

УДК 500-599.57.088

Рекомбинантная форма TERT *Hansenula polymorpha* обладает ограниченной обратнотранскриптазной активностью

Е. М. Смекалова*, О. А. Петрова, М. Э. Зверева, О. А. Донцова

Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

*E-mail: esmekalova@yahoo.com

Поступила в редакцию 09.12.2011 г.

РЕФЕРАТ Теломераза – рибонуклеопротеидный комплекс, функция которого состоит в синтезе теломер, повторяющихся последовательностей, локализованных на концах эукариотических хромосом. Теломераза поддерживает стабильность генома эукариотических клеток за счет репликации концов хромосом. Структурно-функциональные исследования теломеразного комплекса существенно затрудняет сложность получения основной каталитической субъединицы теломеразы в рекомбинантной форме. В представленном сообщении описан метод выделения теломеразной обратной транскриптазы термотолерантных дрожжей *Hansenula polymorpha*, экспрессированной в клетках *Escherichia coli*. Функциональный тест на субстрате, моделирующем взаимодействие теломеразной РНК и теломеры, показывает, что полученный белок обладает ограниченной обратнотранскриптазной активностью.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА теломеразная обратная транскриптаза, рекомбинантные белки, термотолерантные дрожжи *Hansenula polymorpha*.

ВВЕДЕНИЕ

Теломераза представляет собой рибонуклеопротеидный комплекс, функция которого состоит в синтезе теломер – расположенных на концах хромосом повторяющихся последовательностей, неспособных реплицироваться с помощью механизма классической репликации. Теломераза активна в клетках, способных к неограниченному делению, таких, как половые и стволовые клетки, а также в большинстве (85%) типов злокачественных опухолей. Предполагается, что ингибирование каталитической функции теломеразы приведет к прекращению поддержания длины теломер, что отменит безграничный репликативный потенциал опухолевых клеток. Все это позволяет считать теломеразу универсальной мишенью для создаваемых противоопухолевых средств [1]. Основные компоненты теломеразы – белок, теломеразная обратная транскриптаза (TERT) и теломеразная РНК, по матрице которой осуществляется синтез теломерной последовательности [2]. Одна из главных трудностей, с которой сталкиваются при изучении теломеразы, состоит в низкой стабильности ее каталитической субъединицы, выделяемой в рекомбинантной форме [3]. Отсутствие данных о структуре теломеразы не позволяет провести докинг известных веществ с целью поиска потенциальных эффекторов этого фермента, а невозможность выделения полно-

размерной функциональной теломеразной обратной транскриптазы препятствует тестированию взаимодействий фармакологических агентов с мишенью. Единственная полноразмерная теломеразная обратная транскриптаза, которую к настоящему времени удалось выделить и закристаллизовать, это TERT *Tribolium castaneum* [4]. Отличительная особенность этого белка состоит в отсутствии N-концевого домена, характерного для других теломеразных обратных транскриптаз. Получены данные о структуре N-концевого домена теломеразной каталитической субъединицы *Tetrahymena thermophila* и ее РНК-связывающего домена [2, 5].

Использование термофильных организмов часто более перспективно для структурно-функционального изучения белков, так как они имеют более компактную пространственную организацию, что способствует стабилизации в растворе. Ранее мы идентифицировали теломеразную обратную транскриптазу термотолерантных дрожжей *Hansenula polymorpha* (hpTERT) и впервые показали, что hpTERT можно экспрессировать в клетках *Escherichia coli* и выделить рекомбинантный белок [6]. Нами разработан метод эффективного выделения hpTERT *H. polymorpha*, экспрессированного в *E. coli*. Мы использовали экспрессионные конструкции, позволяющие получить каталитическую субъединицу

теломеразы с различными аффинными метками либо на N-, либо на C-конце белка. Показано, что оптимальным для экспрессии и выделения hrTERT является вектор рЕТ30aTEV, в котором открытая рамка считывания кодирует hrTERT с 6His- и S-тагами с N-конца. Мы провели тест, который подтвердил наличие обратнотранскриптазной активности у полученного белка, что доказывает его пригодность для функциональных и структурных исследований. Мы считаем, что данное сообщение будет полезно не только исследователям теломеразы, но и всем, кто сталкивался с проблемой получения рекомбинантных белков, нестабильных в растворимой форме.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клонирование гена hrTERT в различные экспрессионные системы

Ген hrTERT клонировали с использованием следующих праймеров: 1) BamH1a/E2 – 5'-aagatccaaggttgatcagatggtgatga-3', и E2/Pst1/Rev – 5'-tttctgcagttagaatgctttaagaagcga-3' – для получения плазмиды рCDF, где hrTERT слит с 6His-тагом с N-конца; 2) Nco1E2Fwd – 5'-aaaaccatgggaaggttgatcagatggtgat-3', и E2Sal1Rev – 5'-ttttgtcgac gaatgctttaagaagcgaac-3' – для получения рЕТ33b+, где hrTERT слит с 6His-тагом с C-конца; 3) HpET30F – 5'-gacggagctcgaattttattagaatgctttaagaagcgaac-3', и HpET30S – 5'-gtattttcagggcgccatgaggttgatcagatggtgat-3' – для получения плазмиды рЕТ30aTEV, где hrTERT слит с 6His- и S-тагами с N-конца. Плазмида рЕТ30aTEV любезно предоставлена Даниелой Родэс (Кембридж, MRC LMB, Великобритания). Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer.

Выделение и очистка рекомбинантного hrTERT

Клетки *E. coli* штамма BL21DE3, трансформированного плазмидой рCDF_hrTERT, либо рЕТ33b_hrTERT, либо рЕТ30_hrTERT, растили при 37°C до оптической плотности 0.1–0.3 (OD_{600}), после чего индуцировали экспрессию белка 0.1 мМ изопропилтио-β-D-галактозидом (IPTG) и инкубировали при перемешивании в течение 12–16 ч при 16°C. Клетки собирали центрифугированием при 5000 об/мин и замораживали в жидком азоте, разрушали с помощью дисембратора (2000 об/мин, 2 раза по 30 с), что способствовало меньшей денатурации белка в процессе выделения. Разрушенные клетки ресуспендировали в буфере А: 50 мМ NaH₂PO₄ (рН 7), 200 мМ NaCl, 10% глицерин, 10 мМ β-меркаптоэтанол, 0.05% Твин-20. Клеточный де-

брис отделяли с помощью центрифугирования при 15000 об/мин в течение 20 мин. Затем инкубировали клеточный лизат с Ni-NTA-агарозой в течение 30 мин при 4°C, аффинный сорбент отделяли от несвязавшейся фракции белков центрифугированием при 3000 об/мин с последующим декантированием супернатанта. Ni-NTA-агарозу промывали трижды буфером А, содержащим 50 мМ имидазол. Белок hrTERT, связавшийся с аффинным сорбентом, элюировали буфером А с 300 мМ имидазолом.

При проведении дополнительной очистки с помощью ионообменной хроматографии на SP-сефарозе препарат, полученный на предыдущем этапе, разбавляли до суммарной концентрации солей 150 мМ, добавляли предварительно уравновешенную в буфере В (50 мМ NaH₂PO₄ (рН 7), 100 мМ NaCl, 10% глицерин, 10 мМ β-меркаптоэтанол, 0.05% Твин-20) SP-сефарозу (~1 мл на 5 мл лизата) и инкубировали смесь в течение 30 мин при 4°C. Затем промывали буфером, содержащим 50 мМ NaH₂PO₄, 200 мМ NaCl, 10% глицерин, 10 мМ β-меркаптоэтанол, 0.05% Твин-20. Связавшуюся фракцию белков смывали градиентом концентрации NaCl (0.1–1 М) в аналогичном буфере. В полученный образец добавляли глицерин (до 30%), замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C.

Проверка функциональности очищенного hrTERT в системе *in vitro*

Тест на функциональность hrTERT проводили в системе, содержащей 50 мМ Трис-HCl, 1 мМ DTT (дителиотреитол), 1 мМ спермидин, 50 мкМ dCTP, 5 мкМ субстрат (использовали РНК-олигонуклеотид 5'-cgcccccacc-3', ДНК-олигонуклеотиды 5'-cgccacc-3', 5'-ggcggcggggtg-3'), 3.75 мкМ [α -³²P]-dGTP (800 Ки/ммоль), 5 мкМ hrTERT. Дуплексы (ДНК-ДНК либо ДНК-РНК) формировали предварительно отжигом соответствующих олигонуклеотидов. Реакция продолжалась в течение 30 мин при 37°C, после чего смесь обрабатывали протеиназой К (0.3 мг/мл) и переосаждали в спирте. Продукты реакции разделяли с помощью гель-электрофореза в 15% денатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ). Радиоактивный сигнал детектировали с помощью системы Phosphorimager.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ген белка hrTERT клонировали под T7-промотор в три различные системы экспрессии с целью последующего выделения белка из клеток *E. coli*: 1) рCDF с 6His-тагом на N-конце белка hrTERT, 2) рЕТ33b+ с 6His-тагом на C-конце белка hrTERT, 3) рЕТ30aTEV с 6His- и S-тагами на N-конце белка hrTERT. Подобное расположение тагов с разных сто-

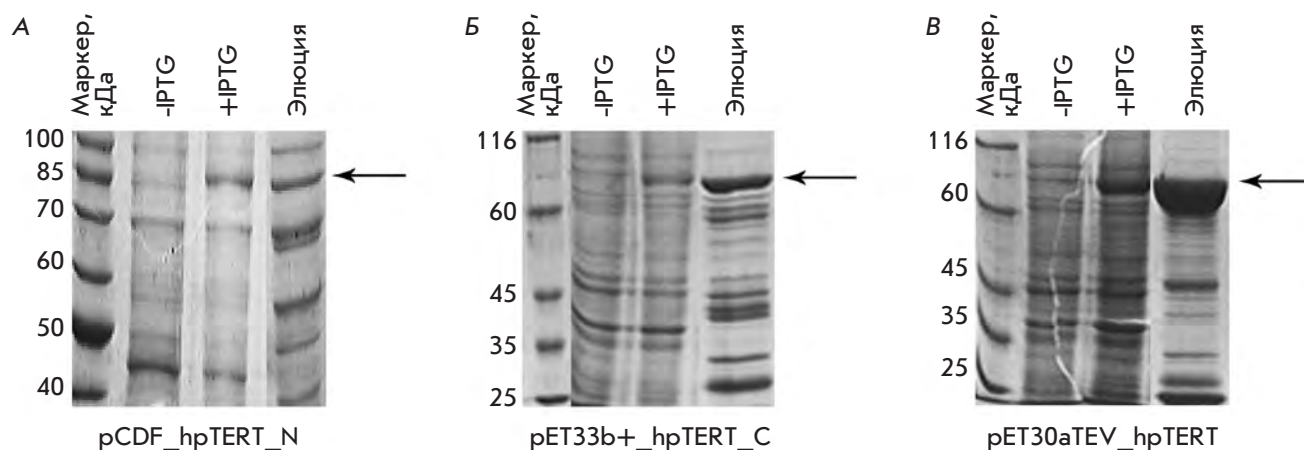


Рис. 1. Результаты экспрессии и аффинного выделения рекомбинантной теломеразной обратной транскриптазы *H. polymorpha* из клеток *E. coli*, трансформированных различными генно-инженерными конструкциями. А – hTERT в векторе pCDF с 6His-тагом на N-конце белка; Б – hTERT в векторе pET33b+ с 6His-тагом на С-конце белка; В – hTERT в векторе pET30aTEV с 6His- и S-тагами на N-конце белка. Образцы клеток до и после индукции экспрессии IPTG, а также образец элюции hTERT с Ni-NTA-агарозы проанализировали методом электрофореза в 10% ПААГ в денатурирующих условиях. Положение зоны, соответствующей hTERT, отмечено стрелкой.

рон белка обусловлено возможностью сворачивания концов аминокислотной цепи внутрь белковой глобулы, с чем может быть связано снижение эффективности аффинной хроматографии. S-таг представляет собой небольшую последовательность (4 кДа), которая может использоваться для стабилизации белков в растворе. Экспрессию белков индуцировали IPTG, белки очищали с помощью металл-хелатной хроматографии на Ni-NTA-агарозе. Результаты выделения белков, экспрессированных с использованием различных конструкций, представлены на рис. 1. hTERT детектируется во всех образцах, элюированных с Ni-NTA-агарозы. Это говорит об успехе выбора термотолерантных дрожжей в качестве источника каталитической субъединицы теломеразы. Однако при использовании векторов pCDF и pET33b+ и при расположении тага как с N-, так и с С-конца (рис. 1А,Б), вместе с целевым белком на смоле выделяется значительное количество примесей. Нужно отметить, что соотношение целевой белок-примеси лучше при использовании конструкции pET33b+ с 6His-тагом на С-конце белка, что, скорее всего, отражает закрытую ориентацию N-концевой области hTERT. Выделение белка с использованием S-тага (конструкция pET30aTEV) дает принципиально лучший результат (рис. 1В). Очевидно, что хорошо структурированный небольшой N-концевой S-таг значительно повышает стабильность растворимой формы белка. Белок был выделен и дополнительно очищен с помощью ионообменной хроматографии на SP-сефарозе (рис. 2). Конечные характеристики полученного белкового препарата – концентрация 5

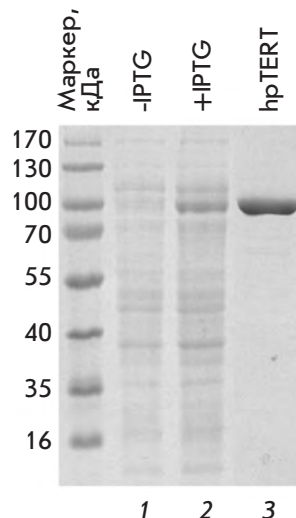


Рис. 2. Экспрессия, выделение и очистка рекомбинантной hTERT, полученной из клеток *E. coli*, трансформированных вектором pET30aTEV_hpTERT. Дорожки 1 и 2 – белки суммарных клеточных лизатов *E. coli* до и после индукции IPTG. Образец в дорожке «hTERT» соответствует белковому препарату, полученному с помощью дополнительной очистки посредством аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе и ионообменной хроматографии на SP-сефарозе. Анализ проводили методом электрофореза в 10% ПААГ в денатурирующих условиях.

мг/мл, выход – 5 мг/л клеточной культуры *E. coli*, содержание примесей не более 1%.

Функциональность полученного белка мы подтвердили с помощью сконструированной нами *in vitro*-системы. Теломеры *H. polymorpha* состоят из 18–23 повторов (5'-GGGTGGCG-3') [7]. На основании этих данных можно предположить состав матричного участка теломеразной РНК и смоделировать ДНК-олигонуклеотид, представляющий теломеру. Таким образом, система содержала очищенную рекомбинантную каталитическую субъединицу теломеразы; субстрат, представляющий собой гибридный

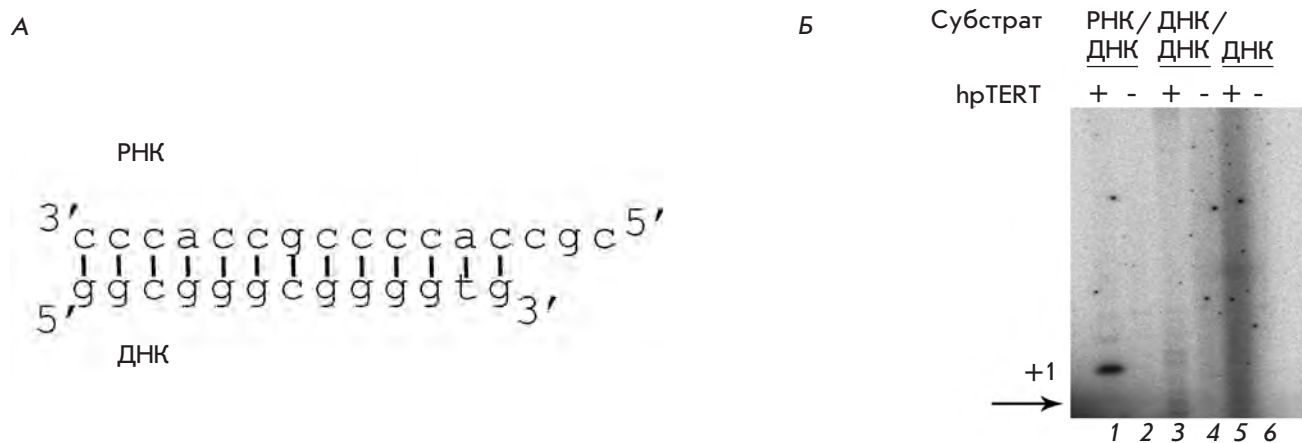


Рис. 3. Проверка функциональной активности hrTERT, выделенной из клеток *E. coli*, трансформированных вектором pET30aTEV_hrTERT. А – Схема РНК-ДНК-дуплекса, используемого в качестве субстрата для hrTERT в реакции обратной транскрипции; Б – продукты реакции с участием hrTERT (добавление белка в реакционную смесь обозначено «+», те же компоненты без добавления белка обозначены «-» над рисунком) и различных субстратов (тип субстрата указан над рисунком) проанализированы методом электрофореза в 15% ПААГ в денатурирующих условиях. Для визуализации продуктов удлинения ДНК-олигонуклеотида в реакционной смеси присутствует $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dGTP}$. Зона, соответствующая по подвижности исходному ДНК-олигонуклеотиду, отмечена стрелкой. Отсутствие явных продуктов удлинения ДНК-олигонуклеотида во всех дорожках, кроме первой, свидетельствует о получении активной hrTERT в растворимой форме.

РНК-ДНК-дуплекс со свободным 3'-концом (рис. 3А); смесь нуклеотидов, в которой для визуализации удлинения олигонуклеотида использовали $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dGTP}$. В качестве контроля использовали аналогичный ДНК-ДНК-дуплекс либо одноцепочечную теломеразную ДНК. Поскольку каталитическая субъединица теломеразы является обратной транскриптазой, такие субстраты не могут использоваться hrTERT для удлинения. Кроме того, каждую реакцию проводили в присутствии и в отсутствие hrTERT (рис. 3Б). На дорожке 1 (рис. 3Б) можно наблюдать специфичный сигнал, соответствующий присоединению dGTP к ДНК-олигонуклеотиду в РНК-ДНК-дуплексе. Эта зона отсутствует в системах с другими субстратами и в отсутствие белка, что исключает участие полимераз *E. coli* в данной реакции. ДНК-РНК-дуплекс, используемый в реакции, спланирован таким образом, что теоретически в этой системе возможно присоединение трех нуклеотидов. Сигналы, соответствующие присоединению второго и третьего нуклеотидов, можно также видеть на дорожке 1 рис. 3Б, однако их интенсивность намного ниже. Скорее всего, это связано с отсутствием в системе полноразмерной теломеразной РНК, необходимой для реконструкции теломеразной активности *in vitro*. Тем не менее присоединение даже одного нуклеотида говорит о наличии у белка специфичной обратнотранскриптазной активности и о сохранении им функциональной структуры.

Таким образом, конструкция pET30aTEV с hrTERT, где 6His- и S-аффинные таги расположены

с N-конца белка, может быть использована для получения рекомбинантной функциональной каталитической субъединицы теломеразы *H. polymorpha*. Это открывает новые возможности для определения структуры теломеразной обратной транскриптазы и изучения механизма ее работы. ●

Мы благодарим Даниелу Родэс (MRC LMB, Кембридж, Великобритания) за предоставленную плазмиду pET30aTEV.

Работа поддержана Министерством образования и науки РФ (Р1390 № 02.740.11.07.06, 16.512.11.2108) и Российским фондом фундаментальных исследований (гранты № 11-04-01310-а и 11-04-12051-ofi-m-2011, ПНР 5.13).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zvereva M.I., Shcherbakova D.M., Dontsova O.A. // *Biochemistry (Mosc.)*. 2010. V. 75. № 75. P. 1563–1583.
- Wyatt H.D., West S.C., Beattie T.L. // *Nucl. Acids Res.* 2010. V. 17. № 38. P. 5609–5622.
- Jacobs S.A., Podell E.R., Wuttke D.S., Cech T.R. // *Protein Sci.* 2005. V. 8. № 14. P. 2051–2058.
- Gillis A.J., Schuller A.P., Skordalakes E. // *Nature*. 2008. V. 7213. № 455. P. 633–637.
- Jacobs S.A., Podell E.R., Cech T.R. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2006. V. 3. № 13. P. 218–225.
- Smekalova E.M., Petrova O.A., Zvereva M.I., Dontsova O.A. // *CSHL meeting «Telomeres&telomerase»*. 2009. P. 161.
- Sohn J.H., Choi E.S., Kang H.A., Rhee J.S., Rhee S.K. // *J. Bacteriol.* 1999. V. 3. № 181. P. 1005–1013.