

УДК 576.316.24

Биотинилированный компонент входит в состав теломеразного комплекса дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Д.М. Щербакowa, М.Э. Зверева*, О.А. Донцова
Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова
*E-mail: zvereva@genebee.msu.ru

РЕФЕРАТ Теломераза достраивает теломерные повторы к одноцепочечной ДНК на концах хромосом. Этот фермент представляет собой сложный рибонуклеопротеидный комплекс. В состав теломеразы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* входят TLC1 РНК, служащая матрицей для синтеза теломерных повторов, теломеразная обратная транскриптаза Est2p, а также ряд вспомогательных белков (Est1p, Est3p, Ku70/Ku80, Sm-комплекс).

Мы обнаружили, что в состав теломеразного комплекса дрожжей входит биотинилированный компонент. Фракция теломеразы, содержащая биотинилированный белок, активна *in vitro* и составляет небольшую долю от общего количества активной теломеразы, выделенной из клеток. У нас имеются предположения о природе биотинилированного компонента.

Ключевые слова: теломераза дрожжей, биотин, биотинилирование.

Список сокращений: ОТ-ПЦР – обратная транскрипция-полимеразная цепная реакция, ПААГ – полиакриламидный гель, ДЭАЭ-фракция – теломераза, выделенная из дрожжевого экстракта с помощью хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, п.о. – пар оснований, н.о. – нуклеотидных остатков.

ВВЕДЕНИЕ

На концах хромосом эукариот находятся теломеры. Эти ДНК-белковые структуры защищают хромосомы от дегенерации и слияния концов [1]. Длину теломер поддерживает фермент теломераза, который присоединяет теломерные повторы ДНК к 3'-концам хромосомной ДНК [2]. Теломераза активна в клетках организма, способных к неограниченному делению, в клетках 85% раковых опухолей [3], а также клетках одноклеточных эукариот (простейшие и дрожжи) [2, 4].

Теломераза – это сложный комплекс, состоящий из РНК и белков [5, 6]. В состав теломеразного комплекса дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* входят обратная теломеразная обратная транскриптаза Est2p [7], теломеразная РНК TLC1 [8], участок которой служит матрицей для синтеза теломерных повторов, вспомогательные белки Est1p [9] и Est3p [10], без которых теломераза не активна *in vivo* [11], а также другие белки (Sm-белки [12], Ku-белки [13] и др.). Помимо белков, являющихся субъединицами активного комплекса, для функционирования теломеразы необхо-

димы другие белки, взаимодействующие с компонентами теломеразы, но не входящие в ее состав. Например, белок Cdc13, привлекающий теломеразу на теломеру и необходимый для функционирования теломеразы *in vivo* [11], не является субъединицей теломеразы [10], хотя и взаимодействует с Est1p [14]. На данный момент детектировано большое количество генов белков, отсутствие которых приводит к укорочению теломер [15]. Известен также ряд белков (шаперон Hsp82p [16] и др.), для которых было показано взаимодействие с отдельными компонентами теломеразного комплекса. Возможно, такие белки необходимы для сборки комплекса или входят в состав теломеразы на определенных этапах регуляции. Такая сложная организация теломеразного комплекса связана со сложной регуляцией его функционирования. Известно, что удлинение теломер происходит в поздней S-фазе клеточного цикла [17, 18] и теломераза достраивает теломерные повторы преимущественно на самые короткие теломерные концы [19-21]. Регуляция возможна и на стадии сборки теломеразного комплекса и деградации его компонентов. Обнаружение новых взаимодействий белков с компонентами теломеразного комплекса и посттрансляционных модификаций белков, участвующих в работе теломеразы, а также выяснение их роли поможет лучше понять процесс функционирования теломеразы в клетке.

Мы обнаружили, что в состав активного теломеразного комплекса дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* входит биотинилированный компонент. Такие теломеразные комплексы составляют менее половины от общего количества активной теломеразы, выделенной из клетки.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы. В работе использован дрожжевой штамм *Saccharomyces cerevisiae* DBY-746 α (*ura3-52, leu2-3,112, trp1-289, his3- Δ 1*).

Выделение теломеразы с помощью хроматографии на стрептавидин-сефарозе. Культуру клеток дрожжей выращивали в объеме 3.2 л среды SC на глюкозе до оптической плотности $A_{600} = 1.0$. Клетки осаждали центрифугированием (5 мин, 5000 rpm, ротор JA-10, Beckman, +4 °C), промывали водой 4 раза, затем буфером «str» для выделения (20 mM Трис-НСl (рН 7.5), 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM ДТТ, 0.1 mM ЭДТА, 10 % (v/v) глицерин, 0.1 % Triton X-100). Полученный осадок клеток механически разрушали перетиранием в жидком азоте и размораживали во льду холодным буфером «str» (10 мл), содержащим ингибиторы протеаз Complete (Roche), PMSF (0.5 mM) и ингибитор РНКаз RNAsin (Helicon) (40 ед./мл). Клеточный дебрис осаждали центрифугированием (5 мин, 5000g; 2 раза по 15 мин, 15000 rpm, ротор JA-20, Beckman, +4 °C). В аликвоте полученного экстракта измеряли суммарную концентрацию белка с помощью наборов реактивов «Compat-Able Protein Assay Kit» и «BCA Protein Assay Reagent» (Pierce Biotechnology). В случае эксперимента с предварительной обработкой экстракта авидином его добавляли в экстракт (10 мкг/1 мг суммарного белка) и инкубировали в течение 10 минут при +4 °C. Далее экстракт (10 мг/мл белка) добавляли к предварительно уравновешенной буфером «str»

стрептавидин-сефарозе (200 мкл суспензии (GE Healthcare) на 10 мл экстракта) и инкубировали при перемешивании в течение 1.5 ч при +4 °C. Затем сорбент промывали 6 раз буфером «str». Полученную стрептавидин-сефарозу и все остальные фракции замораживали в жидком азоте и хранили при -80 °C для дальнейшего анализа.

Выделение теломеразы с помощью анионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе. Теломеразный комплекс выделяли, как описано в работах [4, 22], с небольшими изменениями: для получения фракций, содержащих теломеразу, элюцию с колонки с ДЭАЭ-целлюлозой проводили линейным градиентом концентрации ацетата натрия (от 100 mM до 1 M). С 10 мл исходного дрожжевого экстракта (10 мг/мл белка) получали 1 мл фракции активной теломеразы, который разделяли на аликвоты, замораживали в жидком азоте и хранили при -80 °C для дальнейшего анализа.

Фракционирование S-100 экстракта и фракций, полученных с помощью хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, в градиенте плотности глицерина.

Культуру клеток дрожжей выращивали, как описано выше, для выделения теломеразы с помощью хроматографии на стрептавидин-сефарозе, но в среде YPD. Аналогично получали дрожжевой экстракт, вместо буфера «str» использовали буфер для лизиса (25 mM Трис-НСl (рН 7.5), 300 mM NaOAc, 2 mM MgCl₂, 1 mM ДТТ, 0.1 mM ЭДТА, 10 % (v/v) глицерин). Далее получали S-100 экстракт ультрацентрифугированием при 100000g и +4 °C в течение 1 ч, затем концентрировали на центриконах Vivaspin 20 (Sartorius, Германия, США). 0.5 мл S-100 экстракта (15 мг/мл суммарного белка) или 0.5 мл ДЭАЭ-фракции наслаивали на заранее приготовленные 15-40 %-ные глицериновые градиенты в буфере для лизиса (объем 10.5 мл). Ультрацентрифугирование проводили при 40 000 rpm при +4 °C в течение 24 ч в SW41 роторе. Собирали 22 фракции по 0.5 мл, замораживали и хранили для дальнейшего анализа.

Детекция теломеразной активности *in vitro*. Для анализа активности в реакции использовали 10 мкл полученной суспензии стрептавидин-сефарозы или ДЭАЭ-фракции или фракции, полученной при ультрацентрифугировании. В конечной смеси (20 мкл) содержалось 50 mM Трис-НСl (рН 8.0), 5 mM MgCl₂, 1 mM ДТТ, 1 mM спермидина, 0.05 mM ЭДТА (внесено с теломеразной фракцией), 5 % (v/v) (или больше при анализе проб с градиента) глицерина (внесено с теломеразной фракцией), 100 мкМ dTTP, 20 мкКи [α -³²P] dGTP (3000 Ки/ммоль), 5 мкМ олигодезоксирибонуклеотида TEL11 (5'-TGGTGTGTGGG-3'). Теломеразная фракция в контрольных реакциях была предварительно проинкубирована с РНКазой А (1 мкл раствора (10 мг/мл), 30 мин, 30 °C). Реакцию удлинения TEL11 проводили в течение 1 ч при 30 °C, затем останавливали, добавляя 200 мкл буфера «stop» (20 mM Tris-НСl (рН 8.0), 20 mM ЭДТА, 0.2% Ds-Na) и 3 мкл протеиназы К (20 мг/мл). После инкубации (1 ч, 30 °C) продукты реакции экстрагировали дважды фенолом, один раз смесью хлороформ : изоамиловый спирт (24 : 1), затем осаждали тремя объемами этанола в присутствии 1/10 объема 3M NaOAc и 5 мкг тРНК *E. coli* в качестве соосаждителя. Осадок промывали два раза 80%-ным этанолом, сушили, растворяли в формамидном буфере для нанесения на денатурирующий ПААГ (80%-ный деионизо-

ванный формамид, ТВЕ буфер, 0.1 %-ный ксилен цианола и 0.1 %-ный бромфенолового синего). Продукты реакции, а также 5'-[³²P]-фосфорилированный TEL11 в качестве маркера длины разделяли электрофорезом в сиквенсном 15 %-ном денатурирующем ПААГ в буфере ТВЕ. Гель сушили и анализировали с помощью электронной автордиографии на приборе PhosphorImager (Molecular Dynamics).

Вестерн-блоттинг для детекции биотинилированных белков. Белки для анализа проб после ультрацентрифугирования высаживали, постепенно добавляя к пробе пять объемов холодного ацетона, затем выдерживая 24 ч при -20 °С. Осадок промывали холодным ацетоном, сушили и растворяли сначала в буфере, содержащем 8М мочевины и 70 мМ Tris-HCl (рН 7.5), затем добавляли воду и проводили электрофорез белков в 15 %-ном ПААГ в присутствии Ds-Na по Лэммли [23]. Белки из экстракта и ДЭАЭ-фракций предварительно не высаживали, электрофорез проводили в 10-12 %-ном ПААГ. Белки переносили на нитроцеллюлозную (GE Healthcare) или PVDF мембрану (BioRad). Для детекции биотинилированных белков на мембране использовали конъюгат стрептавидин-пероксидаза хрена [24] и набор реактивов ECL (GE Healthcare).

ОТ-ПЦР анализ. РНК для ОТ-ПЦР анализа получали фенольной экстракцией анализируемых образцов, далее экстракцией смесью хлороформ : изоамиловый спирт (24 : 1) и высаживанием этанолом в присутствии 1/10 объема 3М NaOAc и тРНК *E. coli* в качестве соосадителя (5 мкг на пробу). Пробы для анализа РНК, связанной на сорбенте, предварительно обрабатывали протеиназой К, как описано выше для детекции теломеразной активности. Все пробы обрабатывали ДНКазой I (1 ед./мкг нуклеиновых кислот или 1 ед. на 100 мкл фракций, полученных при фракционировании в глицериновом градиенте, 1 ч, 37 °С). После этого РНК очищали от белков с помощью экстракции и высаживания, как описано выше. Все пробы растворяли в одинаковом объеме воды (обычно 10 мкл), измеряли концентрацию РНК в образце спектрофотометрически при 260 нм. Для ОТ-ПЦР анализа связывания с сорбентом брали объем, содержащий 0.1 – 0.5 мкг РНК из исходного экстракта, равный объем пробы из несвязавшейся фракции и объем пробы связавшейся фракции с учетом концентрирования TLC1 РНК при связывании ее из экстракта на стрептавидин-сефарозе. При анализе фракций, полученных с градиента, брали на анализ по 1 мкл всех фракций. ОТ-ПЦР анализ проводили с использованием набора реактивов «OneStep RT-PCR Kit» (Qiagen). В качестве ген-специфичных праймеров для анализа TLC1 РНК использовали P2 (5'-GTTTATTCTAGTTTTTCCG-3') и T8 (5'-CGAAGGCATTAGGAGAAG-3'). Продукты ОТ-ПЦР анализировали методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле в ТВЕ-буфере (89 мМ Tris, 89 мМ борной кислоты, 2 мМ ЭДТА, рН 8.3)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В состав активного теломеразного комплекса дрожжей входит биотинилированный белок.

Известно, что детектировать активную теломеразу непосредственно в дрожжевом экстракте, полученном при разрушении клеток дрожжей, не удастся. Это возможно только при обогащении теломеразного комплекса

или с помощью специфичного связывания на аффинном сорбенте компонентов комплекса (Est1p [25], Est2p [26], Est3p [10]), или с помощью обогащения всего комплекса с помощью анионообменной хроматографии [4, 22]. Мы обнаружили, что при связывании дрожжевого экстракта со стрептавидин-сефарозой на аффинном сорбенте детектируется активная теломераза (рис. 1а). Этот факт свидетельствует о том, что на аффинном сорбенте концентрируется теломераза, так как в исходном экстракте активности нет. Характер детектируемой активности такой

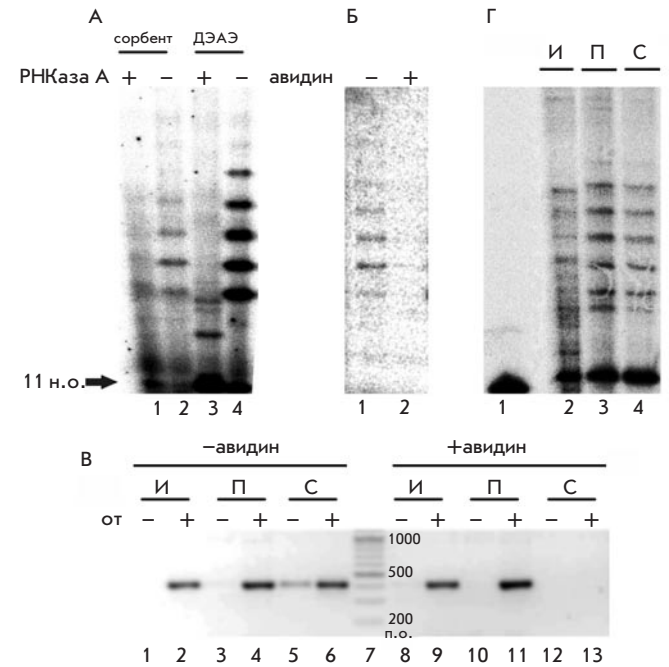


Рис. 1. Выделение теломеразы дрожжей с помощью хроматографии на стрептавидин-сефарозе: а – анализ активности теломеразы, выделенной на стрептавидин-сефарозе из экстракта, в реакции удлинения олигодезоксирибонуклеотида TEL11. РНКазы А(+), РНКазы А(-) – реакция с предварительной обработкой РНКазой А и без нее соответственно; 1, 2 – продукты удлинения TEL11 теломеразой, выделенной с помощью хроматографии на стрептавидин-сефарозе; 3, 4 – то же для теломеразы, выделенной с помощью хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе; б – то же, что и в а с добавлением авидина и без. Авидин(+), Авидин(-) – реакция с предварительной обработкой РНКазой А и без нее соответственно; 1, 2 – то же, что в позиции а (1, 2); в – ОТ-ПЦР анализ TLC1 РНК в образцах, полученных при выделении теломеразы на стрептавидин-сефарозе в присутствии авидина и без него. ОТ- и ОТ+ – ОТ-ПЦР анализ без реакции обратной транскрипции и с ней соответственно; 1, 2 – продукты ОТ-ПЦР при анализе исходного дрожжевого экстракта (И); 3, 4 – то же из несвязавшейся фракции (П) при связывании без добавления авидина; 5, 6 – то же из связавшейся фракции (С) при связывании без добавления авидина; 7 – маркер молекулярных масс; 8 – 13 – то же, что и 1 – 6 при связывании с добавлением авидина. г – анализ активности теломеразы, выделенной на стрептавидин-сефарозе из ДЭАЭ-фракции. 1 – 5'-[³²P]-фосфорилированный олигодезоксирибонуклеотид TEL11; 2 – продукты удлинения TEL11 теломеразой в исходной ДЭАЭ-фракции (И); 3 – то же в несвязавшейся фракции (П); 4 – то же в связавшейся фракции (С), взятой в четырехкратном избытке

же, как и активности теломеразы, выделенной с помощью анионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, т. е. теломераза добавляет лишь один теломерный повтор в реакции *in vitro* (рис. 1а).

Для проверки того, что наблюдаемое связывание со стрептавидин-сефарозой является результатом взаимодействия «биотин-стрептавидин» (константа диссоциации $K_d = 10^{-14}$ М [27]) мы провели связывание с предварительной обработкой экстракта авидином. Добавление авидина – стандартный прием для предотвращения связывания со стрептавидин-сефарозой биотинилированных белков из экстракта дрожжей [28], так как взаимодействие «биотин-авидин» (константа диссоциации $K_d = 10^{-15}$ М [29]) полностью блокирует взаимодействие «биотин-стрептавидин». Действительно, добавление авидина предотвращает связывание теломеразы с аффинным сорбентом (рис. 1б). Этот результат свидетельствует о специфичности взаимодействия. Связывание теломеразы на сорбенте и предотвращение этого связывания добавлением авидина также подтверждено для TLC1 РНК с помощью ОТ-ПЦР анализа (рис. 1в).

На следующем этапе было проведено связывание с аффинным сорбентом теломеразы, уже очищенной с помощью хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе. При этом мы обнаружили, что со стрептавидин-сефарозой действительно связывается активная теломераза, но лишь часть от ее общего количества (рис. 1г) Это может свидетельствовать о том, что биотинилированный белок в своем составе содержит лишь часть комплексов. Также нельзя исключить вероятности того, что при очистке на ДЭАЭ-целлюлозе часть активных теломеразных комплексов «теряет» биотинилированный компонент.

Биотинилированный белок-компонент теломеразы имеет массу около 50 кДа и входит в состав лишь части от общего количества активной теломеразы.

Мы провели фракционирование дрожжевого S100 экстракта, а также теломеразы, очищенной на ДЭАЭ-целлюлозе в градиенте масс с помощью ультрацентрифугирования. Центрифугирование обоих типов проб было проведено одновременно и в одинаковых условиях. Известно, что теломеразный комплекс дрожжей при ультрацентрифугировании ведет себя как частица 19S [30]. Мы протестировали полученные фракции на наличие TLC1 РНК, теломеразной активности, а также биотинилированных белков (рис. 2, рис. 3). На рис.2а и рис.2в показано распределение активной теломеразы по фракциям, а на рис. 2б и рис. 2г показано распределение по фракциям TLC1 РНК.

С помощью Вестерн-блоттинга мы детектировали биотинилированные белки в исходном дрожжевом экстракте (рис. 3а) и исходной ДЭАЭ-фракции (рис. 3б), а также распределение биотинилированных белков по фракциям после ультрацентрифугирования (рис. 3в и 3г).

В экстракте и обогащенной на ДЭАЭ-целлюлозе фракции детектируется три наиболее яркие полосы, соответствующие массам 47, 120 и 200 кДа (рис. 3а и 3б). Биотинилированных белков дрожжей известно немного: Asc1 (250 кДа [31]), Hfa1p (242 кДа [32]), Ryc1p (130 кДа [33]), Ryc2p (130 кДа [33]), Dur1,2p (202 кДа [34]) и Arc1p (42 кДа [35]). В целом, детектируемые нами полосы соотносятся с при-

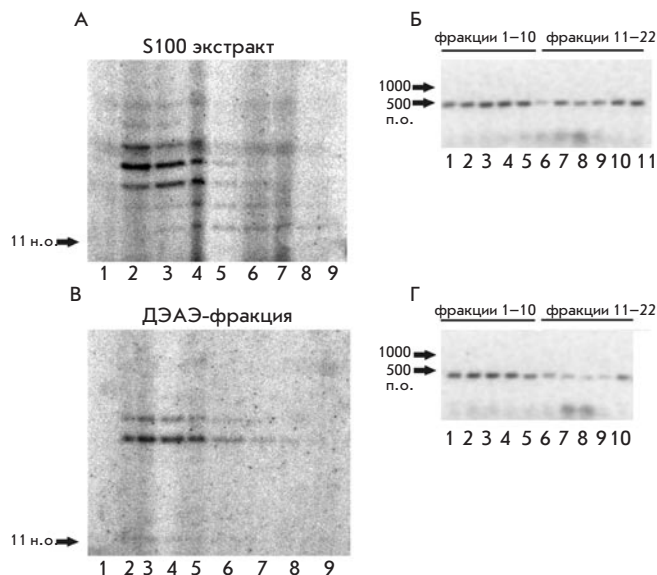


Рис. 2. Анализ фракций, полученных при ультрацентрифугировании в глицириновом градиенте (всего было получено 22 фракции с одного градиента): а – Анализ активности теломеразы во фракциях, полученных при ультрацентрифугировании S100 экстракта, в реакции удлинения олигодезоксирибонуклеотида TEL11; 1 – 9 – продукты удлинения TEL11 теломеразой во фракциях 1 – 9 соответственно; б – ОТ-ПЦР анализ TLC1 РНК во фракциях, полученных при ультрацентрифугировании S100 экстракта; 1 – 9 – продукты ОТ-ПЦР при анализе фракций 1 – 22 соответственно, по две соседние фракции в каждой позиции (1 – 1-я и 2-я фракции, 2 – 3-я и 4-я фракции и т.д.); в – то же, что и в позиции а для фракций, выделенных при ультрацентрифугировании ДЭАЭ-фракции; г – то же, что и в позиции б для фракций, выделенных при ультрацентрифугировании ДЭАЭ-фракции

веденными в литературе [35] и ожидаемыми в соответствии с массами известных белков.

В случае фракционирования обогащенной на ДЭАЭ-целлюлозе теломеразы видно, что вместе с комплексом комигрирует и обогащается биотинилированный белок с массой в районе 50 кДа. Это видно при сопоставлении рис. 2в и 3в. В случае фракционирования экстракта провести сопоставление наличия теломеразной активности в конкретной фракции с наличием биотинилированного белка не представляется возможным из-за того, что во всех фракциях на Вестерн-блоттинге детектируется серия полос, соответствующих всем возможным биотинилированным белкам, аналогичная серии полос в исходном экстракте (данные не показаны).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ВЫВОДЫ

Мы показали, что в состав теломеразного комплекса дрожжей входит биотинилированный белок. Однозначно установить, что это за белок и какова его функция, нам пока не удалось. Из-за малого количества теломеразы в клетке (примерно 29 молекул на клетку гаплоидных дрожжей [36]) и того, что не все теломеразные комплексы содержат

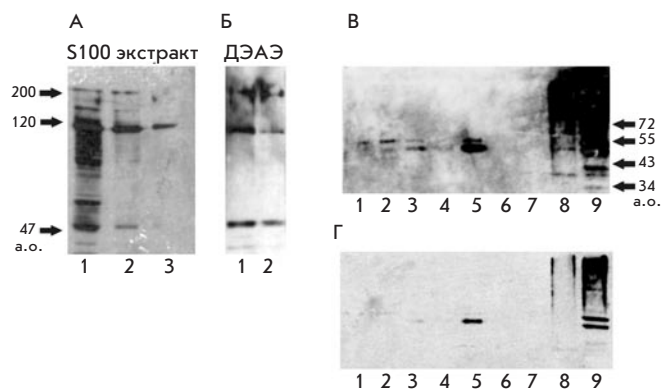


Рис. 3. вестерн-блоттинг анализ биотинилированных белков в исходных S100 экстракте, ДЭАЭ-фракции и фракциях, полученных при ультрацентрифугировании в глицириновом градиенте: а – вестерн-блоттинг анализ белков в исходном S100 экстракте; 1 – 3 – биотинилированные белки в раститровке экстракта в уменьшающихся количествах от позиции 1 к позиции 3; б – биотинилированные белки в ДЭАЭ-фракции; 1, 2 – биотинилированные белки в раститровке ДЭАЭ-фракции в уменьшающихся количествах от позиции 1 к позиции 2; в – Вестерн-блоттинг анализ белков во фракциях, полученных при ультрацентрифугировании ДЭАЭ-фракции; 1 – 8 – биотинилированные белки во фракциях 1 – 8 соответственно; 9 – биотинилированные белки в исходной ДЭАЭ-фракции; г – то же, что и в позиции в при короткой экспозиции на пленку

биотинилированный белок, наши попытки идентифицировать искомый белок с помощью MALDI-TOF спектрометрии не увенчались успехом. Также нужно отметить, что элюция белков, связанных на стрептавидин-сефарозе взаимодействием «биотин-стрептавидин», представляет собой отдельную задачу и не проходит количественно из-за прочности взаимодействия [37].

Из рис. 2в и 3в очевидно, что обнаруживаемый биотинилированный белок комигрирует с более легкими теломеразными комплексами. Из этих данных и того факта, что биотинилированный белок содержит менее половины активных теломеразных комплексов, выделенных на ДЭАЭ-целлюлозе (рис. 1г), можно сделать интересное предположение. Возможно, биотинилированный белок входит в состав не всех, а более легких теломеразных комплексов, например, еще находящихся в процессе созревания, но уже включающих в себя Est2p и TLC1 РНК, которые обеспечивают активность *in vitro*. Мы проверили это предположение для фракций, полученных при ультрацентрифугировании S100 экстракта. Две активные тяжелые фракции были объединены, две легкие так же были объединены. Далее было проведено связывание со стрептавидин-сефарозой. Действительно, активная теломераза из более тяжелых фракций не связывается на стрептавидин-сефарозе, тогда как из более легких фракций – связывается (рис. 4). Полученный результат также свидетельствует против гипотезы о том, что биотинилированный компонент «теряется» при очистке на ДЭАЭ-целлюлозе, так как и без очистки с помощью анионообменной хроматографии лишь часть теломеразных комплексов содержит биотинилированный белок.

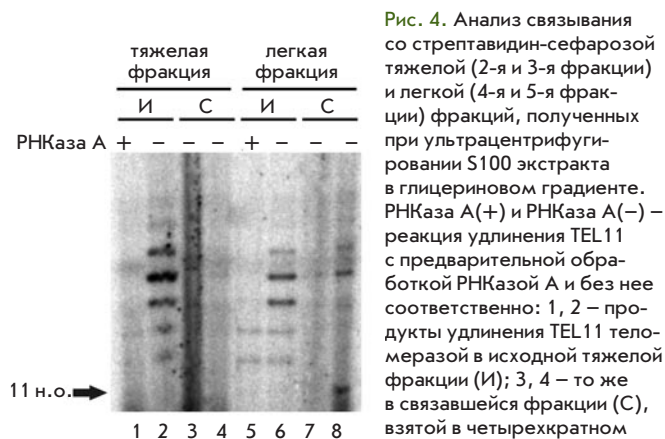


Рис. 4. Анализ связывания со стрептавидин-сефарозой тяжелой (2-я и 3-я фракции) и легкой (4-я и 5-я фракции) фракций, полученных при ультрацентрифугировании S100 экстракта в глицириновом градиенте. РНКазы А(+) и РНКазы А(-) – реакция удлинения ТЕL11 с предварительной обработкой РНКазой А и без нее соответственно: 1, 2 – продукты удлинения ТЕL11 теломеразой в исходной тяжелой фракции (И); 3, 4 – то же в связавшейся фракции (С), взятой в четырехкратном и десятикратном избытке, соответственно; 5 – 8 – то же, что и 1 – 4 для легкой фракции

Из полученных нами данных (молекулярная масса белка-кандидата составляет около 50 кДа) и сведений из литературы можно делать предположения о природе биотинилированного белка и его функции. Как было отмечено выше, биотинилированных белков дрожжей известно немного. Это три типа карбоксилаз, содержащих биотин в качестве кофактора: ацетил-КоА-карбоксилазы Acc1p (250 кДа [31]), Hfa1p (242 кДа [32]); пируват-карбоксилазы Puc1p (130 кДа [33]), Puc2p (130 кДа [33]); амидолиаза мочевины Dur1,2p (202 кДа [34]); а также белок Arg1p (42 кДа [35]), который является кофактором аминокил-тРНК-синтетаз [38]. Про белок Arg1p также известно, что он связывает G-квадруплексы ДНК [39]. Среди этих белков по молекулярной массе только Arg1p находится ближе других известных биотинилированных белков к найденному белку. Интересно, что Arg1p не содержит канонической последовательности для биотинилирования биотин-лигазой и биотинилирование не является важным для выполнения белком своих функций [35]. Как РНК-связывающий белок и белок, связывающий квадруплексы ДНК, Arg1p кажется вероятным кандидатом на роль биотинилированного компонента теломеразы. Возможно, что в состав теломеразы входит белок, для которого еще не показано биотинилирование, взаимодействующий, как и Arg1p, с биотин-лигазой Vpl1p и также не имеющий канонической последовательности для биотинилирования.

«Интересен вопрос о возможной функции биотинилированного компонента в теломеразном комплексе. Мы обнаружили, что только более легкая фракция теломеразных комплексов содержит в своем составе биотинилированный белок. Известно, что основными компонентами теломеразы, которые осуществляют реакцию удлинения теломерной ДНК, являются теломеразная обратная транскриптаза Est2p и теломеразная РНК TLC1, а остальные компоненты необходимы для регуляции, сборки, созревания и деградации комплекса [5]. Некоторые из них входят в состав теломеразы лишь временно, на определенной стадии клеточного цикла. Например, белки Est1p и Est3p, необходимые

для функционирования теломеразы *in vivo*, входят в состав комплекса только в поздней S/G2 фазе клеточного цикла [18]. Полученные нами результаты указывают на то, что биотинилированный белок не является постоянным ком-

понентом теломеразного комплекса, а входит в его состав временно, на определенном этапе сборки, регуляции или деградации теломеразы, и, возможно, принимает участие в этих процессах. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. de Lange T. 2002 *Oncogene*, 21, 532-40.
2. Greider C.W., Blackburn E.H. 1987 *Cell*, 51, 887-98.
3. Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., Harley C.B., West M.D., Ho P.L., Coviello G.M., Wright W.E., Weinrich S.L., Shay J.W. 1994 *Science*, 266, 2011-5.
4. Cohn M., Blackburn E.H. 1995 *Science*, 269, 396-400.
5. Cech T.R. 2004 *Cell*, 116, 273-9.
6. Collins K. 2006 *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 484-94.
7. Counter C.M., Meyerson M., Eaton E.N., Weinberg R.A. 1997 *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 9202-7.
8. Singer M.S., Gottschling D.E. 1994 *Science*, 266, 404-9.
9. Zhou J., Hidaka K., Futcher B. 2000 *Mol Cell Biol*, 20, 1947-55.
10. Hughes T.R., Evans S.K., Weilbaecher R.G., Lundblad V. 2000 *Curr Biol*, 10, 809-12.
11. Lendvay T.S., Morris D.K., Sah J., Balasubramanian B., Lundblad V. 1996 *Genetics*, 144, 1399-412.
12. Seto A.G., Zaug A.J., Sobel S.G., Wolin S.L., Cech T.R. 1999 *Nature*, 401, 177-80.
13. Peterson S.E., Stellwagen A.E., Diede S.J., Singer M.S., Haimberger Z.W., Johnson C.O., Tzoneva M., Gottschling D.E. 2001 *Nat Genet*, 27, 64-7.
14. Evans S.K., Lundblad V. 1999 *Science*, 286, 117-20.
15. Ungar L., Yosef N., Sela Y., Sharan R., Ruppin E., Kupiec M. 2009 *Nucleic Acids Res*, 37, 457-67.
16. Toogun O.A., Dezwaan D.C., Freeman B.C. 2008 *Mol Cell Biol*, 28, 457-67.
17. Fisher T.S., Taggart A.K., Zakian V.A. 2004 *Nat Struct Mol Biol*, 11, 1198-205.
18. Osterhage J.L., Talley J.M., Friedman K.L. 2006 *Nat Struct Mol Biol*, 13, 720-8.
19. Chang M., Arneric M., Lingner J. 2007 *Genes Dev*, 21, 2485-94.
20. Hector R.E., Shtofman R.L., Ray A., Chen B.R., Nyun T., Berkner K.L., Runge K.W. 2007 *Mol Cell*, 27, 851-8.
21. Sabourin M., Tuzon C.T., Zakian V.A. 2007 *Mol Cell*, 27, 550-61.
22. Lue N.F., Peng Y. 1998 *Nucleic Acids Res*, 26, 1487-94.
23. Laemmli U.K. 1970 *Nature*, 227, 680-5.
24. Hoja U., Wellein C., Greiner E., Schweizer E. 1998 *Eur J Biochem*, 254, 520-6.
25. Steiner B.R., Hidaka K., Futcher B. 1996 *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 2817-21.
26. Friedman K.L., Cech T.R. 1999 *Genes Dev*, 13, 2863-74.
27. Green N.M. 1990 *Methods Enzymol*, 184, 51-67.
28. Srisawat C., Engelke D.R. 2001 *Rna*, 7, 632-41.
29. Green N.M. 1963 *Biochem J*, 89, 585-91.
30. Lingner J., Hughes T.R., Shevchenko A., Mann M., Lundblad V., Cech T.R. 1997 *Science*, 276, 561-7.
31. Hasslacher M., Ivessa A.S., Paltauf F., Kohlwein S.D. 1993 *J Biol Chem*, 268, 10946-52.
32. Hoja U., Marthol S., Hofmann J., Stegner S., Schulz R., Meier S., Greiner E., Schweizer E. 2004 *J Biol Chem*, 279, 21779-86.
33. Brewster N.K., Val D.L., Walker M.E., Wallace J.C. 1994 *Arch Biochem Biophys*, 311, 62-71.
34. Genbauffe F.S., Cooper T.G. 1991 *DNA Seq*, 2, 19-32.
35. Kim H.S., Hoja U., Stolz J., Sauer G., Schweizer E. 2004 *J Biol Chem*, 279, 42445-52.
36. Mozdy A.D., Cech T.R. 2006 *Rna*, 12, 1721-37.
37. Rybak J.N., Scheurer S.B., Neri D., Elia G. 2004 *Proteomics*, 4, 2296-9.
38. Simos G., Segref A., Fasiolo F., Hellmuth K., Shevchenko A., Mann M., Hurt E.C. 1996 *Embo J*, 15, 5437-48.
39. Frantz J.D., Gilbert W. 1995 *J Biol Chem*, 270, 20692-7.