функции сигналы нуклеотиды, строчными буквами — наименее важные). У Ves τ -сигнал представлен полипиримидиновой последовательностью длиной около 50 п.н; в нескольких других семействах T^+ SINE район τ также образован длинным полипиримидиновым мотивом [28]. Предлагается, что с β - и τ -сигналами в транскриптах SINE связываются гипотетические белки X и Y, способствуя рекрутированию полиаденилирующего комплекса [28]. При помощи нокдауна мы выяснили, что τ -сигнал в транскрипте B2 способствует полиаденилированию благодаря взаимодействию

с белком CFIm25 [29]. Сайтом связывания CFIm25 в пре-мРНК является последовательность UGUAN ($N = A > U > G, C$) [8], присутствующая и в составе τ -сигнала B2. Другими словами, в случае B2 функцию белка Y выполняет CFIm-25, видимо, находящийся в комплексе с другой субъединицей, CFIm68. Используя нокдаун, мы также показали, что поли(A)-полимераза PAP (α или γ), как и компоненты комплекса CPSF — белки Fip1 и CPSF160, критически важны для полиаденилирования транскриптов Ves и B2 [29]. В представленной работе мы исследовали влияние нокдауна остальных компонентов комплекса CPSF, в том числе субкомплекса mCF, отвечающего за разрезание молекул пре-мРНК, на полиаденилирование транскриптов SINE. Кроме того, мы попытались выяснить, не участвуют ли в полиаденилировании, подобно CFIm25, несколько белков, потенциально способных взаимодействовать с β - или τ -сигналами определенного типа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Плазмидные конструкции. Все использованные в работе конструкции клонированы в плазмиде pGEM-T и описаны нами ранее. В качестве обозначений конструкций с SINE класса T^+ (Ves, B2 и Ege) дикого типа [17, 28] использованы названия SINE с буквой T на конце, например Ves-T. Кроме того, тестировали конструкции SINE Ves и B2 с удаленными из них районами β и τ (Ves- $\Delta\beta$, Ves- $\Delta\tau$, B2- $\Delta\beta$ и B2- $\Delta\tau$). Они описаны в [29] (третья) и [28] (остальные) соответственно, как Ves- $\Delta 7^{intb}$, Ves- $\Delta 52$, B2- $\Delta 12$ и B2-30_45. В качестве B2, лишённого района β , использовали химерный SINE Sor/B2, также описанный в [28] и представляющий собой SINE Sor (класс T^-) из генома землеройки с присоединенной к нему 3'-концевой частью B2, содержащей район τ , PAS и терминатор транскрипции. Нуклеотидные последовательности всех конструкций на основе B2, Ves и Sor представлены на рис. S1 в Дополнительных материалах, см. на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2024/3/supp_Ustyantsev_rus.pdf. Плазмидные ДНК для трансфекции клеток выделяли с помощью набора Plasmid Midi Kit ("Qiagen", Германия).

Культивирование клеток, нокдаун, трансфекция, выделение РНК и белков. Клетки HeLa растили на чашках Петри ($d = 60$ мм) в 5 мл среды DMEM с 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS) до плотности покрытия 50–60%. К 5.8 мкл раствора siРНК против исследуемого белка (приобретены у "Santa Cruz Biotechnology", США; табл. S1 Дополнительных материалов) либо к контрольной siРНК (не подавляющей экспрессию клеточных белков, далее обозначены как Контроль, К) с концентрацией 10 мкМ добавляли 300 мкл среды OptiMem. К 17.5 мкл реагента Lipofectamine RNAiMax ("Thermo Fisher Scientific", США) также

добавляли 300 мкл среды OptiMem, после чего два полученных раствора объединяли и инкубировали в течение 5 мин. Полученную смесь добавляли в чашки с клетками. Кроме того, к части чашек не добавляли никаких реактивов (далее — “без siРНК”; необходимо подчеркнуть, что липофектамин в эти чашки также не добавляли). По мере достижения клетками покрытия, близкого к 100%, рассевали каждую чашку на две. Через 3 суток клетки с двух чашек с каждой siРНК лизировали для анализа белков с помощью Вестерн-блоттинга. (Эти процедуры подробно описаны ранее [29]; антитела ко всем изучаемым белкам приобретены у “Santa Cruz Biotechnology”, см. табл. S2 в Дополнительных материалах). Оставшиеся чашки в тот же день трансфицировали плазмидами с той или иной конструкцией SINE с помощью реактива TurboFect согласно протоколу производителя (“Thermo Fisher Scientific”). Для трансфекции клеток на одной чашке использовали 5 мкг плазмиды, несущей SINE, и 10 мкл TurboFect. Спустя сутки, используя гуанидинтиоцианатный метод [30], выделяли суммарную клеточную РНК, которую очищали от следов ДНК, обрабатывая ее ДНКазой I [28, 29].

Нозерн-блот-анализ. Клеточную РНК (10 мкг) подвергали электрофорезу в 6%-ном ПААГ с 7 М мочевиной и переносили на нейлоновую мембрану (“GVS”, Италия) с помощью полусухого электроблоттинга. Мечение гибридационных зондов для детекции транскриптов SINE осуществляли с помощью ПЦР в присутствии [α^{32} P]-dATP (“Фосфор”, Россия), как описано ранее [28]. Мембрану с иммобилизованной РНК инкубировали с зондом в гибридационном растворе при 42°C в течение ночи, после чего отмывали при 42°C в течение 1 ч согласно [17, 28]. Для получения изображения и количественной оценки радиоактивности гибридационных сигналов мембрану сканировали в фосфоимиджере (Image Analyzer Typhoon FLA 9000, “GE Healthcare Biosciences”, Швеция). Распределение радиоактивных сигналов рассчитывали при помощи программы OptiQuant 3.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе использовали ранее клонированные в плазмидах SINE Ves, B2 и Ege (из генома лошади) дикого типа, а также варианты Ves и B2 с инактивированными сигналами β и τ . В качестве B2 без района β использовали также гибридный SINE Sor/B2, представляющий собой T⁻ SINE Sor, к которому присоединена 3'-часть B2 с районом τ , PAS и терминатором. Клетки человека HeLa трансфицировали siРНК против одного из исследуемых белков, либо siРНК, не подавляющей экспрессию никаких белков (“Контроль”), либо оставляли нетрансфицированными (без siРНК на рисунках). Через 3 суток часть клеток лизировали для анализа белков, а остальные трансфицировали

упомянутыми плазмидами с различными вариантами SINE и еще через сутки выделяли клеточную РНК, которую разделяли в ПААГ и проводили нозерн-гибридизацию с радиоактивно меченным зондом, комплементарным последовательности того или иного SINE. Результаты вестерн-блоттингов и количественная оценка эффективности нокдауна белков представлены на рис. 1. Радиоавтографы, полученные в результате нозерн-гибридизации, приведены на рис. 2. На каждой из дорожек видна полоса, соответствующая первичному неполиаденилированному транскрипту SINE, а выше — гетерогенные по длине РНК, представляющие собой полиаденилированные транскрипты SINE. Отношение интенсивности измеряемого при помощи фосфоимиджера радиоактивного сигнала полиаденилированных транскриптов к суммарной интенсивности полиаденилированных и неполиаденилированных транскриптов отражает эффективность полиаденилирования. Если нокдаун какого-либо белка влияет на эту эффективность, то должно наблюдаться значимое снижение доли полиаденилированных транскриптов.

Диаграммы на рис. 3 показывают количественные оценки влияния нокдауна белков на полиаденилирование транскриптов SINE. Нокдаун CPSF30 и Wdr33 приводил приблизительно к двукратному по сравнению с контролем снижению эффективности полиаденилирования транскриптов конструкций на основе SINE B2 или Ves (рис. 3а). Таким образом, белки CPSF30 и Wdr33, как и два других (CPSF160 и Fip1) тестируемых нами ранее компонентов субкомплекса mPSF [29], необходимы для полиаденилирования транскриптов SINE, генерируемых РНК-полимеразой III. Отметим, что именно CPSF30 и Wdr33 непосредственно взаимодействуют с AAUAAA в молекулах мРНК [31, 32].

Менее вероятным представляется участие в полиаденилировании транскриптов SINE компонентов субкомплекса mCF. Несмотря на то, что его активность связана с разрезанием мРНК, а не с ее полиаденилированием, независимая от mCF работа mPSF в клетках пока не была описана [6]. Нами обнаружено, что нокдаун ни одного из компонентов mCF (CPSF100, CPSF73 и симплекина) не снижает значимо уровень полиаденилирования транскриптов исследованных вариантов SINE (рис. 2 и 3б). Таким образом, показано, что субкомплекс mCF не участвует в полиаденилировании транскриптов SINE, синтезируемых РНК-полимеразой III. Один из результатов описанного опыта был неожиданным и даже “аномальным”: при нокдауне CPSF73 наблюдалось существенное и статистически значимое повышение уровня полиаденилирования транскриптов SINE B2, лишенных района τ (рис. 3б, конструкция B2- $\Delta\tau$). Видимо, здесь имеет место какой-то непрямой эффект нокдауна

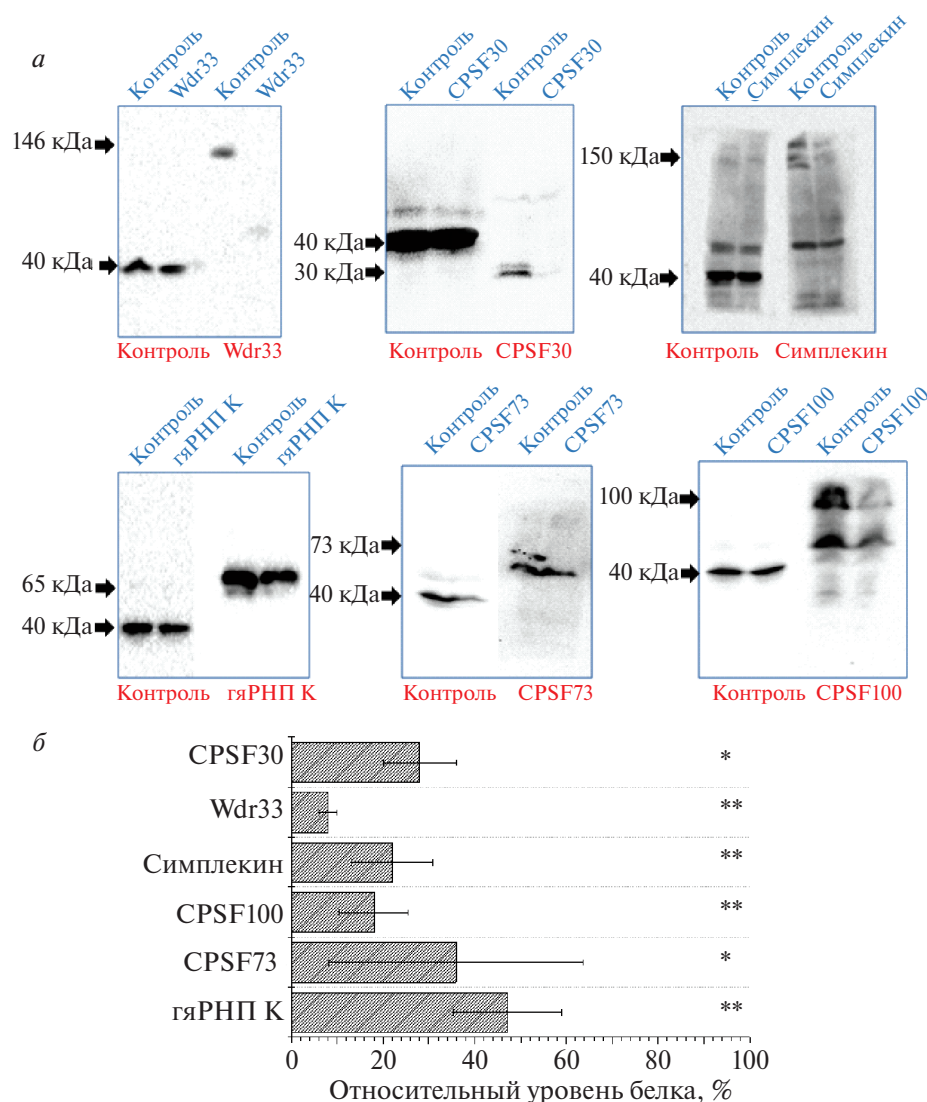


Рис. 1. Снижение уровня экспрессии белков в результате их нокдауна. *а* – Детекция белков с помощью вестерн-блоттинга. Над дорожками указаны siРНК, которыми обрабатывали клетки HeLa. Снизу приведены названия детектируемых белков: слева – контрольный белок гЯРНП Е2 с массой 40 кДа, справа – белок, подвергаемый нокдауну. *б* – Снижение уровня белка в клетках, обработанных специфическими siРНК относительно его уровня в клетках, обработанных контрольной siРНК (сделана поправка на экспрессию контрольного белка, гЯРНП Е2, в обоих образцах). Проведено не менее трех опытов с нокдауном каждого из белков, показано стандартное отклонение; * и ** – $p < 0.05$ и < 0.01 соответственно (t -критерий).

CPSF73. К сожалению, внутренне непротиворечивой гипотезы, объясняющей этот результат, нам найти не удалось.

Варианты 3'-процессинга, в которые mPSF вовлечен без участия mCF, ранее не были описаны; это указывает на уникальность изучаемого нами явления – полиаденилирования транскриптов РНК-полимеразы III. При этом известен обратный пример: mCF без участия mPSF осуществляет 3'-процессинг гистоновых пре-мРНК, которые, как известно, не полиаденилируются [33]. В таблице 1 рассмотрены некоторые процессы, в которых принимают участие те или иные факторы 3'-процессинга. Видно, что полиаденилирование транскриптов SINE,

возможно, более других напоминает канонический процесс, а его своеобразие заключается в том, что в него не вовлечен субкомплекс mCF.

В последней части работы мы попытались обнаружить гипотетические белки X и Y, которые могли бы, взаимодействуя с β - или τ -сигналами транскриптов SINE, стимулировать их полиаденилирование. Планировалось использовать подход, который позволил нам выявить участие CFIm25 в полиаденилировании транскриптов SINE B2: сначала мы обнаружили сайт узнавания этого белка (UGUA) в его τ -районе [28], а затем с помощью нокдауна CFIm25 показали снижение уровня полиаденилирования транскриптов B2 [29].

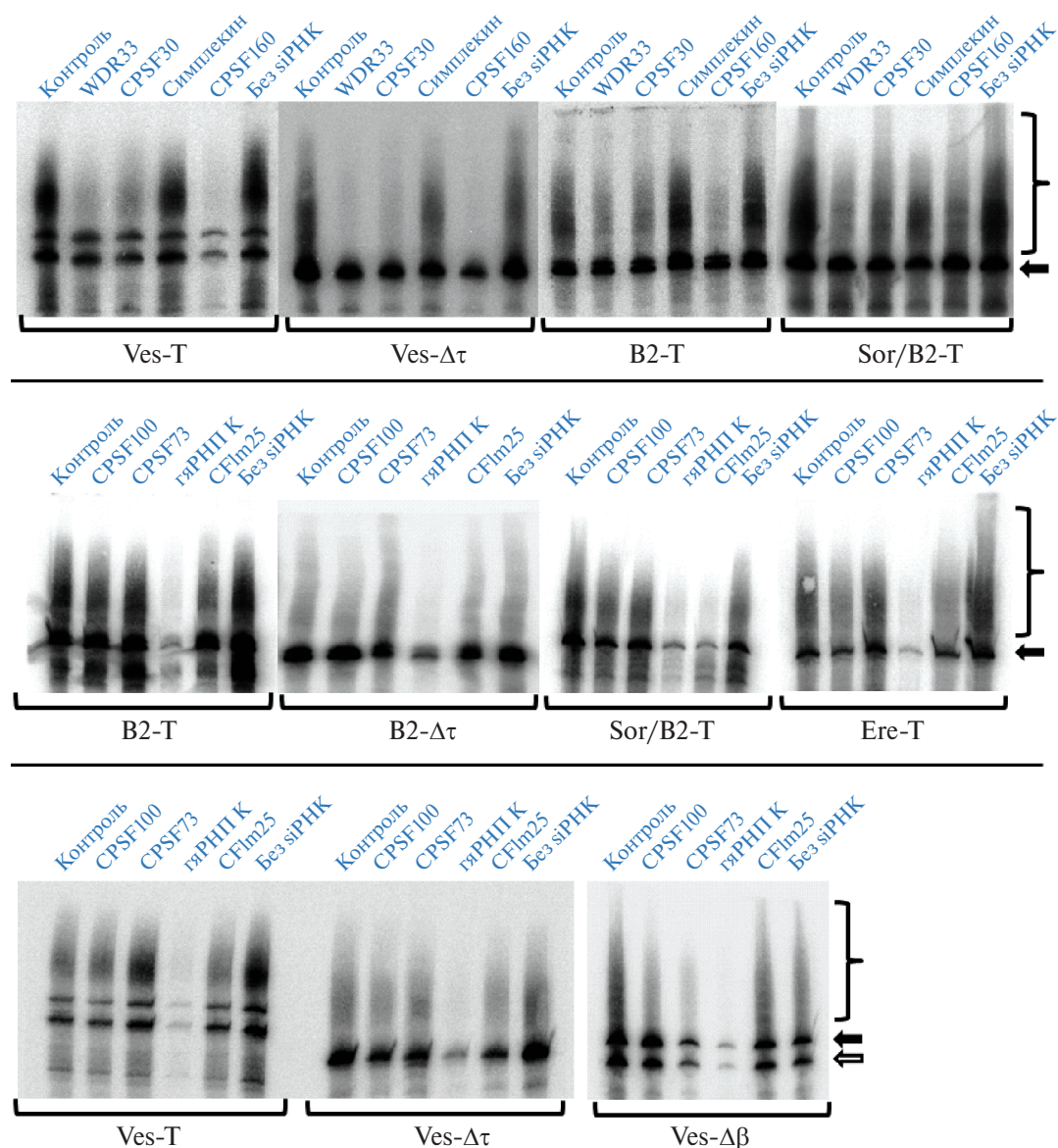


Рис. 2. Влияние нокдауна белков на полиаденилирование транскриптов SINE. Нозерн-блот-анализ РНК, выделенных из клеток HeLa, обработанных сначала siРНК (над дорожками указано, какими именно: контрольными (“Контроль”), против CPSF30, Wdr33, симплекина, CPSF100, CPSF73, гЯРНП К, CFIm25, CPSF160 или оставшихся необработанными (“Без siРНК”) в течение 72 ч, а затем трансфицированных различными конструкциями на основе SINE Ves, B2 или Ere (их названия указаны под сериями дорожек). Нокдаун CPSF160 или CFIm25 проведен в качестве положительного контроля на снижение полиаденилирования транскриптов. Черными стрелками помечены первичные транскрипты, а фигурными скобками – полиаденилированные транскрипты; белая стрелка указывает на характерный для Ves укороченный транскрипт, образующийся вследствие терминации транскрипции на неоптимальном терминаторе и не способный к полиаденилированию. Одна из дорожек на правом нижнем блоке – гЯРНП К (48) – соответствует опыту, в котором трансфекция плазмидами проведена спустя 48 ч после начала обработки клеток siРНК к гЯРНП К. Время обработки сокращено с целью уменьшения цитотоксического действия данных siРНК.

Мы воспользовались масштабным исследованием, в котором получены данные о сайтах узнавания большого числа РНК-связывающих белков [34]. Были отобраны несколько белков, чьи сайты узнавания (указаны в скобках) напоминали β - или τ -сигналы: гЯРНП L и гЯРНП К (AC-богатые последовательности, схожие с частью β -сигнала B2),

гЯРНП E1 и гЯРНП E2 (полипиримидиновые мотивы, достаточно сходные с τ -районом Ves) и RbFox1 (GCAUG, часть β -сигнала Ves). Отметим, что, в отличие от CFIm25, не описано участие ни одного из этих пяти белков в каких-либо видах полиаденилирования РНК. К сожалению, большинство опытов по обработке клеток специфичными siРНК

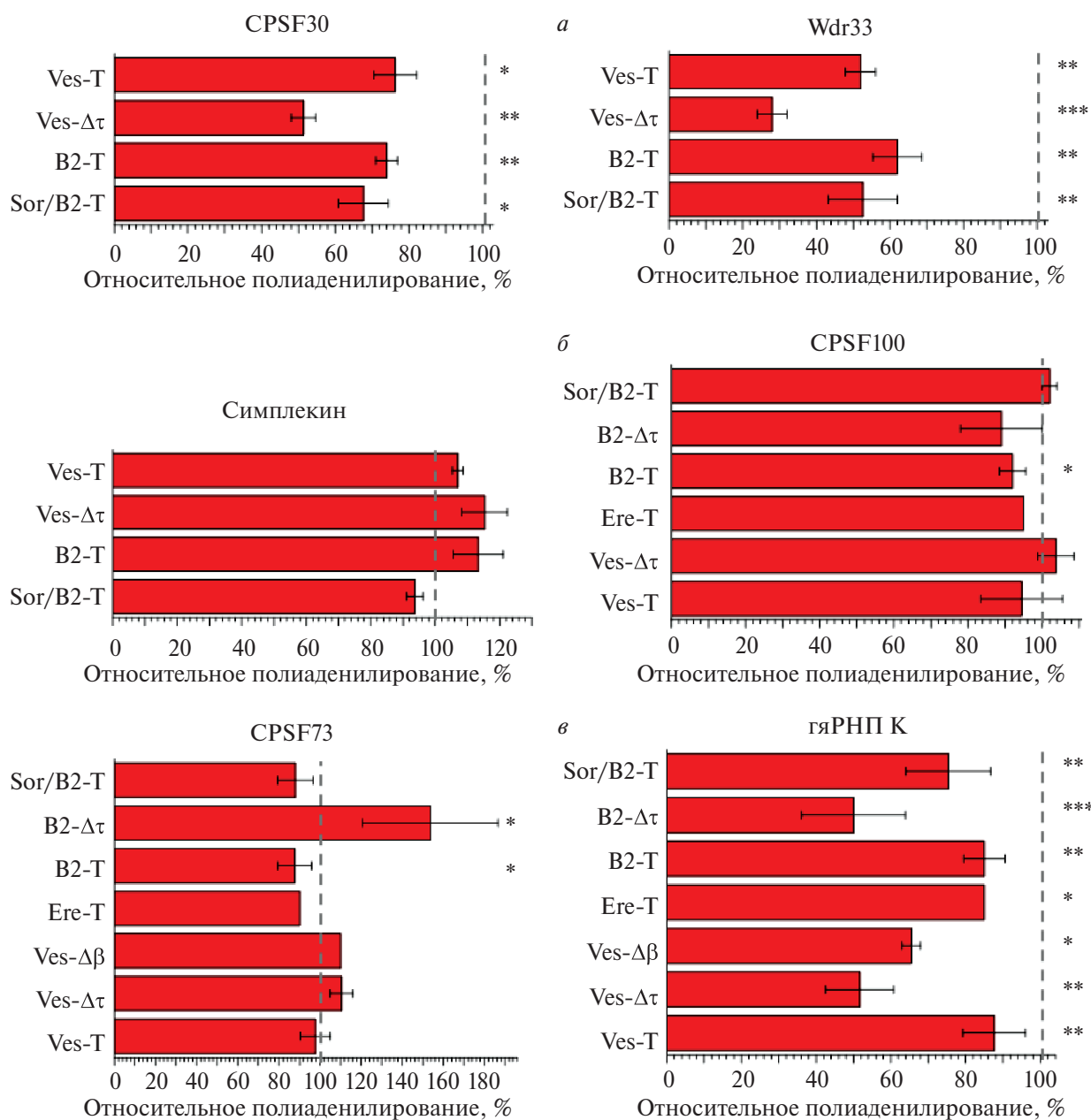


Рис. 3. Диаграммы, иллюстрирующие количественное влияние нокдауна различных белков на полиаденилирование транскриптов конструкций SINE B2, Ves и Ere, содержащих только τ -сигнал ($-\Delta\beta$), только β -сигнал ($-\Delta\tau$) или оба сигнала ($-T$, дикий тип). Показан средний уровень полиаденилирования транскриптов каждой конструкции (названия указаны слева от диаграммы) в клетках, трансфицированных специфическими siРНК, относительно уровня полиаденилирования в клетках, обработанных контрольной siРНК (этот уровень принят за 100% и отмечен вертикальной пунктирной линией). Стандартное отклонение получено по результатам трех опытов; *, ** и *** — $p < 0.05$, < 0.01 и < 0.001 соответственно (t -критерий). *а* — Компоненты субкомплекса mPSF: CPSF30 и Wdr33. *б* — Компоненты субкомплекса mCF: симплектин, CPSF100 и CPSF73. *в* — Белок гЯРНК К.

оказались неудачными — либо не был достигнут достаточно эффективный нокдаун белков, либо, напротив, нокдаун вызывал столь сильное подавление роста и деления клеток, что дальнейшая работа (трансфекция плазмидами) становилась практически невыполнимой. По схожим причинам мы не смогли протестировать большую субъединицу

субкомплекса CFIm, CFIm68, в нашем предыдущем исследовании [29].

Исключением оказался белок гЯРНК К — его нокдаун ухудшал рост клеток, хотя и существенно, но в допустимых пределах. Проведено несколько опытов, позволивших получить статистически значимые результаты (рис. 2 и рис. 3*в*). Наибольший

Таблица 1. Сравнение некоторых типов полиаденилирования и/или 3'-процессинга мРНК (пре-мРНК), включая канонические, с полиаденилированием транскриптов T⁺ SINE, синтезируемых РНК-полимеразой III

3'-Процессинг и/или полиаденилирование	РНК-полимераза, осуществляющая транскрипцию	Сопряженность с транскрипцией	Участие белковых факторов			
			РАР α и γ	CFIm	mPSF	mCF
Канонические полиаденилирование и 3'-процессинг пре-мРНК	II	Да	Да	Да	Да	Да
Полиаденилирование пре-мРНК с участием STAR-PAP	II	Да	Нет	Нет	Да	Да
3'-Процессинг пре-мРНК гистонов	II	Да	Нет	Нет	Нет	Да
Цитоплазматическое полиаденилирование мРНК	Нет	Нет (после транскрипции)	Нет ¹	Воз-можно	Да	Да
Полиаденилирование транскриптов T ⁺ SINE	III	Видимо, нет (после транскрипции)	Да	Да ²	Да	Нет

¹Цитоплазматическое полиаденилирование осуществляется ферментом PAPD4.

²Верно для B2 и, возможно, для некоторых других T⁺ SINE.

спад полиаденилирования (до ~50% от контро-ля) наблюдался для конструкций SINE, в которых имеется сигнал β, но отсутствует район τ – как в случае Ves, так и в случае B2. Меньшим был спад, до 65–75%, в случае конструкций SINE, лишен-ных района β: Ves-Δβ и Sor/B2. Наконец, нокда-ун гяРНП К слабо влиял на полиаденилирование

транскриптов SINE дикого типа (Ves, B2, а также Ere), которое составило около 90% от контроля. Исходно мы ожидали, что нокдаун гяРНП К вы-зовет наиболее существенное падение полиадени-лирования транскриптов конструкций B2, несущих только β-сигнал, так как именно он обладает опре-деленным сходством с сайтом узнавания гяРНП К.

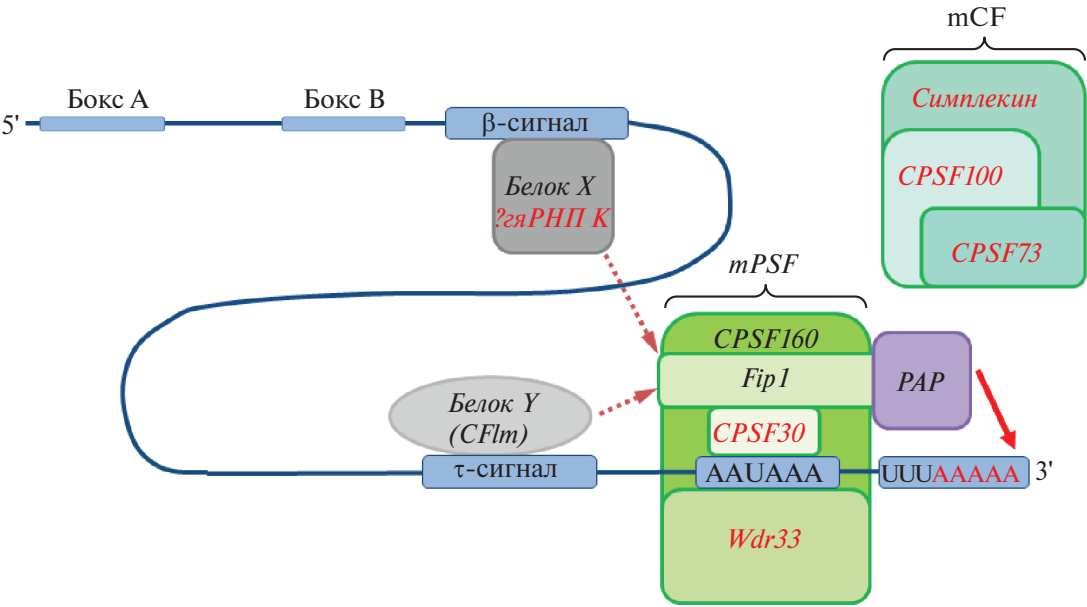


Рис. 4. Схема полиаденилирования транскрипта SINE, синтезированного РНК-полимеразой III. Названия бел-ков даны курсивом: черным показаны белки, нокдаун которых проведен в нашем предыдущем исследовании [29], красным – белки, экспрессия которых подавлялась в данном исследовании. Субкомплекс mPSF комплекса CPSF взаимодействует с сигналом полиаденилирования AAUAAA за счет субъединиц Wdr33 и CPSF30. Белок Y (CFIm25 в случае SINE B2) связывается с τ-сигналом, стимулируя полиаденилирование, осуществляемое поли(А)-полиме-разой (PAP). Предполагается, что гипотетический белок X, связавшись с β-сигналом, также стимулирует полиаде-нилирование; в случае B2, а также Ves, этим белком может быть гяРНП К. Субкомплекс mCF, ответственный за разрезание пре-мРНК, в полиаденилировании транскрипта SINE не участвует.

Однако снижение полиаденилирования под воздействием нокдауна оказалось более распространенным — оно проявлялось и на B2 без β -сигнала (конструкция Sor/B2-T), и особенно на конструкциях Ves, несущих лишь один из сигналов (Ves- $\Delta\beta$ и Ves- $\Delta\tau$). Таким образом, гЯРНП К может влиять на полиаденилирование транскриптов SINE, но, вероятно, несколько иным образом, чем мы первоначально представляли, поэтому окончательные выводы из полученных результатов пока сделать трудно. гЯРНП К вовлечен во многие процессы в клеточном ядре, поскольку он ассоциирован с пре-мРНК и выполняет функцию стыковочной платформы (а docking platform), собирающей сигналы метаболических путей белков и нуклеиновых кислот [35, 36]. При столь широком объеме функций гЯРНП К легко представить, что его нокдаун каким-то образом косвенно влияет и на полиаденилирование транскриптов SINE.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На рис. 4 итог наших исследований представлен в виде схемы, иллюстрирующей полиаденилирование транскриптов SINE класса T⁺. Субкомплекс mPSF в полном составе (Wdr33, CPSF30, CPSF160 и Fip1) участвует в полиаденилировании, связываясь с последовательностью AAUAAA в хвосте транскрипта SINE и обеспечивая работу поли(A)-полимеразы. Субкомплекс mCF (симплектин, CPSF100 и CPSF73) не участвует в полиаденилировании транскрипта SINE. Вспомогательные белки X и Y связываются с сигналами β и τ и взаимодействуют с mPSF, стимулируя его работу. В случае SINE B2 белком Y является CFIm, тогда как природа белка X остается неясной, но вполне возможно, что это гЯРНП К — как для транскриптов B2, так и Ves. Выявление белков-кандидатов, способных взаимодействовать с β - и τ -сигналами транскриптов SINE, и последующая проверка их с помощью нокдауна представляет собой сложную задачу, если только нет очевидных аналогий с полиаденилированием мРНК, как в случае CFIm25 и его сайта связывания UGUA. Скорее всего, для окончательного решения таких задач потребуется использование иных методов, дополняющих нокдаун белков. Однако в любом случае, результаты этого исследования заметно углубляют наши представления о полиаденилировании транскриптов SINE, синтезируемых РНК-полимеразой III, и еще раз демонстрируют уникальность данного процесса на фоне других вариантов полиаденилирования РНК.

Авторы благодарны Д.В. Стасенко за техническую помощь.

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 19-14-00327).

В данной работе отсутствуют исследования, выполненные с использованием человека или животных.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Устьянцев И.Г., Голубчикова Ю.С., Бородулина О.Р., Крамеров Д.А. (2017) Каноническое и неканоническое полиаденилирование РНК. *Молекуляр. биология*. **51**, 262–273.
doi: 10.1134/S0026893317010186
2. Sun Y., Hamilton K., Tong L. (2020) Recent molecular insights into canonical pre-mRNA 3'-end processing. *Transcription*. **11**, 83–96.
3. Liu J., Lu X., Zhang S., Yuan L., Sun Y. (2022) Molecular insights into mRNA polyadenylation and deadenylation. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 10985.
4. Boreikaite V., Passmore L.A. (2023) 3'-End processing of eukaryotic mRNA: machinery, regulation, and impact on gene expression. *Annu. Rev. Biochem.* **92**, 199–225.
5. Proudfoot N.J. (2011) Ending the message: poly(A) signals then and now. *Genes Dev.* **25**, 1770–1782.
6. Gutierrez P.A., Wei J., Sun Y., Tong L. (2022) Molecular basis for the recognition of the AUUAAA polyadenylation signal by mPSF. *RNA*. **28**, 1534–1541.
7. Zhang Y., Sun Y., Shi Y., Walz T., Tong L. (2020) Structural insights into the human pre-mRNA 3'-end processing machinery. *Mol. Cell*. **77**, 800–809.e806.
8. Yang Q., Gilmartin G.M., Doublié S. (2010) Structural basis of UGUA recognition by the Nudix protein CFI(m)25 and implications for a regulatory role in mRNA 3' processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 10062–10067.
9. Zhu Y., Wang X., Forouzmand E., Jeong J., Qiao F., Sowd G.A., Engelman A.N., Xie X., Hertel K.J., Shi Y. (2018) Molecular mechanisms for CFIm-mediated regulation of mRNA alternative polyadenylation. *Mol. Cell*. **69**, 62–74.e64.
10. Sachs A., Wahle E. (1993) Poly(A) tail metabolism and function in eucaryotes. *J. Biol. Chem.* **268**, 22955–22958.
11. Nicholson A.L., Pasquinelli A.E. (2019) Tales of detailed poly(A) tails. *Trends Cell Biol.* **29**, 191–200.
12. Neve J., Patel R., Wang Z., Louey A., Furger A.M. (2017) Cleavage and polyadenylation: ending the message expands gene regulation. *RNA Biol.* **14**, 865–890.
13. Laishram R.S. (2014) Poly(A) polymerase (PAP) diversity in gene expression — star-PAP vs canonical PAP. *FEBS Lett.* **588**, 2185–2197.
14. Charlesworth A., Meijer H.A., de Moor C.H. (2013) Specificity factors in cytoplasmic polyadenylation. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. **4**, 437–461.
15. Norbury C.J. (2013) Cytoplasmic RNA: a case of the tail wagging the dog. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 643–653.
16. Татосян К.А., Устьянцев И.Г., Крамеров Д.А. (2020) Дегградация РНК в эукариотических клетках. *Молекуляр. биология*. **54**, 542–561.
doi: 10.1134/S0026893320040159

17. Borodulina O.R., Kramerov D.A. (2008) Transcripts synthesized by RNA polymerase III can be polyadenylated in an AAUAAA-dependent manner. *RNA*. **14**, 1865–1873.
18. Kramerov D.A., Vassetzky N.S. (2011) SINEs. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. **2**, 772–786.
19. Kramerov D.A., Vassetzky N.S. (2011) Origin and evolution of SINEs in eukaryotic genomes. *Heredity*. (Edinb). **107**, 487–495.
20. Vassetzky N.S., Kramerov D.A. (2013) SINEBase: a database and tool for SINE analysis. *Nucl. Acids Res.* **41**, D83–D89.
21. Deininger P. (2011) Alu elements: know the SINEs. *Genome Biol.* **12**, 236.
22. Borodulina O.R., Kramerov D.A. (2001) Short interspersed elements (SINEs) from insectivores. Two classes of mammalian SINEs distinguished by A-rich tail structure. *Mamm. Genome*. **12**, 779–786.
23. Устьянцев И.Г., Татосян К.А., Стасенко Д.В., Кочанова Н.Ю., Бородулина О.Р., Крамеров Д.А. (2017) Полиаденирование транскриптов, считываемых РНК-полимеразой III с SINE, значительно удлиняет время их жизни в клетке. *Молекуляр. биология*. **54**, 78–86. doi: 10.1134/S0026893319040150
24. Borodulina O.R., Ustyantsev I.G., Kramerov D.A. (2023) SINEs as potential expression cassettes: impact of deletions and insertions on polyadenylation and lifetime of B2 and Ves SINE transcripts generated by RNA polymerase III. *Int. J. Mol. Sci.* **24**(19), 14600.
25. Dewannieux M., Heidmann T. (2005) Role of poly(A) tail length in Alu retrotransposition. *Genomics*. **86**, 378–381.
26. Vassetzky N.S., Borodulina O.R., Ustyantsev I.G., Kosushkin S.A., Kramerov D.A. (2021) Analysis of SINE families B2, Dip, and Ves with special reference to polyadenylation signals and transcription terminators. *Int. J. Mol. Sci.* **22**(18), 9897.
27. Kosushkin S.A., Ustyantsev I.G., Borodulina O.R., Vassetzky N.S., Kramerov D.A. (2022) Tail wags dog's SINE: retropositional mechanisms of can SINE depend on its a-tail structure. *Biology* (Basel). **11**(10), 1403.
28. Borodulina O.R., Golubchikova J.S., Ustyantsev I.G., Kramerov D.A. (2016) Polyadenylation of RNA transcribed from mammalian SINEs by RNA polymerase III: complex requirements for nucleotide sequences. *Biochim. Biophys. Acta*. **1859**, 355–365.
29. Ustyantsev I.G., Borodulina O.R., Kramerov D.A. (2021) Identification of nucleotide sequences and some proteins involved in polyadenylation of RNA transcribed by Pol III from SINEs. *RNA Biol.* **18**, 1475–1488.
30. Chomczynski P., Sacchi N. (2006) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc.* **1**, 581–585.
31. Clerici M., Faini M., Muckenfuss L.M., Aebersold R., Jinek M. (2018) Structural basis of AAUAAA polyadenylation signal recognition by the human CPSF complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **25**, 135–138.
32. Sun Y., Zhang Y., Hamilton K., Manley J.L., Shi Y., Walz T., Tong L. (2018) Molecular basis for the recognition of the human AAUAAA polyadenylation signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **115**, E1419–E1428.
33. Shi Y., Manley J.L. (2015) The end of the message: multiple protein-RNA interactions define the mRNA polyadenylation site. *Genes Dev.* **29**, 889–897.
34. Ray D., Kazan H., Cook K.B., Weirauch M.T., Najafabadi H.S., Li X., Gueroussov S., Albu M., Zheng H., Yang A., Na H., Irimia M., Matzat L.H., Dale R.K., Smith S.A., Yarosh C.A., Kelly S.M., Nabet B., Mecnas D., Li W., Laishram R.S., Qiao M., Lipshitz H.D., Piano F., Corbett A.H., Carstens R.P., Frey B.J., Anderson R.A., Lynch K.W., Penalva L.O., Lei E.P., Fraser A.G., Blencowe B.J., Morris Q.D., Hughes T.R. (2013) A compendium of RNA-binding motifs for decoding gene regulation. *Nature*. **499**, 172–177.
35. Mikula M., Bomsztyk K., Goryca K., Chojnowski K., Ostrowski J. (2013) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) K genome-wide binding survey reveals its role in regulating 3'-end RNA processing and transcription termination at the early growth response 1 (EGR1) gene through XRN2 exonuclease. *J. Biol. Chem.* **288**, 24788–24798.
36. Wang Z., Qiu H., He J., Liu L., Xue W., Fox A., Tickner J., Xu J. (2020) The emerging roles of hnRNPK. *J. Cell Physiol.* **235**, 1995–2008.

PARTICIPATION OF PROTEINS OF THE CPSF COMPLEX IN POLYADENYLATION OF TRANSCRIPTS READ BY RNA POLYMERASE III FROM SINES

I. G. Ustyantsev¹, O. R. Borodulina¹, D. A. Kramerov^{1, *}

¹*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: kramerov@eimb.ru*

SINEs are mobile genetic elements of multicellular eukaryotes that arose during evolution from various tRNAs, as well as from 5S rRNA and 7SL RNA. Like the genes of these RNAs, SINEs are transcribed by RNA polymerase III. Transcripts of some mammalian SINEs have the ability to AAUAA-dependent polyadenylation that is unique for transcriptions generated by RNA polymerase III. Despite a certain similarity with canonical polyadenylation of mRNAs (transcripts of RNA polymerase II), these processes apparently differ significantly. The purpose of this work is to evaluate how important for polyadenylation of SINE transcripts are proteins of the CPSF complex formed by mPSF and mCF subcomplexes which directs mRNA polyadenylation. In HeLa cells, siRNA knockdowns of the CPSF components were carried out, after which the cells were transfected with plasmid constructs containing SINEs. A decrease of polyadenylation of the SINE transcripts as a result of the knockdown of the proteins was evaluated by Northern-hybridization. It turned out that the CPSF components, such as WDR33 and CPSF30, contributed to the polyadenylation of SINE transcriptions, while the knockdown of CPSF100, CPSF73 and symplekin did not reduce the polyadenylation of these transcripts. Wdr33 and CPSF30, along with the CPSF160 and Fip1 previously studied, are components of the subcomplex mPSF responsible for mRNA polyadenylation. Thus, the available data suggest the importance of all mPSF proteins for SINE transcriptions. At the same time, the CPSF100, CPSF73, and symplekin, forming the subcomplex mCF, are responsible for the cleavage of pre-mRNA, therefore, their non-participation in the polyadenylation of SINE transcriptions seems quite natural.

Keywords: SINE, retrotransposons, non-coding RNA, RNA polymerase III, polyadenylation, polyadenylation factors, knockdown, Mammalia