

УДК 577.29 И 615.07

## РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ТЕСТИРОВАНИЯ НАЛИЧИЯ НЕТЕЛОМЕРНОГО НУКЛЕОТИДА НА 3'-КОНЦЕ ХРОМОСОМ

А.Н. Малявко, О.А. Петрова\*, М.Э. Зверева, О.А. Донцова

(кафедра химии природных соединений; e-mail: zvereva@genebee.msu.ru)

Число теломерных повторов в составе теломер взаимосвязано с пролиферативным потенциалом эукариотической клетки. Процесс удлинения теломер осуществляется теломеразой и регулируется многочисленными способами. Один из них основан на присоединении на 3'-конец хромосомы дополнительного, не входящего в последовательность теломерного повтора нуклеотида. В работе предложен способ тестирования наличия дополнительного нуклеотида на конце G-цепи линейных хромосом. Показана применимость этого метода на примере термотолерантных дрожжей *H. polymorpha*. Обсуждается возможность модификации метода для тестирования дополнительного нуклеотида на 3'-конец хромосом у других организмов.

**Ключевые слова:** теломераза, теломеры, *H. polymorpha*, 3'-конец хромосомы, тестирование концевых нуклеотидов, регуляция длины теломер.

Теломераза – сложный РНК-белковый комплекс, синтезирующий на 3'-конец хромосомы повторяющиеся последовательности ДНК, которые входят в состав теломер. Длина теломер взаимосвязана с пролиферативным потенциалом клетки, а ингибиторы, нарушающие систему поддержания длины теломер, рассматривают как основу для разработки противоопухолевых препаратов. Процесс удлинения теломер теломеразой регулируется разными способами [1]. Более 15 лет назад в статье одного из Нобелевских лауреатов по медицине, получившего премию за исследование теломер и теломеразы, был предложен способ регулирования работы теломеразы за счет добавления нетеломерного нуклеотида на 3'-конец хромосомы [2]. Существование такого способа регуляции было показано нами на дрожжах – модельном организме для изучения работы теломеразы. Оказалось, что добавление нетеломерного нуклеотида на 3'-конец теломеры дрожжей *Hansenula polymorpha* препятствует ее узнаванию теломеразой и синтезу нового теломерного повтора [3]. Присутствие такого нуклеотида на 3'-конец теломер *in vivo* свидетельствует о направленном секвенировании хромосомных концов. Последовательности теломер, полученные в результате обычного полного геномного секвенирования генома *H. polymorpha*, не содержали концевых теломерных повторов [4]. Для направленного секвенирования хромосомных концов применяли следующий подход. Первый этап – получение фрагментов, содержащих теломерные последовательности

*H. polymorpha* с помощью «теломерного» метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). «Теломерный» ПЦР проводили по методике, успешно применявшейся ранее для получения последовательностей теломер в других организмах [5]. Второй этап – это высокопроизводительное секвенирование полученных фрагментов. Это дорогостоящий метод, который не может быть использован на постоянной основе, поэтому задачей стала разработка простой системы тестирования добавления нетеломерного основания на 3'-конец последнего теломерного повтора G-цепи хромосомы.

### Методы исследования

#### Штаммы дрожжей и работа с ними

В работе использовали штамм дрожжей *H. polymorpha* DL1-1 (DL-1 (ATCC 26012) leu2) и штамм  $\Delta est3$  (DL-1 (ATCC 26012) leu2 HpTER:HpLEU2). Штаммы культивировали в жидкой среде YPD (1%-й дрожжевой экстракт, 2%-й пептон, 2%-я глюкоза), проводили перемешивание при 200 об/мин и температуре (37 или 47°C). Культивацию в течение нескольких поколений осуществляли путем последовательных разбавлений в жидкой среде. Число поколений определяли спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность при 600 нм (первому поколению соответствует увеличение  $OD_{600}$  в 2 раза). В случае удаления гена *est3* белка теломеразного комплекса запускается укорочение теломер, и клетки делятся ограниченное число раз, а значит необходимо проводить

\*Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова.

получение этого штамма при каждом эксперименте. Штамм получали путем замены гена на хромосоме на ген лейцинового маркера с помощью рекомбинации после трансформации соответствующим ДНК фрагментом, как это описано ранее для штаммов с делецией гена теломеразной РНК [3].

### Определение содержания дополнительного dT на концах теломер

«Теломерный» ПЦР проводили, как описано ранее [3]. Продукты ПЦР очищали с помощью набора «PCR purification kit» («Thermo Scientific»), четвертую часть очищенных продуктов разделяли в 2%-м агарозном геле, остальную обрабатывали эндонуклеазой рестрикции BsiWI («Thermo Scientific») и разделяли в 15%-м полиакриламидном геле. Для визуализации ДНК в геле использовали УФ-камеру «Chemidoc» («Bio-Rad»), интенсивность полос определяли с помощью программного обеспечения ImageLab Software v2.0 («Bio-Rad»). Значения массы определяемых фрагментов получали, сравнивая интенсивность полос с ДНК-маркером. Относительное содержание дополнительного нуклеотида ( $x$ ) определяли по формуле

$$x = m(25)/25 \cdot m(\text{pcr})/l(\text{pcr}),$$

где  $m(25)$  – масса фрагмента ДНК длиной 25 п.о., а  $m(\text{pcr})$  и  $l(\text{pcr})$  – масса и длина ПЦР продукта соответственно.

### Результаты и обсуждение

Для разработки системы детекции выбраны термотолерантные дрожжи, для которых показано существование «нетеломерного» нуклеотида, т.е. нуклеотида, не входящего в последовательность теломерного повтора, на 3'-конце последнего теломерного повтора G-цепи хромосомы. Теломераза *H. polymorpha* использует для синтеза концевого теломерного повтора дополнительный нуклеотид A170, расположенный непосредственно с 5'-конца матричного участка теломеразной РНК, и эффективность этого процесса очень высока. Последовательность нуклеотидов, получаемая в результате работы теломеразы при синтезе одного повтора *in vitro*, выглядит как 5'-GGGTGGCGT-3', в то время как *in vivo* за паттерном 5'-GGGTGGCG-3' всегда следует «G», за исключением только концевого повтора, который содержит «нетеломерный» dT на самом конце, и в результате конечной повтор выглядит как 5'-GGGTGGCGT-3'. Из этого следует, что необходимо дискриминировать последовательности 5'-GGGTGGCGT-3' и 5'-GGGTGGCG-3' на конце хромосом экспериментальным методом. Мы предложили использовать для этого способность эндонуклеаз рестрикции узнавать специфич-

ескую последовательность ДНК, которая восстанавливалась бы при наличии дополнительного, «нетеломерного» нуклеотида. Для этого был выбран следующий подход: к концу теломеры присоединяли лигированием последовательность 5'-ACGATCTACAGTGAGTCGTTTCGC-3' в составе адаптерного дуплекса, вторая цепь которого биотинилирована. При этом только в случае наличия dT на самом конце теломерного повтора термотолерантных дрожжей (5'-GGGTGGCGT-3') происходит восстановление сайта узнавания эндонуклеазой рестрикции BsiWI, у которой сайт узнавания 5'-CGTACG-3'. После этого проводили «теломерный» ПЦР для амплификации конца хромосомы с праймерами к адаптеру и к уникальной субтеломерной области хромосомы с последующей обработкой полученного фрагмента эндонуклеазой рестрикции BsiWI. Полученные фрагменты анализировали в полиакриламидном геле. При появлении полосы, соответствующей отщеплению концевого фрагмента и составляющей по длине 25 пар оснований, можно говорить о наличии дополнительного нуклеотида на конце хромосомы. Для подтверждения адекватности описанного подхода его применили для оценки числа dT на концах теломер в двух крайних случаях: 1) наличие дополнительного нуклеотида соответствует 90% (в штаммах дикого типа по данным [3]), 2) наличие штамма с удаленным геном одной из субъединиц теломеразного комплекса – белка Est3, при удалении гена которого наблюдается фенотип укороченных теломер [6]. В штамме  $\Delta\text{est3}$  dT на концах G-цепи теломер должен отсутствовать (поскольку теломераза неактивна, происходит укорочение теломер с каждым раундом деления клетки, и добавления dT происходить не может). Результаты анализа представлены на рис. 1. Видно, что при обработке ПЦР продукта теломер штамма дикого типа эндонуклеазой рестрикции BsiWI происходит отщепление двуцепочечного фрагмента длиной 25 пар оснований, тогда как в случае теломер штамма  $\Delta\text{est3}$  такого продукта разрезания не наблюдается. Таким образом, данный подход пригоден для определения dT нуклеотида на 3'-конце хромосом дрожжей *H. polymorpha*.

На следующем этапе необходимо было определить, можно ли с помощью предложенного метода проводить количественную оценку наличия нетеломерного основания на конце хромосомы. Для этого надо рассмотреть природную систему, в которой теломеры удлиняются. При анализе паттернов транскрипции теломерных и теломеразных генов в процессе теплового шока у термотолерантных дрожжей установлено уменьшение количества мРНК каталитической субъединицы теломеразы, что при-

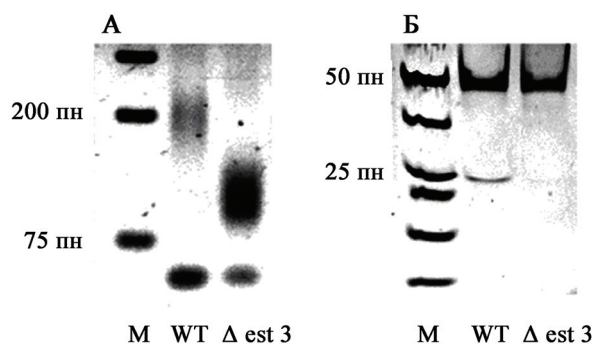


Рис. 1. А – продукты теломерного ПЦР, разделенные в полиакриламидном геле, с использованием в качестве матрицы геномной ДНК, выделенной из клеток дикого типа (WT) и клеток штамма  $\Delta est 3$ ; Б – те же продукты теломерного ПЦР после обработки эндонуклеазой рестрикции BsiWI, разделенные в полиакриламидном геле

водит к укорочению теломер при культивировании этих дрожжей при повышенной температуре [7]. Мы выбрали эту систему, чтобы определить, можно ли использовать этот метод для количественной оценки наличия нетеломерного основания на конце хромосомы, а также ответить на вопрос, добавляется ли нетеломерное основание на конец хромосомы постоянно или только в случае длинных теломер. Клетки штамма дикого типа культивировали при высокой температуре (47°C) на протяжении ~50 поколений. При таком культивировании теломеры укорачиваются приблизительно в 2 раза. Затем клетки с укороченными теломерами культивировали при обычной температуре (37°C) в течение дополнительных 60 поколений, при этом длина теломер восстанавливалась. Через каждые 8 поколений из клеток выделяли геномную ДНК и измеряли содержание дополнительного dT на концах теломер описанным выше методом. Относительное количество dT определяли как отношение количества продукта разрезания BsiWI к количеству исходного ПЦР продукта. На рис. 2 представлены результаты данного эксперимента. Каждый эксперимент был независимо проведен три раза. На основании полученных данных определена ошибка эксперимента, проиллюстрированная на рис. 2 для каждой точки. Видно, что содержание dT не отличается для каждой из точек в пределах ошибки измерения. Величина ошибки позволяет говорить о том, что разработанный метод не может служить для количественного определения. Однако, принимая во внимание данные рис. 1, можно утверждать, что метод применим для качественной оценки процесса.

Этот факт становится актуальным в свете последних данных по оценке содержания изменений в последовательности теломерного повтора в клетках человека, полученных с помощью полногеном-

ного секвенирования панели штаммов смертных клеток и бессмертных клеточных линий. При этом был найден широкий спектр вариантов теломерных повторов. В случае удлинения теломер за счет работы теломеразы основное отличие от канонической последовательности теломер наблюдалось в положениях 1 и 3 (но не в положениях 2, 4, 5, 6) теломерного повтора. В работе [8] предложена консервативная роль для обнаруженных вариантов последовательности теломер в клетках человека, а одним из возможных объяснений появления таких вариантов названо прочтение теломеразной обратной транскриптазой далее за известную матричную часть теломеразной РНК при синтезе теломерного повтора аналогично механизму, найденному в термотолерантных дрожжах [3]. Предложенный нами подход может быть использован для определения участия дополнительного нуклеотида на конце G-цепи в регуляции работы теломеразы человека в различных типах клеточных линий. Альтернативным (более сложным по сравнению с предложенным нами) методом ранее показано одинаковое предпочтение в последовательности концевой G-цепи хромосом человека для GGTTAG-3', GGGTTA-3' и AGGGTT-3'. Изменение в распределении последовательностей концевой повтора G-цепи происходит при дополнительной экспрессии теломеразы. Так, предпочтительной становится концевая последовательность GGTTAG -3' [9]. Этот факт объясняют паузой в работе теломеразы человека [10]. Добавление «нетеломерного» нуклеотида также должно приводить к паузе и диссоциации теломеразы с теломер. К сожалению, детальное рассмотрение использованного в работе [11] метода позволяет утверждать, что повтор с дополнительным нуклеотидом на конце исключался из рассмотрения в силу особенностей этого метода. Однако сам факт высокой гомогенности конца C-цепи и гетерогенность конца G-цепи ДНК теломер человека, позволяющая говорить о возможности существования регуляции длины тело-

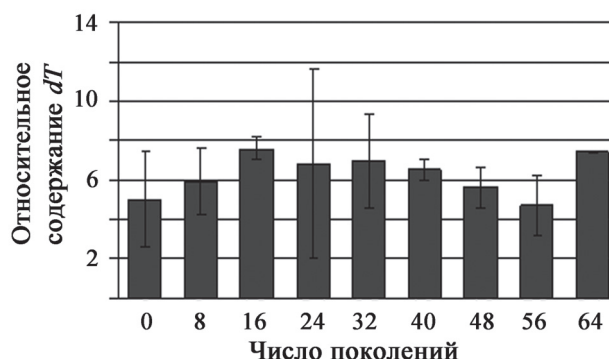


Рис. 2. Содержание дополнительного dT на теломерах *H. polymorpha* при культивации клеток после теплового шока

мер человека добавлением «нетеломерного» нуклеотида на 3'-конец хромосомы.

Таким образом, хотя разработанный нами метод и не позволяет проводить достоверную количественную оценку наличия нетеломерного основания на конце хромосом, он применим на качественном уровне. Это является необходимым этапом в процессе исследования факторов, влияющих на регуляцию длины теломер включением нетеломерно-

го нуклеотида на конец хромосомы у *H. polymorpha*. С помощью разработанного метода можно искать природные и искусственно созданные эффекторы этого пути регуляции. Например, низкомолекулярные соединения, которые будут приводить к укорочению теломер, влияя на этот путь, будут представлять собой альтернативу ингибиторам теломеразы, которые рассматривают как новую основу для создания противоопухолевых соединений [1].

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда по проекту 14-24-00061

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zvereva M.I., Shcherbakova D.M., Dontsova O.A. // *Biochemistry*. 2010. Vol. 75. N 13. P. 1563.
2. Collins K., Greider C.W. // *Genes Dev*. 1993. Vol. 7. P. 1364.
3. Smekalova E.M. et al. // *RNA*. 2013. Vol. 19. N 11. P. 1563.
4. Ravin N.V. et al. // *BMC Genomics*. 2013. Vol. 14. P. 837.
5. Leonardi J. et al. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2008. 15. N 1. P. 26.
6. Lingner J. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1997. Vol. 94. N 21. P. 11190.
7. Белецкий А.В., Суханова М.В., Марданова Е.С., Зверева М.Э., Марданов А.В., Донцова О.А., Лаврик О.И., Равин Н.В. // Докл. АН. 2015. Vol.462. N 5. P. 605.
8. Lee M. et al. // *Nucleic. Acids. Res*. 2014. Vol. 42. N 3. P. 1733.
9. Sfeir A.J. et al. 2005. Vol. 18. N 1. P. 131.
10. Brown A.F. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2014. Vol. 111 N 31. P. 11311.
11. Sfeir A.J., Shay J.W., Wright W.E. // *Cell Cycle*. 2005. Vol. 4(11). P. 1467.

Поступила в редакцию 10.09.15

## DEVELOPMENT OF A SYSTEM TO TEST FOR THE PRESENCE OF ANY NONTELOMERIC NUCLEOTIDE ON THE 3'-CHROMOSOMAL END

A.N. Malyavko, O.A. Petrova, M.I. Zvereva, O.A. Dontsova

**Amount of telomeric repeats in the telomeres correlated with proliferative potential eukaryotic cells. The lengthening of telomeres and telomerase work is regulated by numerous ways. One of this way is based on the elongation of the 3'-end of chromosome for additional nucleotide that is not part of the sequence of the telomeric repeat. This work presents an approach for testing the presence of an additional nontelomeric nucleotide at the 3'-end of the G-strain of chromosomes. The applicability of this method on the example of thermotolerant yeast *H. polymorpha* was shown. The possibility of modifications of the method to test additional nucleotides at the 3'-end of the chromosomes of other organisms is discussed.**

**Key words:** telomerase, telomeres, *H. polymorpha*, test of terminal nucleotide on 3'-end of a chromosome, the regulation of telomere length.

**Сведения об авторах:** Мальявко Александр Николаевич – науч. сотр. кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (malyavkoan@gmail.ru); Петрова Ольга Алексеевна – мл. науч. сотр. научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова (alpinolen@mail.ru); Зверева Мария Эмильевна – науч. сотр. кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (zvereva@genebee.msu.ru); Донцова Ольга Анатольевна – зав. кафедрой химии природных соединений химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, зав. отд. структуры и функции РНК научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук, профессор, чл.-корр. РАН (dontsova@genebee.msu.ru).