doi 10.18699/bgrs2026-79

Жизненный цикл архитектурной РНК от транскрипции до созревания в стабильные РНП-агрегаты

Красикова А.[1]*, Куликова Т.[1], Злотина А.[1], Федоров А.[1]
[1] *Лаборатория структуры и динамики клеточного ядра, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*
** a.krasikova@spbu.ru*

Ключевые слова: архитектурная РНК; некодирующая РНК; ретротранспозоны; РНК-связывающие белки; РНП-агрегаты; сплайсинг; тандемные повторы; транскрипция; транскрипционные петли

Мотивация и цель: Растущее ядро ооцита у животных с гипертранскрипционным типом оогенеза (рыбы, амфибии, рептилии, птицы и некоторые беспозвоночные) представляет собой удобный объект для изучения механизмов формирования ядерных доменов. Основное преимущество ядер ооцитов – преобразование хромосом в хромосомы типа ламповых щеток с тысячами транскрипционных единиц, которые выпетливаются в латеральном направлении [1]. Хромосомы типа ламповых щеток характеризуются интенсивной транскрипцией нескольких тысяч кодирующих белки генов и генов некодирующих РНК [2, 3], а также тандемно повторяющихся последовательностей [4].

В отличие от тысяч нормальных транскрипционных петель с очень высокой скоростью синтеза РНК, отдельные поздно метящиеся петли (англ. Sequentially labeling loops, SLL) очень медленно включают предшественники РНК [5, 6]. Было выдвинуто предположение о медленной скорости или даже остановке движения РНК-полимеразы вдоль транскрипционных единиц в пределах SLL [7]. До нашего исследования локусы формирования SLL и состав РНК в них оставались неизвестными. В данной работе мы поставили целью идентифицировать некодирующие РНК, ответственные за формирование SLL.

Методы и алгоритмы: Сочетание биоинформатического анализа генома и транскриптома ядер ооцитов курицы с цитогенетическим анализом гигантских хромосом типа ламповых щеток позволило нам идентифицировать отдельные транскрипционные единицы нового тандемного повтора LL2R в определенных локусах хромосом и получить подробное представление о транскрипции и процессинге РНК этого повтора, что сложно достижимо на уровне интерфазного ядра.

Результаты: Мы продемонстрировали, что ретротранспозон семейства LINE подсемейства CR1-H активирует транскрипцию тандемного повтора LL2R [8]. 5’-UTR полноразмерного элемента CR1-H в начале транскрипционной единицы повтора LL2R деметилирован, что указывает на его активную промоторную роль в растущих ооцитах.

Чтобы изучить транскрипционную активность транскрипционных петель LL2R, мы исследовали распределение активной формы РНК-полимеразы II, а затем проследили динамику включения во вновь синтезируемые транскрипты BrUTP, инъецированного в ооциты. Тысячи нормальных транскрипционных петель включали BrUTP во вновь синтезируемые транскрипты в течение первых 20 минут после инъекции, тогда как транскрипционные петли LL2R не продемонстрировали значительного включения BrUTP в течение 3 часов инкубации. Распределение РНК-полимеразы II вместе с динамикой включения BrUTP предполагает остановку РНК-полимераз вдоль ДНП-осей «глыбчатых петель» и очень низкую скорость синтеза РНК [8].

РНК-связывающие белки hnRNP L, hnRNP K и SFPQ, широко представленные в РНП-матриксе нормальных транскрипционных петель, несущих вновь синтезируемые транскрипты генов, отсутствуют в РНП-матриксе транскрипционной единицы с повторами LL2R. В то же время, архитектурная РНК, содержащая повторы LL2R, содержит избыток донорных сайтов сплайсинга и рекрутирует специфичные наборы факторов сплайсинга, включая мяРНК, белки мяРНП и богатые серином/аргинином белки SRRM2 и SC35, которые содержат домены низкой сложности, способствующие разделению фаз. Из-за дефицита акцепторных сайтов сплайсинга нарушенный сплайсинг приводит к очень низкой скорости транскрипции и удержанию на транскрипционных петлях нить-специфичных транскриптов повтора LL2R с ассоциированными с ними белками [8]. Мы предполагаем, что задержка 3’-процессинга может быть вызвана нарушением ко-транскрипционного сплайсинга вновь синтезируемых транскриптов повтора LL2R. РНК, содержащая повторы LL2R, также образует недиффундирующие РНП-агрегаты, обогащенные факторами сплайсинга, которые могут служить местом пост-транскрипционного процессинга РНК.

Выводы: Мы пришли к выводу, что транскрипты тандемных повторов образуют внутриядерные домены, обогащенные факторами сплайсинга, и служат в качестве архитектурных РНК, содержащих избыток/дефицит сайтов связывания определенных белков, что приводит к концентрации/истощению этих белков в определенном хромосомном локусе.

Финансирование: Первоначальный биоинформатический и цитогенетический анализ был поддержан грантом Российского научного фонда № 14-14-00131.

The life cycle of an architectural RNA from its transcription to maturation into stable RNP aggregates

Krasikova A.[1]*, Kulikova T.[1], Zlotina A.[1], Fedorov A.[1]
[1] *Laboratory of Cell Nucleus Structure and Dynamics, Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia*
** a.krasikova@spbu.ru*

Key words: architectural RNA; nascent transcripts; non-coding RNA; retrotransposon; RNA binding proteins; RNP aggregates; splicing; tandem repeats; transcription; transcription loops

Motivation and Aim: Growing oocyte nucleus in animals with hypertranscriptional type of oogenesis (fishes, amphibians, reptiles, birds and several invertebrates) is a favorable model object for studying mechanisms of nuclear domain formation. A major advantage is transformation of the chromosomes into the 'lampbrush' configuration with thousands of transcription units that loop out laterally [1]. Chromosomes in a lampbrush form are characterized by intensive transcription of a variety of protein-coding and non-coding RNA genes [2, 3], as well as tandemly repetitive sequences [4].

In contrast to thousands of normal transcription loops with very high rate of nascent RNA synthesis, single 'Sequentially labeling loops' (SLLs) incorporate RNA precursors very slowly [5, 6]. Slow rate or even arrest of RNA polymerase movement along the transcription units within SLLs has been proposed [7]. Before our study, the loci of SLLs formation and their nascent RNA content remained unknown. Here, we aimed to identify the non-coding RNAs responsible for SLLs formation.

Methods and Algorithms: The combination of bioinformatic genome and chicken oocyte nucleus transcriptome analysis and cytogenetic imaging of highly extended lampbrush chromosomes allowed us to identify individual transcription units of a novel LL2R tandem repeat at specific chromosomal loci and to provide a detailed view of the LL2R repeat transcription and transcript processing, not achievable in the interphase nucleus.

Results: We demonstrated that an active retrotransposable element (LINE retrotransposon of the CR1-H subfamily) drives transcription of the LL2R tandem repeat [8]. 5'UTR of the full-length CR1-H element at the beginning of the LL2R repeat transcription unit is demethylated, indicating its active promoter function in growing oocytes.

To explore the transcriptional activity of LL2R transcription loops, we examined the distribution of the active form of RNA polymerase II and then followed the dynamics of incorporation into nascent transcripts of BrUTP injected into oocytes. Thousands of normal transcription loops incorporated BrUTP into nascent transcripts within the first 20 minutes after injection, whereas LL2R transcription loops did not demonstrate any significant incorporation of BrUTP during 3h of incubation. The distribution of RNA polymerase II, together with the dynamics of BrUTP incorporation suggest RNA polymerases stalling along the DNP-axes of 'lumpy loops' and a very low rate of nascent RNA synthesis [8].

RNA binding proteins hnRNP L, hnRNP K, and SFPQ, widely distributed in the RNP-matrix of normal transcription loops bearing nascent gene transcripts, are specifically absent from the RNP-matrix of the LL2R repeat transcription unit. At the same time, the LL2R repeat-containing architectural RNA contains an excess of donor splice sites and recruits specific sets of multiple splicing factors, including TMG-capped snRNAs, core snRNP proteins, and serine/arginine-rich proteins SRRM2 and SC35, which contain a low complexity IDR - arginine-serine (RS) rich domains that promote phase separation. Due to the deficiency of acceptor splice sites, impaired splicing results in a very low rate of transcription and retention of strand-specific nascent LL2R repeat-containing RNA with associated RBPs on the transcription loops [8]. We suggest that delay in 3' end cleavage may be caused by a deficiency of co-transcriptional splicing of nascent LL2R repeat transcripts. LL2R repeat-containing RNA also forms non-diffusible RNP-aggregates enriched by splicing factors that could serve as a site of post-transcriptional RNA processing.

Conclusion: We conclude that tandem repeat transcripts scaffold splicing factor-enriched nuclear domains, serving as architectural RNAs by containing excess/deficiency of particular RBP sites, leading to concentration/depletion of the particular RBPs at a particular chromosomal locus.

Funding: The initial bioinformatic and cytogenetic analysis was supported by the Russian Science Foundation grant # 14-14-00131.

Список литературы/References

1. Krasikova A., Fishman V., Kulikova T. Lampbrush chromosome studies in the post-genomic era. *BioEssays*. 2023;45: 2200250. https://doi.org/10.1002/bies.202200250
2. Gardner E.J., Nizami Z.F., Talbot C.C., Gall J.G. Stable intronic sequence RNA (sisRNA), a new class of noncoding RNA from the oocyte nucleus of *Xenopus tropicalis*. *Genes Dev*. 2012;26(22):2550–2559. https://doi.org/10.1101/gad.202184.112
3. Krasikova A. et al. The first chicken oocyte nucleus whole transcriptomic profile defines the spectrum of maternal mRNA and non-coding RNA genes transcribed by the lampbrush chromosomes. *Nucleic Acids Res*. 2024;52(21):12850–12877. https://doi.org/10.1093/nar/gkae941
4. Trofimova I., Krasikova A. Transcription of highly repetitive tandemly organized DNA in amphibians and birds: A historical overview and modern concepts. *RNA Biology*. 2016;13(12):1246–1257. https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1240142
5. Gall J.G., Callan H.G. H3 uridine incorporation in lampbrush chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1962;48(4):562–570. https://doi.org/10.1073/pnas.48.4.562
6. Красикова А.В., Куликова Т.В. Хромосомы типа ламповых щеток: современные представления и перспективы исследований. 2019. Изд-во С.-Петерб. ун-та, Санкт-Петербург. [Krasikova A., Kulikova T. Lampbrush chromosomes: current concepts and research perspectives. 2019a. St Petersburg University Publishing House (in Russian)]
7. Penrad-Mobayed M., Bonnanfant-Jais M.L., N'Da E., Angelier N. Evidence for a particular mode of transcription in globular loops of lampbrush chromosomes of the newt *Pleurodeles waltlii*. *Chromosoma*. 1986;94(5):319–328. https://doi.org/10.1007/BF00328631
8. Krasikova A., Zlotina A., Kulikova T., Schubert V., Fedorov A. Nascent transcripts of LL2R tandem repeat nucleate locus-specific RNP condensates recruiting splicing factors. *BioRxiv* 2026.03.19.712899.