

УДК 577.29

БИОТИНИЛИРОВАННЫЙ Arc1p КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ КАНДИДАТ НА БЕЛОК, ВХОДЯЩИЙ В СОСТАВ ТЕЛОМЕРАЗЫ ДРОЖЖЕЙ

А.Н. Малявко, М.Э. Зверева, О.А. Донцова

(кафедра химии природных соединений; e-mail: malyavkoan@gmail.com)

Получен штамм *Saccharomyces cerevisiae* с делецией гена биотинилированного белка Arc1. Анализ этого штамма указывает на то, что Arc1p взаимодействует с теломеразой дрожжей.

Ключевые слова: теломераза, *Saccharomyces cerevisiae*, биотинилирование.

Сокращения. РНК – рибонуклеиновая кислота, ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота, ПЦР – полимеразная цепная реакция, ДЭАЭ – диэтиламиноэтил.

Концы хромосом эукариотических организмов (теломеры) имеют особое строение и выполняют ряд важнейших функций: защищают хромосомы от дегенерации и слияния, отвечают за их правильную сегрегацию при делении клетки, участвуют в формировании архитектуры ядра [1]. Наиболее интересной их функцией является роль своеобразных биологических часов, отсчитывающих количество клеточных делений. При каждом делении в результате недорепликации и действия экзонуклеаз теломеры укорачиваются, а при достижении ими критической длины клетка гибнет.

Во многих клетках, для которых природой предусмотрено неограниченный потенциал деления, например в половых, стволовых, а также у одноклеточных эукариот существует механизм поддержания стабильности длины теломер, в основу которого положен синтез теломерной ДНК с помощью специального фермента теломеразы [2]. В 85% случаев опухолевые клетки приобретают неограниченный потенциал деления именно за счет активации теломеразы, что делает теломеразу привлекательной мишенью для антираковой терапии [3].

Теломераза – сложный рибонуклеопротеидный комплекс, основными компонентами которого являются теломеразная РНК и теломеразная обратная транскриптаза. Помимо них в состав комплекса входят вспомогательные белки, без которых невозможна работа фермента *in vivo*. Для функционирования теломеразы необходимы и другие, не входящие в ее состав белки, взаимодействующие с компонентами теломеразы. Однако, несмотря на интенсивное изучение теломеразы, точный состав теломеразного комплекса и полный спектр взаимодействующих с теломеразой белков до сих пор неизвестны.

Работа и сборка этого сложного фермента регулируется на разных уровнях. Одним из таких уровней регуляции являются посттрансляционные модификации компонентов комплекса. Известно, что обратная транскриптаза теломеразы человека может обратимо фосфорилироваться по некоторым остаткам серина, треонина и тирозина [4]. Одни из таких модификаций приводят к активации теломеразы, другие, напротив – к подавлению ее активности. Некоторые из модификаций hTERT играют роль в биогенезе теломеразы.

Недавно было обнаружено, что в состав теломеразного комплекса дрожжей входит биотинилированный компонент. При связывании дрожжевого экстракта со стрептавидин-сефарозой на аффинном сорбенте детектируется активная теломераза. Фракционирование очищенной на ДЭАЭ-целлюлозе теломеразы в градиенте плотности глицерина показало, что вместе с более легкими теломеразными комплексами комигрирует биотинилированный белок с молекулярной массой около 50 кДа [5].

Однозначно установить, что это за белок и какова его функция, пока не удалось. Из-за малого количества теломеразы в клетке (29 молекул на клетку [6]) попытки идентифицировать искомым белок с помощью MALDI-TOF-спектрометрии не увенчались успехом. Отметим, что элюция белков, связанных на стрептавидин-сефарозе взаимодействием биотин-стрептавидин, представляет собой отдельную не тривиальную задачу и не проходит количественно из-за прочности взаимодействия [7].

Цель данного исследования – разработка альтернативного подхода к определению биотинилированного компонента теломеразы. Для этого предполагалось выбрать наиболее подходящих кандидатов среди из-

вестных биотинилированных белков, получить штаммы с делецией генов этих кандидатов и проверить, будет ли комигрировать какой-либо из этих белков с теломеразой при ее фракционировании в градиенте плотности глицерина.

Методы исследования Штаммы дрожжей

В работе использовали штамм дрожжей W303α (*ade2-1 trp1-1 leu2-3, 112 his3-11 ura3-1 can1-100 MATα*). Штамм *Arc1* (W303α, *arc1::HIS5*) был получен путем замены гена *arc1* на хромосоме по стандартной схеме [8]. ПЦР-фрагмент был амплифицирован с плазмиды pProtA/HIS5 [9] с использованием праймеров F

(5'-ATATAGAGTTTCAAGAGTCAATGTCCGATCTCGTTACCAAGTTCGAATCGGCTTCGTACGCTGCAGGTC-3') и R (5'-CATTAGCAATACTAGCAACCTTGAATGATTCGCCCTTAGCGTTGGTCAACTTAACTGGATGGCGGCGTTAG-3').

Вестерн-блот-анализ биотинилированных белков

Дрожжи выращивали в 2 мл среды YPD или SC при 30°C до насыщения. Клетки собирали центрифугированием (5000 rpm), ресуспендировали в воде (500 мкл), добавляли 70 мкл NaOH (2 M) и 5 мкл β-меркаптоэтанола. Инкубировали во льду 15 мин, затем добавляли 75 мкл 55%-го ТХУ и инкубировали еще 15 мин. Центрифугировали 20 мин (5000 rpm) и растворяли осадок в буфере NU (200 mM Трис (pH 6,8), 1 mM ЭДТА, 8 M мочевины, 5% ДСН, 1,5 mM ДТТ). Вестерн-блоттинг с использованием стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена, проводили по ранее описанной методике [10].

Очистка и фракционирование теломеразы

Хроматографическую очистку теломеразы на ДЭАЭ-целлюлозе, фракционирование в градиенте плотности глицерина и выделение биотинилированных белков на стрептавидин-сефарозе проводили, как описано ранее [5]. Только после фракционирования в градиенте плотности глицерина собирали фракции по 1 мл.

Результаты

Биотинилирование – посттрансляционная модификация, в ходе которой фермент биотин лигаза катализирует ковалентное присоединение молекулы биотина к одному специфическому остатку лизина в белке. На данный момент в литературе описано шесть биотинилированных белков в дрожжах *S. cerevisiae*. Это пять

карбоксилаз: две ацетил-СоА-карбоксилазы Acc1p (Mr 250 кДа) и Hfa1p (Mr 242 кДа), две пируват карбоксилазы Puc1p (Mr 130 кДа) и Puc2p (Mr 130 кДа), а также амидолиаза мочевины Dur1,2p (Mr 202 кДа). Кроме них в клетках *S. cerevisiae* присутствует еще один биотинилированный белок – Arc1p (Mr 42 кДа). Значение модификации биотином белка Arc1 в настоящее время не выяснено [11]. При этом Arc1p обладает рядом любопытных свойств: *in vivo* он биотинилирован частично, может фосфорилироваться, является квадруплекс-связывающим белком и др. [12]. Представляется весьма маловероятным, чтобы искомым биотинилированным компонентом теломеразного комплекса была одна из карбоксилаз. Их функции достаточно хорошо изучены и никак не перекрываются известными функциями теломеразы. Данные, полученные ранее в нашей лаборатории, указывают на то, что молекулярная масса белка-кандидата 50 кДа, а Mr карбоксилаз составляет не менее 130 кДа. Все вышесказанное делает белок Arc1 единственным (из известных биотинилированных белков) кандидатом на роль биотинилированного компонента теломеразы. Поэтому было решено проверить, будет ли ассоциировать Arc1p с теломеразой.

Для проверки гипотезы о возможности вхождения Arc1p в состав теломеразы нами был получен штамм *S. cerevisiae*, в котором ген, кодирующий белок Arc1, удален. Ген *arc1* не является жизненно необходимым, и потому его делеция не является летальной для клеток [13]. Замена гена *arc1* была подтверждена при помощи анализа ПЦР геномной ДНК с использованием праймеров в соответствии со схемой, представленной на рис. 1, А, Б. Полученные ПЦР-продукты, разделенные в агарозном геле, показаны на рис. 1, В. Видно, что результаты эксперимента подтверждают замену гена на хромосоме, так как ПЦР-продукты в дорожках геля соответствуют ожидаемым.

Мы проанализировали биотинилированные белки, присутствующие в штаммах дикого типа, и Arc1 методом Вестерн-блоттинга с использованием стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена (str-HRP). Результаты проведенного анализа представлены на рис. 1, А. Полосы, наблюдаемые в областях 200 и 150 кДа, соответствуют следующим карбоксилазам: около 200 кДа – Acc1p (Mr 250 кДа), Hfa1p (Mr 242 кДа) и Dur1,2p (Mr 202 кДа), около 150 кДа – Puc1p (Mr 130 кДа) и Puc2p (Mr 130 кДа). Видно, что в штамме дикого типа присутствует полоса в области 50 кДа, соответствующая белку Arc1, а в штамме *Arc1* она отсутствует. Видно также, что в области 50 кДа есть еще одна полоса, соответствующая

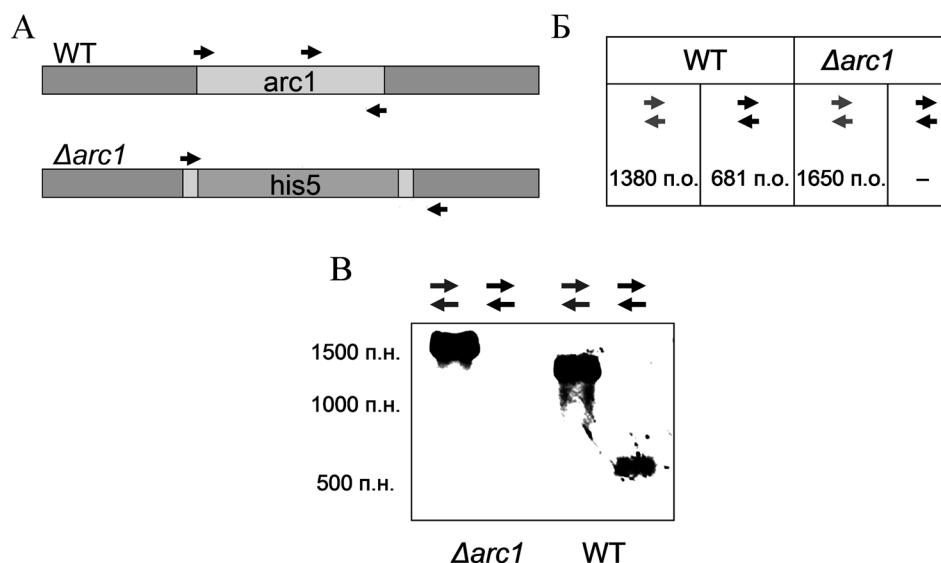


Рис. 1. Получение штамма *Δarc1*: А – схема анализа геномной ДНК дрожжей с помощью ПЦР с использованием двух пар праймеров (обозначены стрелочками) для подтверждения замены гена на хромосоме; Б – длины ожидаемых продуктов ПЦР; В – Продукты ПЦР с геномной ДНК, выделенной из штамма дикого типа (WT) и штамма *Δarc1*, разделенные в агарозном геле

биотинилированному белку с молекулярной массой, близкой к белку Arc1, что затрудняет ее обнаружение. Поскольку удаление гена *arc1* было подтверждено ПЦР-анализом, не представляется возможным, чтобы это полоса соответствовала белку Arc1. Возможно, наблюдаемая полоса – артефакт метода (неспецифичность используемого для детекции стептавидина) или продукт деградации одной из карбоксилаз. Однако также возможно, что мы наблюдаем неописанный ранее биотинилированный белок.

Мы также проанализировали биотинилированные белки в штаммах дикого типа и *Δarc1*, выращенных в минимальной среде. В случае штамма *Δarc1* полоса в области 50 кДа практически не видна (рис. 2, Б). Возможно, при росте в условиях нехватки какого-либо элемента питания уровень биотинилирования белка, соответствующего этой полосе, уменьшается. Этот факт может служить подтверждением того, что наличие полосы в области 50 кДа обусловлено присутствием самостоятельного биотинилированного белка, а не продукта деградации другого. Однако точная идентификация белка по полученным данным невозможна.

Чтобы проверить, является ли Arc1p или обнаруженный нами в штамме *Δarc1* белок с массой около 50 кДа биотинилированным компонентом теломеразы, проводили хроматографическую очистку теломеразы на ДЭАЭ-целлюлозе, а затем фракционирование очищенной теломеразы из штаммов дикого типа и

Δarc1. В случае штамма дикого типа наблюдается обогащение биотинилированного белка с массой 50 кДа во фракции 3 (рис. 3, А), что согласуется с данными, полученными ранее [5]. Однако при фракционировании экстракта из штамма *Δarc1* такого обогащения не наблюдается.

Таким образом, полученный в данной работе результат свидетельствует в пользу того, что именно Arc1p является искомым биотинилированным компонентом теломеразы.

Остается открытым вопрос о функции биотинилированного Arc1p в составе теломеразы. Он не явля-

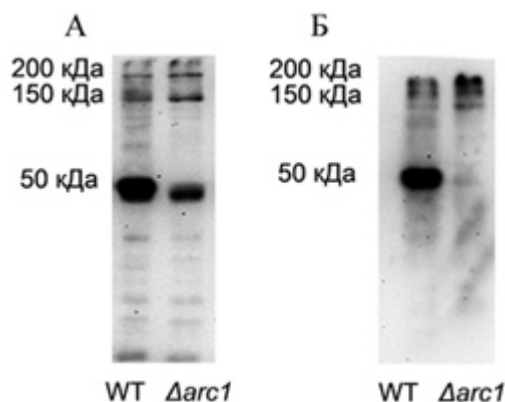


Рис. 2. Вестерн-блот анализ всех биотинилированных белков *S. cerevisiae* в штаммах дикого типа (WT) и *Δarc1*: А – клетки для анализа выращены в среде YPD; Б – клетки для анализа выращены в минимальной среде SC

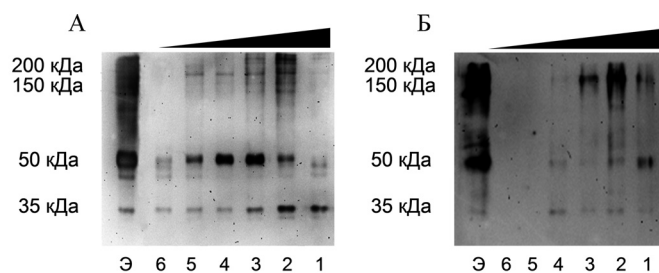


Рис. 3. Вестерн-блот-анализ биотинилированных белков, выделенных на стрептавидин-сефарозе из фракций после ультрацентрифугирования ДЭАЭ-фракции с активной теломеразой из штамма дикого типа (А) и штамма *Δarc1* (Б). 1–6 – номера фракций. Э – биотинилированные белки из клеточного экстракта. Черный треугольник схематично отражает возрастание коэффициента седиментации во фракциях

ется необходимым компонентом теломеразного комплекса, поскольку теломераза, выделенная из штамма *Δarc1*, остается активной *in vitro* (данные не приведены). Однако не исключена возможность того, что

белок Arc1 регулирует работу теломеразы *in vivo*. Так, известно, что Arc1p связывает квадруплексы, а теломерная ДНК представлена G-богатыми повторами, которые могут образовывать квадруплексы. Возможно, Arc1p связывается с теломерами и влияет каким-либо образом на функционирование теломеразы.

С обратной транскриптазой теломеразы человека (hTERT) взаимодействует шаперон Hsp90 [14]. Его гомолог в *S. cerevisiae* Hsp82 влияет на длину теломер [15], возможно, этот шаперон принимает участие в сборке теломеразного комплекса *S. cerevisiae*. Показано наличие взаимодействия между белками Arc1 и Hsp82 [16]. На основании этого можно предположить, что присутствие биотинилированного Arc1p в теломеразе означает правильность проведения одного из этапов сборки комплекса. Однако, чтобы установить, какую роль играет взаимодействие Arc1p с теломеразным комплексом, нужно провести ряд дополнительных экспериментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Blackburn E.H. // Nature. 1991. **350**. P. 569.
2. Greider C.W., Blackburn E.H. // Cell. 1985. **43**. P. 405.
3. Lundblad V. // Oncogene. 2002. **21**. P. 522.
4. Wojtyla A., Gladych M., Rubis B. // Mol. Biol. Rep. 2011. **38**. P. 3339.
5. Щербакова Д.М., Зверева М.Э., Донцова О.А. // Acta Naturae. 2009. **2**. P. 92.
6. Mozdy A.D., Cech T.R. // RNA. 2006. **12**. P. 1721.
7. Rybak J.N., Scheurer S.B., Neri D., Elia G. // Proteomics. 2004. **4**. P. 2296.
8. Longtine M.S., McKenzie A., Demarini D.J., Shan N.G., Wach A., Brachet A., Philippsen P., and Pringle J.R. // Yeast. 1998. **14**. P. 953.
9. Rout M.P., Aitchison J.D., Suprapto A., Hjertaas K., Zhao Y., Chait B.T. // J. Cell Biol. 2000. **148**. P. 635.
10. Hoja U., Wellein C., Greiner E., Schweizer E. // Eur. J. Biochem. 1998. **254**. P. 520.
11. Kim H.S., Hoja U., Stolz J., Sauer G., Schweizer E. // J. Biol. Chem. 2004. **279**. P. 42445.
12. Frechin M., Kern D., Martin R.P., Becker H.D., Senger B. // FEBS letters. 2010. **584**. P. 427.
13. Chapman-Smith A., Cronan J.E., Jr. // J. Nutr. 1999. **129**. P. 477S.
14. Holt S.E., Aisner D.L., Baur J., Tesmer V.M., Dy M., Ouellette M., Trager J.B., Morin G.B., Toft D.O., Shay J.W., Wright W.E., White M.A. // Genes dev. 1999. **13**. P. 817.
15. Toogun O.A., Dezwaan D.C., Freeman B.C. // Mol. Cell Biol. 2008. **28**. P. 457.
16. Zhao R., Davey M., Hsu Y.C., Kaplanek P., Tong A., Parsons A.B., Krogan N., Cagney G., Mai D., Greenblatt J., Boone C., Emili A., Houry W.A. // Cell. 2005. **120**. P. 715.

Поступила в редакцию 20.05.12

BIOTINYLATED ARC1P IS A POTENTIAL COMPONENT OF YEAST TELOMERASE

A.N. Malyavko, M.E. Zvereva, O.A. Dontsova

(Division of Chemistry of Natural Compounds)

In the present work was obtained a strain of *Saccharomyces cerevisiae* lacking gene of biotinylated protein Arc1. Results of analysis of this strain indicate that Arc1p interacts with telomerase.

Key words: telomerase, *Saccharomyces cerevisiae*, biotinylation.

Сведения об авторах: Мalyavko Александр Николаевич – аспирант кафедры природных соединений химического факультета МГУ (malyavkoan@gmail.com); Зверева Мария Эмильевна – науч. сотр. кафедры природных соединений химического факультета МГУ, канд. хим. наук (zvereva@genebee.msu.ru); Донцова Ольга Анатольевна – профессор кафедры природных соединений химического факультета МГУ, член-корр. РАН (dontsova@genebee.msu.ru).