DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-265

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕРМИНАТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ II ДЛЯ РЕГУЛЯЦИИ ЭПИСОМАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

REGULATION OF EPISOMAL GENE EXPRESSION BY RNA POLYMERASE II TRANSCRIPTION TERMINATORS IN MAMMALS

А. Е. Летягина[1,2], Л. В. Болдырева[1], А. А. Огиенко[1], Ю. А. Галимова[1], Е. Н. Андреева[1], Е. С. Омелина[1]

[1] *Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск*
[2] *Новосибирский государственный университет*

A. E. Letiagina[1,2], L. V. Boldyreva[1], A. A. Ogienko[1], Y. A. Galimova[1], E. N. Andreyeva[1], E. S. Omelina[1]

[1] *Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk*
[2] *Novosibirsk State University*

✉ leshchenkoanya@gmail.com

Аннотация

Нами было исследовано влияние последовательности, расположенной в области +17..56 п. н. после сигнала полиаденилирования репортерного гена улучшенного зеленого флуоресцентного белка (eGFP) на уровень его мРНК методом массового параллельного репортерного анализа (МПРА). Положение этой последовательности соответствует DSE. Было показано, что изменение последовательности этого района позволяет варьировать уровень мРНК и белка eGFP в широких пределах.

Abstract

We investigated the effect of a sequence located in the +17..56 bp region after the polyadenylation signal (PAS) of the enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) reporter gene on its mRNA level by Massively Parallel Reporter Assay (MPRA). The position of this sequence corresponds to the Downstream Sequence Element (DSE). Sequence variation of this region has been shown to alter eGFP mRNA and protein levels over a wide range.

Экспрессия генов является определяющим процессом в жизнедеятельности всех организмов, который сложным образом регулируется на всех его этапах. У эукариотических организмов основной вклад в активность генов вносят структура хроматина, определяемая взаимодействиями регуляторных белков со специфическими мотивами ДНК, а также процессинг (созревание) РНК. Исследование влияния различных последовательностей ДНК на регуляцию экспрессии гена является актуальной задачей генетики и биотехнологии. При этом роль регуляторных районов, расположенных выше промоторных последовательностей, в этом процессе изучена значительно лучше, чем районов, расположенных в 3′-областях генов.

У эукариот терминация транскрипции может оказывать значительное влияние на уровень экспрессии генов различными путями. Процессинг 3′-конца предшественника матричной РНК (пре-мРНК) и последующая терминация транскрипции белок-кодирующих генов основана на сборке функционального комплекса процессинга 3′-конца пре-мРНК. Нуклеотидный состав 3′-участка незрелого транскрипта влияет на то, какой именно вариант комплекса процессинга 3′ конца пре-мРНК будет сформирован и какой сигнал полиаденилирования (СПА) будет выбран. Нуклеотидные последовательности, индуцирующие и улучшающие сборку комплекса процессинга 3′-конца пре-мРНК, исследуются на протяжении последних 49 лет [1]. Однако информация о составе оптимальной последовательности Downstream Sequence Element (DSE) — одного из ключевых цис-элементов, принимающих участие в процессинге 3′-конца пре-мРНК, — остается неполной и противоречивой.

Одной из причин малой исследованности регуляторной роли терминаторов транскрипции является отсутствие технических подходов, позволяющих систематически идентифицировать функциональные элементы, расположенные после СПА и не входящие в последовательности зрелых (т. е. полиаденилированных) транскриптов. В настоящей работе использован метод массового параллельного репортерного анализа (МПРА), который позволяет одновременно измерять уровень транскрипционной активности большого числа (до нескольких миллионов) не интегрированных в геном трансгенов. Метод МПРА основан на кратковременной трансфекции культивируемых клеток ДНК-штрихкодированными репортерными конструкциями с последующим анализом их транскрипционной активности посредством высокопроизводительного параллельного секвенирования. В нашем случае основным инструментом для проведения МПРА были плазмидные библиотеки, содержащие два ключевых фрагмента: исследуемую последовательность (в этой работе условно названную «мутация») и штрихкод (ШК).

© А. Е. Летягина, Л. В. Болдырева, А. А. Огиенко, Ю. А. Галимова, Е. Н. Андреева, Е. С. Омелина, 2025

ШК и исследуемая последовательность обычно представляют собой короткие вариабельные последовательности, расположенные внутри и вне транскрипционной единицы соответственно. Таким образом, ШК могут быть использованы для количественной оценки влияния различных изучаемых последовательностей, отсутствующих в зрелых транскриптах, на представленность последних в трансфицированных клетках. Метод МПРА был использован для систематического диссекционного анализа DSE. DSE расположен на расстоянии 10–30 н. ниже сайта полиаденилирования и обеспечивает связывание белка CstF64 с молекулой пре-мРНК. DSE не входит в состав молекулы зрелой мРНК. Это делает его привлекательной мишенью для модуляции уровня экспрессии целевого гена.

В работе было показано, что последовательность и вторичная структура РНК в области DSE оказывают большое влияние на уровень зрелой мРНК и белка eGFP. Было показано, что оптимальная последовательность DSE обеспечивает эффективный процессинг 3′-конца пре-мРНК и снижает долю непроцессированных транскриптов, которые могут возникать при преждевременной терминации транскрипции РНК-полимеразы II независимо от разрезания 3′-конца пре-мРНК [2]. Неполиаденилированные транскрипты не могут транспортироваться в цитоплазму и быть транслированы [3]. Это делает терминаторы транскрипции РНК полимеразы II важными регуляторными элементами, позволяющими модулировать уровень экспрессии целевого гена.

Литература

1. Proudfoot N. J., Brownlee G. G. 3′ non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA // Nat. 1976. Vol. 263. P. 211–214.

2. Zhang H., Rigo F., Martinson H. G. Poly(A) Signal-Dependent Transcription Termination Occurs through a Conformational Change Mechanism that Does Not Require Cleavage at the Poly(A) Site // Mol. Cell. Elsevier Inc., 2015. Vol. 59, No. 3. P. 437–448.

3. Liu J. et al. Molecular Insights into mRNA Polyadenylation and Deadenylation // Int. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23, No. 19.