

КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

ЛЁЗИНА ЛАРИСА ЕВГЕНЬЕВНА

**РОЛЬ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ
КЛЕТОЧНЫХ БЕЛКОВ В РЕГУЛЯЦИИ РЕПЛИКАЦИИ
И ТРАНСКРИПЦИИ У МИКРООРГАНИЗМОВ**

03.00.07 – микробиология

03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Казань – 2004

Работа выполнена на кафедре микробиологии Казанского государственного университета и в отделе молекулярной генетики Института анатомии и биологии Уистара (Wistar Institute, г. Филадельфия, США)

Научные руководители: доктор биологических наук,
профессор О.Н. Ильинская
доктор биологических наук,
профессор П.М. Либерман

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор З.И. Абрамова
доктор медицинских наук,
профессор А.Р. Мавзютов

Ведущее учреждение: Институт молекулярной
биологии РАН, г. Москва

Защита состоится “ 16 ” декабря 2004 г. в 13⁰⁰ часов на заседании Диссертационного совета Д 212.081.08 при Казанском государственном университете (420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке имени Н.И. Лобачевского Казанского государственного университета

Автореферат разослан “ _____ ” _____ 2004 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета
кандидат биологических наук, доцент

А.Н. Аскарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Любой живой организм, на каком бы уровне организации он не находился, представляет собой открытую систему. Он постоянно находится под воздействием внешних факторов, и потому должен обладать способностью быстро и адекватно реагировать на изменения, происходящие во внешней среде. Жизненный цикл любого организма включает в себя пролиферацию, сопровождающуюся циклическими изменениями, происходящими во всем организме, и, если речь идет о многоклеточных организмах, дифференциацию, сопровождающуюся изменениями, происходящими на определенной фазе развития организма. Все эти процессы требуют от организма присутствия четких регуляторных механизмов, способных модулировать его функции и поддерживающих его в стабильном состоянии. Из числа таких регуляторных механизмов особое значение принадлежит посттрансляционным модификациям.

Посттрансляционные модификации играют большую роль в регуляции тонких процессов жизнедеятельности. Способность быстро модифицировать функциональный белок, добавляя или снимая с его поверхности физиологически активные группы с помощью специфических ферментов, тем самым меняя заряд на его поверхности, конформацию и другие физико-химические свойства, позволяет использовать эти модификации в качестве «переключателя» во многих клеточных процессах. К таким посттрансляционным модификациям относятся фосфорилирование, ацетилирование, гликозилирование и другие.

Фосфорилирование представляет собой наиболее общий и важный механизм быстрой и обратимой регуляции белковых функций. Исследования животных клеток выявили, что примерно одна треть всех клеточных белков ковалентно модифицирована фосфорилированием. Фосфорилирование белков и последующее их дефосфорилирование действуют совместно в сигнальных путях и вызывают быстрые изменения в ответ на воздействия гормонов, факторов роста и нейротрансмиттеров. Большинство факторов роста [Heldin, 1995] и цитокининов [Ihle et al., 1994] стимулируют фосфорилирование во время связывания со своими рецепторами. Индуцированное фосфорилирование в свою очередь активирует цитоплазматические протеинкиназы [Marshall, 1995]. Дополнительно, клеточный цикл у всех эукариот в обеих G1/S и G2/M переходных фазах регулируется циклин-зависимыми протеинкиназами [Doree and Galas, 1994].

Фосфорилированием также контролируется дифференциация и развитие клеток, а в определенных случаях и метаболизм.

По сравнению с ацетилированием и фосфорилированием, гликозилирование является более узко направленной модификацией, необходимой для поддержания структурной целостности белков. Поли-АДФ-рибозилирование является одним из определяющих процессов, регулирующих жизнь клетки. Он представляет собой посттрансляционную модификацию ядерных белков, как немедленный ответ клетки на разрушение ДНК, вызванное ионизирующей радиацией, окислением и мутагенами [Ame et al., 2000]. Кроме того, поли-АДФ-рибозилирование играет существенную роль в регуляции процессов экспрессии генов и некоторых аспектов репликации ДНК [D'Amours et al., 1999; Dantzer et al., 1999; Kraus and Lis, 2003].

Одновременно вопросы, касающиеся таких фундаментальных процессов регуляции живых организмов, как наследование генетической информации и механизмы ее проявления, находятся на переднем крае современной биологии. Благодаря таким важнейшим процессам, как репликация и транскрипция ДНК, реализуется программа развития всех представителей мира живого, от индивидуальных организмов до целых популяций.

Вышеизложенное определяет актуальность исследования роли различных посттрансляционных модификаций в регуляции жизненно важных функций, таких как репликация и транскрипция, у микроорганизмов, находящихся на различных уровнях эволюционной организации.

Цель и задачи исследований. Целью настоящей работы являлось изучение функций белков, принимающих участие в инициации транскрипции дрожжей и репликации вируса Эпштейна-Барр, а также механизмов регуляции этих белков на уровне посттрансляционных модификаций.

В соответствии с заданной целью были поставлены следующие задачи.

1. Выделить и охарактеризовать белки, входящие в состав комплекса, связанного с сайтом инициации репликации *oriP* вируса Эпштейна-Барр.
2. Определить потенциальный вклад активности отдельных белков в регуляцию инициации репликации и поддержания стабильности генома вируса Эпштейна-Барр.
3. Установить функциональную активность основного транскрипционного фактора дрожжей TFIIA в зависимости от выбранного промотора *in vivo*.

4. Выявить роль посттрансляционных модификаций транскрипционного фактора TFIIA в формировании преинициационного комплекса на различных типах промоторов.

5. Подтвердить значение различных типов посттрансляционных модификаций белков – поли-АДФ-рибозилирования и фосфорилирования – в регуляции жизненноважных функций микроорганизмов.

Научная новизна. Используя новую методику биохимической изоляции ДНК-связывающих белков, впервые выделена и идентифицирована группа клеточных белков, специфически взаимодействующих с сайтом инициации репликации *oriP* вируса Эпштейна-Барр *in vitro* и *in vivo*. Этими белками оказались теломерные белки, участвующие в регуляции длины теломер. Показано влияние выделенных белков на функции репликации и поддержания стабильности вирусного генома. Отмечено, что эти функции регулируются механизмами двух типов: пассивным, за счет белок–белковых взаимодействий, и энзиматически активным за счет посттрансляционных модификаций. Установлено, что поли-АДФ-рибозилирование регулирует стабильность вирусного генома, модифицируя белки комплекса, связанного с *oriP*.

Впервые показана *in vivo* необходимость образования стабильного комплекса между транскрипционными факторами TFIIA и ТВР (TATA Binding Protein) и промоторной ДНК для нормального роста и жизнеспособности дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Показано, что стабильное взаимодействие между TFIIA и ТВР является лимитирующим фактором для экспрессии некоторых, но не всех, генов класса II (регулируемых РНК-полимеразой II). Особенно важны такие взаимодействия для экспрессии генов, содержащих индуцибельные промоторы, а также для генов, специфически регулируемых на определенных фазах клеточного цикла. Все это позволило подтвердить функцию TFIIA, как транскрипционного фактора, зависящего от структуры корового промотора, и необходимого для инициации транскрипции определенной группы генов *in vivo*. Впервые получены данные о фосфорилировании TFIIA *in vivo* в дрожжах. Показано, что фосфорилирование TFIIA стимулирует его комплексообразование с ТВР и промоторной ДНК, что является необходимым условием для поддержания максимального уровня транскрипции с некоторых промоторов *in vivo*.

Вышеуказанные научные факты и наблюдения позволили выявить общие закономерности функционирования живых систем разного уровня

организации, а также механизмов регуляции их наиболее важных процессов жизнедеятельности. В результате проведенных исследований на защиту выносятся следующие научные положения, отражающие новизну проделанной работы.

Основные защищаемые положения диссертации:

1. Клеточные белки, связывающиеся с сайтом инициации репликации *oriP* вируса Эпштейна-Барр, принимают участие в регуляции функций репликации и поддержания стабильности вирусного генома, в том числе используя посттрансляционный механизм поли-АДФ-рибозилирования белков для снижения активности исследуемых функций.

2. Основной транскрипционный фактор ТФИА регулирует формирование преинициационного транскрипционного комплекса *in vivo* на промоторах определенной группы генов в дрожжах *Sacchromyces cerevisiae*, выполняя в определенных случаях зависимую от его фосфорилирования функцию ко-активатора.

3. Посттрансляционные модификации белков, таких как поли-АДФ-рибозилирование и фосфорилирование, представляют универсальный механизм регуляции жизненно важных функций микроорганизмов, обладающих различными уровнями организации.

Практическая значимость работы. Вирусом Эпштейна-Барр инфицировано более 90% человечества. Хотя он в большинстве случаев устанавливает “молчащую” латентную инфекцию, он также ассоциирован с некоторыми раковыми заболеваниями. Результаты работ по изучению регуляции процессов жизнедеятельности вируса Эпштейна-Барр способствуют выявлению механизма участия вируса в этих заболеваниях. Определение путей регуляции, в частности репликации вирусной ДНК и поддержания стабильности его генома, и нахождение способов модуляции этих процессов дает возможность использовать эти знания в медицинских целях, в разработке фармакологических препаратов. К тому же есть основание предполагать, что некоторые другие вирусы могут обладать схожим механизмом регуляции репликации.

Дрожжи, в частности пекарские дрожжи *Sacchromyces cerevisiae*, широко применяются в производстве, поэтому базовые исследования транскрипции их белков могут быть использованы в дальнейшем в разработке новых технологий, при получении новых штаммов продуцентов, а также в усовершенствовании производственных процессов.

Связь работы с базовыми научными программами. Работа в течение 1994 - 2004 гг. проводится в соответствии с планом НИР Казанского государственного университета (№ госрегистрации 01910049994). Исследование в рамках тематики работы были поддержанными грантами NIH (GM 12345-01 и GM 54687-02, США) и грантами Leukemia Society of America (США) и American Cancer Society (США).

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на итоговых конференциях кафедры микробиологии КГУ (2003), на IV научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2004), на отчетных научно-практических конференциях молодых ученых института анатомии и биологии Уистера (Филадельфия, США, 1998, 1999, 2000, 2001).

Публикации. Основной материал диссертационной работы нашел отражение в 5 печатных работах. Из них 3 научные работы опубликованы в центральной зарубежной и 1 – в российской печати, 1 – в сборнике тезисов докладов российской конференции.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 150 страницах машинописного текста, содержит 2 таблицы, 24 рисунка, включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты исследований, обсуждение результатов, выводы и список литературы. Список литературы содержит 200 источников, из которых 195 зарубежных.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность сотрудникам института Уистера (США), в процессе совместной работы с которыми возникла идея этого исследования, Д. Озеру, С.П. Солоу, З. Дэнд, Ч.-Д. Чен, С. Штивелбанд, а также сотрудникам кафедры микробиологии Казанского государственного университета за теплую рабочую атмосферу. Автор выражает благодарность профессору Н.А. Барлеву за критические замечания по структуре и содержанию диссертационного материала. Автор особо благодарит своих научных руководителей профессора О.И. Ильинскую и профессора П.М. Либермана.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Клеточные белки, взаимодействующие с сайтом инициации репликации вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ) в присутствии регуляторного вирусного белка EBNA1, выделяли из SL1 клеток, созданных на основе клеточной линии HeLa (HeLaS3) и стабильно продуцирующих EBNA1. Для этого ядерный

экстракт из клеточных культур HeLa и SL1 готовили по стандартной методике [Digman et al., 1983] с некоторыми модификациями и использовали в ДНК-аффинной хроматографии.

Ядерный экстракт инкубировали с биотинилированной ДНК (DS или контрольная ДНК схожего размера ZRE), пришитой к стрептовидиновому магнитному носителю по методике, описанной производителем (DynaI, Norway). ДНК фрагменты получали методом амплификации ПЦР с использованием смеси биотинилированного праймера на 5'-конце и немодифицированного праймера на 3'-конце. Все праймеры были синтезированы в лабораториях IDT (Integrated DNA Technology, США). Аффинные носители затем отмывали от белков неспецифического связывания, и связавшиеся белки элюировали буферами различной ионной силы (150, 300 и 1000 мМ KCl). Элюированные белки разделяли методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле и полученные белковые спектры анализировали с помощью окраски геля серебром согласно методике, рекомендованной производителем (Invitrogen, США). Белки, специфично взаимодействующие с DS элементом, но не с контрольной ДНК, вырезали из геля, элюировали и определяли их аминокислотный состав методом масс-спектрометрии в специализированных аналитических лабораториях Института Уистара (г. Филадельфия, США) и Гарвардского университета (США).

Иммуноблоттинг белков проводили по стандартной методике [Ausubel et al., 1997] с использованием антител согласно спецификации производителя.

Взаимодействие ядерных белков с *oriP* ВЭБ *in vivo* определяли в естественно инфицированных клетках Raji методом иммунопреципитации хроматина [Parekh and Maniatis, 1999] с некоторыми модификациями [Barlev et al., 2001]. Клеточные белки ковалентно сшивались с ДНК путем инкубации клеток Raji с 1% формальдегидом. Ядерную ДНК расщепляли на куски обработкой ультразвуком, и полученный экстракт использовали в реакциях иммунопреципитации со специфичными антителами. Ко-иммунопреципитированную ДНК выделяли и амплифицировали методом ПЦР с праймерами, специфичными для *oriP* и для контрольного участка ДНК BRLF1.

Кооперативное связывание TRF2 и EBNA1 с DS элементом определяли по стандартной методике гель-ретардации (изменения электрофоретической подвижности комплекса) и методом “отпечатков”, полученных в результате гидролиза ДНК ферментом ДНКазы I [Ausubel et al., 1997]. Рекомбинантные

EBNA1 и TRF2 белки выделяли из клеток насекомых Sf9, зараженных бакуловирусом, экспрессирующим указанные белки.

Уровень репликации плазмид определяли методом, основанным на устойчивости реплицированных плазмид к рестриktionному ферменту Dnp1, чувствительному к метилированию. Репликацию трансфецированной ДНК анализировали в клетках НЕК 293, как описано ранее [Yates et al., 2000].

В экспериментах по определению количества клеток, содержащих *oriP*-или *oriP* Δ _{a,b,c}-плазмиду, и числа плазмидных копий на клетку («плазмидная стабильность») использовали клеточные линии D98/HR1 или Akata. Клетки, содержащие вышеуказанные плазмиды, отбирали с помощью проточной флуоресцентной цитометрии, и затем дополнительно выращивали в течение 21 дня [Yates et al., 2000] в условиях воздействия фармакологических препаратов. Для определения общего количества плазмидной ДНК, содержащей *oriP*, ее выделяли из одинакового количества клеток методом Херта [Ausubel et al., 1997], а затем анализировали с помощью Саузерн-блоттинга. Для определения количества копий на клетку *oriP*-содержащих плазмид, после 21 дня инкубации клетки повторно сортировали с помощью проточной флуоресцентной цитометрии с последующим выделением плазмидной ДНК и ее анализом методом Саузерн-блоттинга.

Уровень поли-АДФ-рибозилирования DS-ассоциированных белков после выделения из HeLa и SL1 клеток определяли по их способности включать радиоактивно меченный ³²P-НАД или немеченый НАД с последующим соответствующим анализом методом автордиографии или иммуноблоттинга.

Для изучения роли TFIIA *in vivo* использовали дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Нормальный или мутантные рекомбинантные Toa2 субъединицы выделяли на Ni²⁺-нитрилтриацетатно-кислой агарозной колонке (Qiagen, США), реассоциировали с нормальной Toa1 субъединицей TFIIA и использовали для определения образования ДНК-белкового комплекса TFIIA-ТВР-ТАТА блок (Т-А) методом гель-ретардации.

Для того, чтобы выявить эффект этих и других близких мутаций в кодирующем Toa2 белок гене *TOA2*, в дрожжи вводились мутантные *toa2* аллели с помощью техники плазмидной замены [Rose et al., 1990]. Штаммы дрожжей выращивали в различных условиях, варьируя температуру и источник углеводов в питательной среде. Параметры роста определяли стандартными микробиологическими методами.

Влияние *Toa2* мутаций на клеточный цикл дрожжей изучали методами световой микроскопии и проточной флуоресцентной цитометрии для определения соотношения клеток с гаплоидным, диплоидным набором ДНК или флоккулянтов (устойчивое скопление клеток).

Экспрессию генов *in vivo* соотносили с уровнем соответствующих мРНК, который, в свою очередь, определяли методом устойчивости к S1 нуклеазе по ранее описанной методике [Ozer et al., 1998]. Для этого из дрожжей выделяли общую РНК, гибридизировали ее с ³²P-меченным ДНК олигонуклеотидом, комплементарным исследуемой РНК, и подвергали воздействию S1 нуклеазы (Sigma), которая гидролизует только одноцепочечные остатки нуклеиновых кислот. Количество образовавшихся специфических РНК-ДНК меченых гибридов определяли, используя программу ImageQuant на приборе PhosphorImager (Molecular Dynamics, США). Олигонуклеотиды синтезировали в Integrated DNA Technologies Corp. (США).

Фосфорилирование дрожжевых белков *in vivo* проводили по описанной ранее методике [Warner, 1991].

Эффект фосфорилирования *Toa1* на формирование комплекса ТФIIА-ТВР-ДНК (Т-А) изучался методом гель-ретардации по стандартной методике [Ausubel et al., 1997] с использованием выделенных нами дрожжевых мутантных или нормальных ТФIIА и дрожжевого или человеческого ТВР.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Выделение и идентификация клеточных белков, взаимодействующих с сайтом инициации репликации *oriP* вируса Эпштейна-Барр

Вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ), находясь в латентном состоянии, характеризуется тонкой регуляцией своей репликации, происходящей только один раз в один клеточный цикл, и поддержанием стабильного количества копий своего генома. Характерно, что в латентном состоянии постоянно синтезируется только один вирусный блок – EBNA1 – необходимый для поддержания обеих функций ВЭБ, репликации и стабильности. Белок EBNA1 взаимодействует с двумя участками ДНК ВЭБ, включающие в себя семейство повторов (FR) и участок лучевой симметрии (DS), состоящие из множественных сайтов связывания с EBNA1 и находящиеся на сайте инициации репликации *oriP*. Поскольку EBNA1 участвует в поддержании основных функций ВЭБ, но не обладает необходимыми для этого ферментативными активностями, легко предположить, что EBNA1 может привлекать к *oriP* клеточные белки для выполнения этих функций.

В результате ДНК-аффинной хроматографии нами были выделены клеточные белки, специфически взаимодействующие с DS элементом, но не с контрольной ДНК (ZRE) в клетках, содержащих EBNA1 (клеточная линия SL1) (рис. 1А). Белки эти не взаимодействовали с DS элементами в отсутствие EBNA1 (клеточная линия HeLa) (рис. 1В). Нами были идентифицированы следующие наиболее обогащенные DS-связывающиеся EBNA1-специфичные полипептиды: p54 - EBNA1 (54 КДа), p32 – Tat-ассоциированный белок, ранее опубликованный как взаимодействующий с EBNA1. Примечательно, что остальные идентифицированные полипептиды обладают функциями, ассоциированными с поддержанием длины теломер: p150 - танкираза, обладающая АДФ-рибозо-полимеразной активностью и модифицирующая взаимодействующие с теломерными повторами белки TRF1 и TRF2, p60 - TRF2, p50 – TRF2-взаимодействующий белок RAP1, p116 - поли(АДФ-рибозо)полимераза PARP1, которая ранее не была зафиксирована в ассоциации с теломерами, но обладает функцией близкой с взаимодействующей с ними танкиразой.

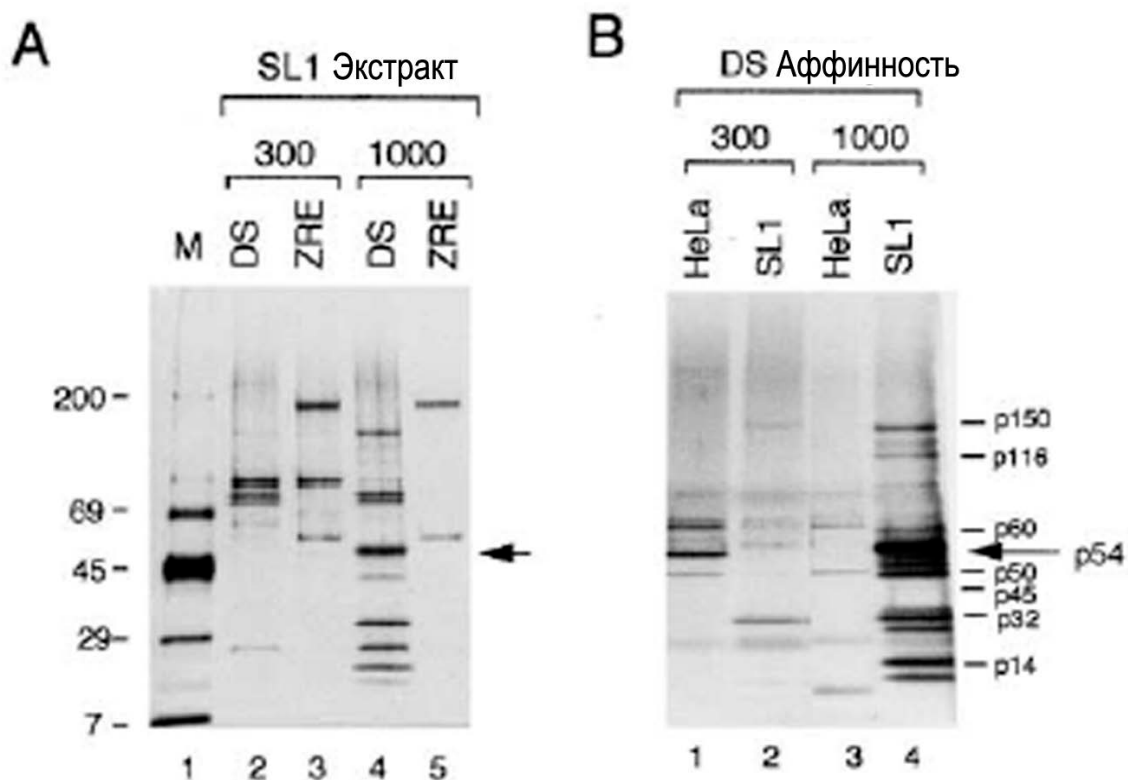


Рис.1. Идентификация DS-связывающихся EBNA1-специфичных клеточных белков. Показана DS-специфичность (А) и EBNA1-специфичность (В). Окраска белков серебром.

Тождественность выделенных полипептидов была подтверждена иммуноблоттингом с использованием специфичных антител.

Взаимодействия танкиразы и TRF2 с *oriP* были подтверждены *in vivo* методом иммунопреципитации хроматина, используя естественно инфицированную клеточную линию Raji лимфомы Бёркита.

Три нонамерных сайта на DS элементе представляют собой последовательности, аналогичные теломерным повторам (TTAGGG). Как известно, теломерные факторы, включая TRF2, связываются с этими повторами на теломерах. Поэтому мы предположили, что, скорее всего, именно нонамеры играют важную роль во взаимодействии TRF2 с DS элементом. Были проанализированы рекомбинантные TRF2 и EBNA1 на предмет совместного связывания с DS элементом методом гель-ретардации. В результате, нами установлено, что связывание EBNA1 с DS элементом усиливается благодаря воздействию TRF2, при этом воздействие это зависит от нонамерных последовательностей, т.к. эффект этот не наблюдался в случае мутаций на нонамерных сайтах с заменой всех шести пар оснований ($\Delta a, b, c$). Экспериментально, методом «отпечатков» с использованием ДНКазы I мы показали, что TRF2 действительно непосредственно и специфично связывается с нормальными, но не с мутированными нонамерами DS элемента только в присутствии EBNA1 (рис. 2). Таким образом, EBNA1 и TRF2 обладают кооперативным механизмом взаимодействия с DS элементом *oriP*.

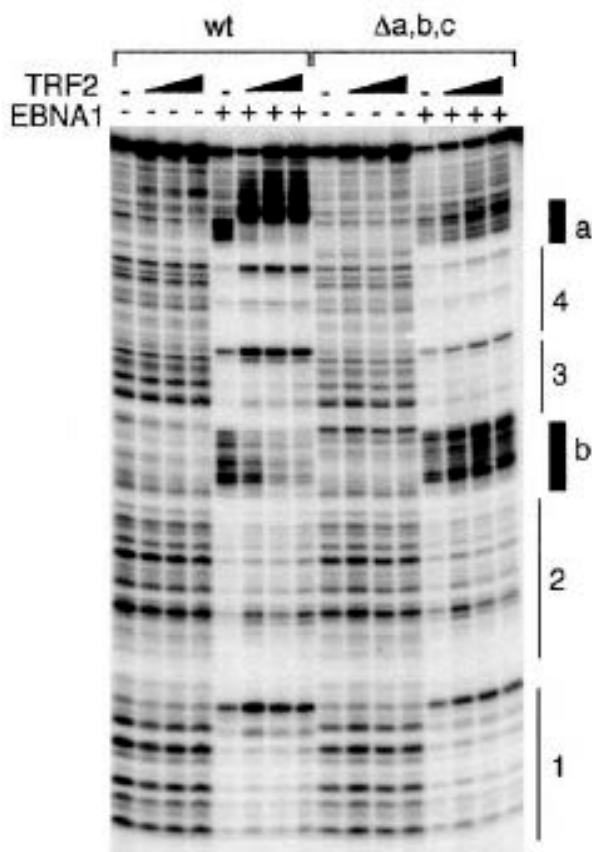


Рис.2. Кооперативное связывание TRF2 и EBNA1 с DS элементом. Метод «отпечатков» с использованием ДНКазы I.
 wt – нормальный DS элемент
 $\Delta a, b, c$ – мутантный DS элемент
 a, b, c – нонамерные сайты
 1, 2, 3, 4 - EBNA1-связывающие сайты

2. Роль выделенных клеточных белков в регуляции репликации и поддержания стабильности вирусной эписомы

Известно, что DS элемент несет функции минимального автономного репликатора и собственно является сайтом инициации репликации на *oriP* ВЭБ. Для того чтобы проверить, вносит ли TRF2 какой-либо вклад в *oriP*-зависимую репликацию ДНК, мы проанализировали репликативную активность *oriP* в клетках, трансфецированных TRF2, либо доминантно-негативным укороченным мутантом Δ TRF2, или TRF1, белком, схожим с TRF2 в участке домена связывания с ДНК и взаимодействующим с теломерами, как и TRF2. Используя метод устойчивости к метил-зависимой рестриктазе DpnI, мы определили, что TRF2, специфически связываясь с нонамерами сайта начала репликации DS, может влиять на уровень вирусной репликации.

Ранее было показано, что нонамеры вносят определенный вклад в поддержание стабильного количества копий генома ВЭБ в Raji клетках лимфомы Бёркитта. Мы так же показали, проанализировав трансфецированные клетки саузерн-блоттингом на содержание *oriP*-плазмид, что нонамерные повторы DS элемента усиливают функции *oriP* в поддержании стабильности вирусного генома в клетках Akata.

Выделив DS-ассоциированные белки из обработанных различными препаратами D98/HR1 клеток и, проанализировав их иммуноблоттингом, используя антитела, специфичные к поли-АДФ-рибозе, мы обнаружили корреляцию между уровнем рибозилирования DS-ассоциированных белков и поддержанием стабильности вирусной эписомы. Так, ниацинамид и 3-аминобензамид, фармакологические ингибиторы ПАРП активности, понижая уровень рибозилирования DS-ассоциированных белков, усиливают вирусную стабильность по сравнению с контрольными необработанными образцами. Напротив, гидроксимочевина, которая является рибонуклеотид-редуктазным ингибитором, вызывает значительную потерю *oriP*-плазмид, вызывая при этом существенное усиление поли-АДФ-рибозилирования белков с высоким молекулярным весом.

Мы показали, что из числа DS-ассоциированных белков, два белка из SL1 клеток, содержащих EBNA1, но не из контрольных HeLa клеток, являются объектом НАД-зависимой посттрансляционной модификации (рис. 3А). Эти белки обладают молекулярным весом 54 КДа и 150-200 КДа. Иммуноблоттинг с антителами к EBNA1 и танкиразе подтвердил их НАД-зависимую модификацию, каковой является поли-АДФ-рибозилирование

(рис. 3В). Таким образом, мы установили, что белки EBNA1 и танкираза, участвующие (или, в случае танкиразы, потенциально участвующие) в регуляции функций *oriP*, являются объектом посттрансляционных модификаций.

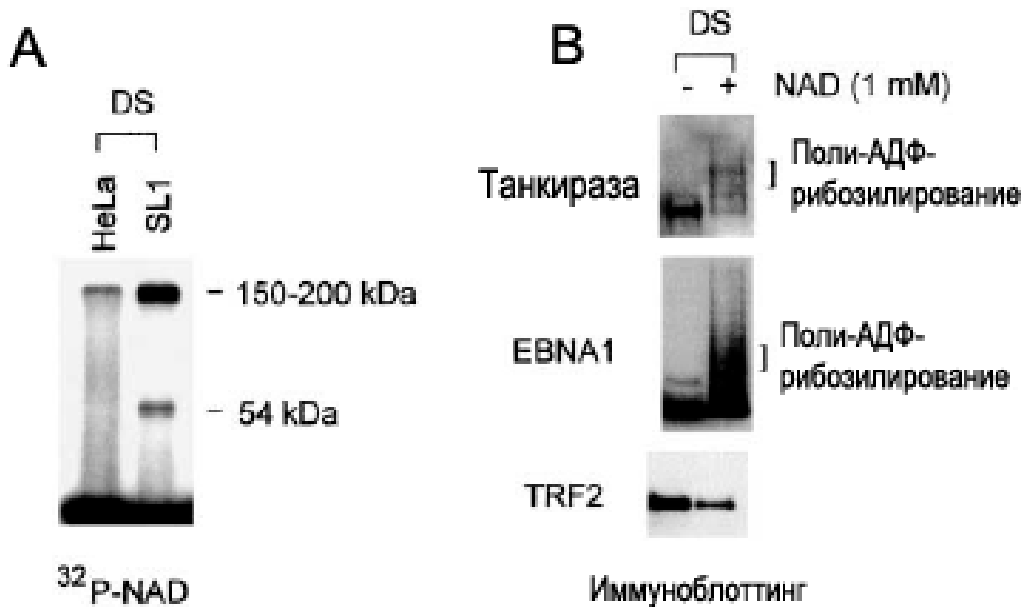


Рис.3. Модификация DS-связывающихся EBNA1-специфичных клеточных белков поли-АДФ-рибозилированием.

3. Роль TFIIA в регуляции инициации транскрипции *in vivo* в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*

В качестве другого объекта наших исследований мы использовали дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* для изучения роли посттранскрипционной модификации фосфорилирования в регуляции *in vivo* функций основного транскрипционного фактора TFIIA. Согласно данным кристаллической структуры, аминокислотные остатки Y69 и W76 в Toa2 субъединице TFIIA ответственны за контакт с TBP (TATA-binding protein) белком, взаимодействие между которыми приводит к этих белков на ДНК. Мы подтвердили это предположение экспериментальным путём, проанализировав способность дрожжевых мутантов TFIIA образовывать комплекс с TBP и ДНК (Т-А комплекс) методом гель-ретардации. Мутации вышеуказанных аминокислот путем замены их на другие аминокислотные остатки ослабляли Т-А комплексообразование в 65 раз по сравнению с диким типом, указывая на важную роль Y69 и W76 в поддержании стабильности Т-А комплекса.

Мы также экспериментально показали, что функция TFIIA в поддержании T-A комплексобразования влияет на рост и жизнеспособность дрожжей. Некоторые из вышеуказанных мутаций оказались летальными, другие вызывали общий дефект роста в нормальных условиях и летальность в экстремальных условиях культивирования, особенно при росте на галактозо- и глицерин-содержащих средах вместо глюкозы и в условиях теплового шока.

Мы определили, что стабильное взаимодействие между TFIIA и TBP не является необходимым для всех генов *in vivo*, но важно для эффективной транскрипции генов, необходимых для прогрессии клеточного цикла. Эти результаты были получены нами путем сравнительного анализа уровня экспрессии мРНК определённых генов методом устойчивости к S1 нуклеазе в нормальном и мутантном *toa2* штаммах дрожжей. К числу таких генов относятся *CLB1*, *CLN1*, *CTS1* и другие (рис. 4). Методами световой микроскопии и проточной флюоресцентной цитометрии мы подтвердили, что клеточный цикл у *toa2* мутантов останавливается в G2/M фазе.

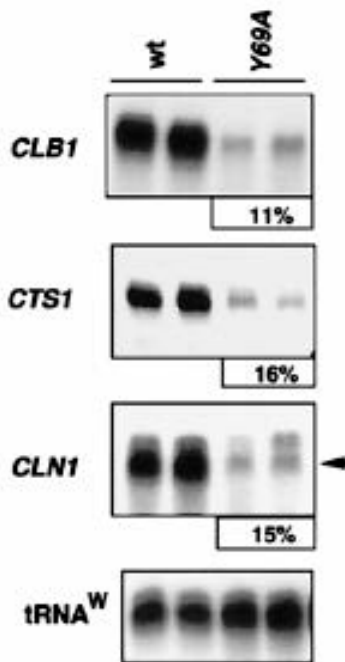


Рис.4. Понижение экспрессия генов, регулирующих клеточный цикл, в TFIIA мутантах. Определение уровня мРНК методом устойчивости к S1 нуклеазе.

Нам удалось экспериментально показать, что стабильное TFIIA-TBP взаимодействие необходимо также и для максимальной индуцибельной экспрессии группы генов *in vivo*. У таких генов постоянная (конституционная) транскрипция (T_C) инициируется с одного сайта, а индуцибельная (T_R) – с другого сайта(ов). Регуляция инициации транскрипции с каждого сайта происходит со своего промоторного элемента. К числу генов, обладающих такой организацией, относятся *HIS3*, *GAL80*, *URA1* и *URA3* гены. Проанализировав уровень транскрипции с T_C и T_R сайтов

инициации методом устойчивости к S1 нуклеазе, мы установили, что *toa2* дрожжевые мутанты дефектны по активации транскрипции с индуцибельных T_R сайтов инициации при умеренном дефекте транскрипции с T_C сайтов (рис. 5).

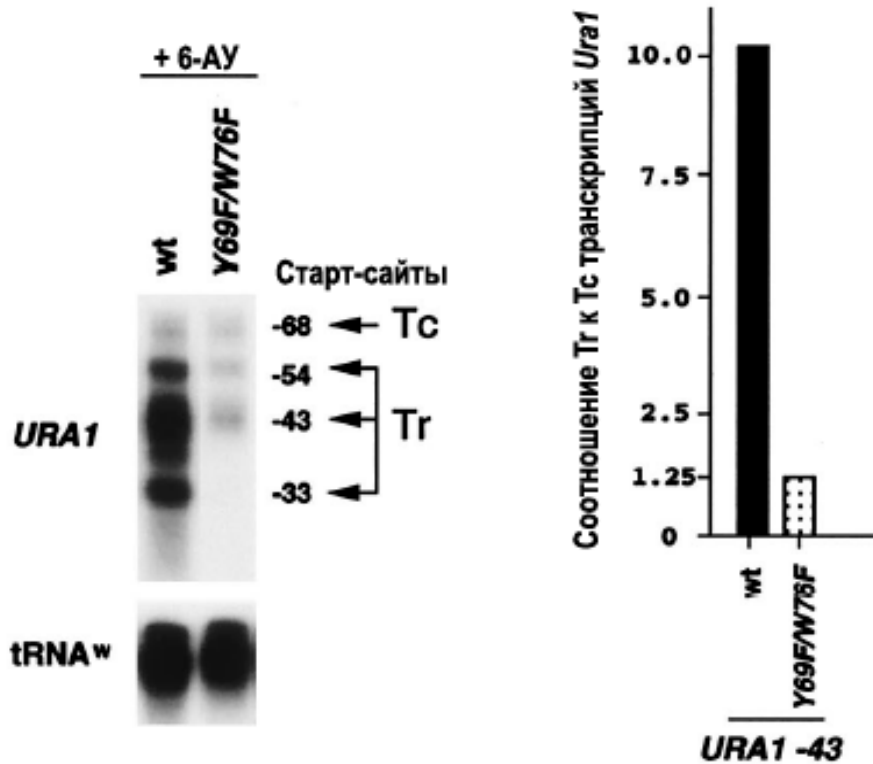


Рис.5. Дефект в активатор-индуцированном переключении старта транскрипции, у мутантов TFIIA. Определение уровня мРНК методом устойчивости к S1 нуклеазе.

Более того, исследовав воздействие различных активаторов на индуцибельную экспрессию разных генов в присутствии нормального и мутантного TFIIA, мы выяснили, что различие в требованиях к устойчивости TFIIA-ТВР взаимодействия при активации максимальной экспрессии индуцибельных генов *in vivo* может зависеть как от природы активатора, так и от структуры промотора.

4. Влияние фосфорилирования TFIIA на дрожжевую транскрипцию

В связи с важной ролью TFIIA-ТВР взаимодействия в регуляции транскрипции генов, взаимодействия эти представляют собой хорошую модель для регуляции с помощью посттрансляционных модификаций. В связи с этим, мы экспериментально показали, что *Toa1* субъединица TFIIA фосфорилируется *in vivo* в дрожжах. Более конкретно, акцепторами фосфатных групп являются сериновые аминокислотные остатки

в позициях 220, 225 и 232 С-концевого домена Toa1, что следует из анализа *toa1* дрожжевых мутантов.

Чтобы выяснить функцию фосфорилирования в регуляции TFIIA, очищенные фосфорилированный *in vivo* (wt), и нефосфорилированный мутантный (m) дрожжевые Toa1 белки были проанализированы методом гель-ретардации на способность формировать стабильный T-A комплекс. Фосфорилирование TFIIA оказалось необходимым для его стабильного взаимодействия с дрожжевым уТВР и ДНК (рис. 6).

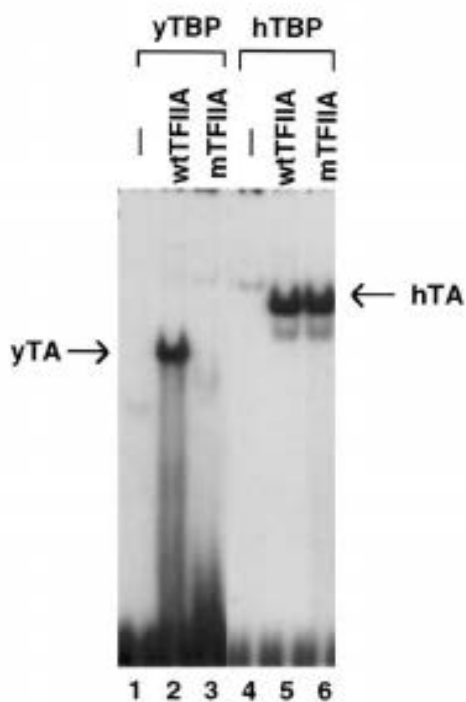


Рис.6. Стимуляция формирования ТВР-TFIIA комплекса в результате фосфорилирования Toa1 субъединицы. Формирование уТА и hТА комплексов указано стрелками. Метод гель-ретардации.
уТВР – дрожжевой ТВР
hТВР – человеческий ТВР
wtTFIIA – нормальный TFIIA
mTFIIA – мутантный TFIIA

Сравнив уровень мРНК указанных на рисунке индуцибельных генов, содержащих в своих промоторах несколько стартовых сайтов, в дрожжевых штаммах, экспрессирующих wt Toa1 и нефосфорилируемый m Toa1, мы определили, что фосфорилирование TFIIA необходимо для транскрипции не всех, а только определенных генов *in vivo*.

Мы также показали, что в целом, фосфорилирование TFIIA является необходимым фактором для роста и жизнеспособности дрожжей. Тройная замена сериновых аминокислотных остатков на нефосфорилируемые остатки аланина в последовательности Toa1, объединенная с дополнительной мутацией на границе участка TFIIA-ТВР взаимодействия, оказалась летальной для дрожжей.

Таким образом, посттрансляционная модификация TFIIA, в частности, его фосфорилирование, играют существенную роль в регуляции способности

ТФИА стимулировать образование стабильного Т-А комплекса, что особенно критично для транскрипции определенных индуцибельных генов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что посттрансляционные модификации широко используются и играют важную роль в регуляции многих жизненных процессов у эукариот. Чтобы выяснить, имеют ли эти модификации такое же первостепенное значение в более просто организованных живых системах, мы исследовали некоторые аспекты инициации репликации и транскрипции на предмет изучения роли посттрансляционных модификаций в регуляции этих процессов. В качестве моделей мы использовали вирус Эпштейна–Барр и дрожжи *Sacchromyces cerevisiae*.

Вирус Эпштейна–Барр устанавливает латентную инфекцию в В-лимфоцитах человека. Геном ВЭБ существует в виде кольцевой внехромосомной эписомы. Область ДНК, ответственная за репликацию эписомы (*oriP*) состоит из двух участков: FR элемента и DS элемента. DS элемент является сайтом инициации репликации вирусного генома [Gahn and Schildkraut, 1989]. FR элемент необходим для поддержания стабильного количества копий вирусного генома в клетке-хозяине [Aiyar et al., 1998; Sugden and Leight, 2001]. Репликация и поддержание стабильности генома ВЭБ зависят от вирусного белка EBNA1. EBNA1 является единственным белком, кодируемым вирусом в его латентной форме. Поскольку EBNA1 не обладает активностями, необходимыми для инициации репликации ДНК и поддержания вирусной стабильности, то вполне очевидно, что вирусу необходимо использовать клеточные белки хозяина для репликации вирусной ДНК. EBNA1 находится в постоянно связанном состоянии с FR и DS элементами, что является необходимым условием для поддержания стабильной латентной инфекции.

Таким образом, активность EBNA1 должна каким-то образом регулироваться. Посттрансляционные модификации являются, пожалуй, самым быстрым и эффективным способом модулировать активности белков. Потому можно было ожидать, что EBNA1 также может подвергаться таким модификациям. Соответственно гипотетический белок-фермент, модифицирующий EBNA1, может либо непосредственно взаимодействовать с EBNA1, либо образовывать дополнительный контакт с ДНК рядом с EBNA1-связывающим сайтом.

В своей работе мы использовали оригинальный, разработанный нами метод выделения клеточных белков, взаимодействие которых с DS элементом зависит от присутствия EBNA1. Таким образом, нами было выделено несколько белков, многие из них связаны с функцией регулирования длины теломер. Это белки TRF2, танкираза, Rap1, а также PARP1 – поли(АДФ-рибозо)полимераза, близкая по функциям с танкиразой. Такие результаты являются вполне объяснимыми, т.к. DS элемент вируса Эпштейна–Барр содержит в своем составе три нонамерных повтора, чьи последовательности аналогичны теломерным последовательностям, являющимися сайтами связывания TRF2 на теломерах. Известно, что Rap1 и танкираза взаимодействуют с TRF2 на теломерах, при этом танкираза посттрансляционно модифицирует его, тем самым модулируя его функции. Мы же показали, что TRF2 и танкираза взаимодействуют с эписомальным *oriP in vivo*, подтвердив *in vitro* результаты.

Мы экспериментально показали, что один из выделенных белков, TRF2, связывается с DS элементом в кооперации с EBNA1. Наши данные также дают основание предполагать, что взаимодействующие с нонамерами белки модулируют репликационные функции ЭБ вируса в определенных типах клеток. На основе полученных результатов мы предполагаем, что TRF2 может способствовать образованию комплекса EBNA1 с другими белками, особенно в тех типах клеток, где концентрация белка EBNA1 понижена или ослаблена его способность к связыванию. Согласно другому сценарию, TRF2 может способствовать формированию репликационного комплекса на *oriP* и инициации синтеза ДНК на нонамерных сайтах. Известно, что TRF2 обладает способностью усиливать разъединение цепей на теломерной t-петле [Stansel et al., 2001], и подобная активность может содействовать репликационным функциям и на *oriP*.

Ранее было отмечено [Niller et al., 1995; Yates et al., 2000], и мы подтвердили это наблюдение, что нонамеры играют определенную роль в поддержании стабильности вирусного генома. Несколько пассивных механизмов было предложено для описания функции комплекса EBNA1-*oriP* в этом процессе. Весьма вероятно, что нонамер-связывающие белки также участвуют в этих механизмах. Известно, что индуцированное EBNA1 формирование петли ДНК между DS и FR элементами коррелирует с функциями репликации ДНК и поддержания стабильности вирусных эписом [Frappier and O'Donnell, 1991; Middleton and Sugden, 1992; Su et al., 1991]. Связывающиеся с нонамерами белки могут способствовать образованию и

стабилизировать вторичную структуру *oriP*. С другой стороны, TRF2 и другие теломерные белки могут содействовать ассоциации EBNA1 с определенными хроматиновыми структурами, что в свою очередь может способствовать удерживанию вирусных эписом на митотических хромосомах во время их конденсации и, таким образом, передаче постоянного числа копий вирусного генома от материнской клетки к дочерним.

Нами также было продемонстрировано, что кроме механизма пассивной регуляции, энзиматически активный процесс участвует в поддержании функции стабильности генома вируса Эпштейна–Барр. Хотя точный механизм этой активной регуляции еще не изучен, наши данные указывают на то, что EBNA1 и танкираза могут быть объектами посттрансляционных модификаций. Имеющиеся в литературе данные указывают, что танкираза является позитивным регулятором длины теломер, поли-АДФ-рибозилируя теломерные белки TRF1 и TRF2 и модифицируя доступ теломеразы к теломерам [Smith et al., 1998]. Мы можем предложить два возможных механизма регуляции функций генома ВЭБ с помощью выше отмеченных модификаций. С одной стороны, поли-АДФ-рибозилирование может влиять на способность репликационных белков и/или белков стабильности взаимодействовать с *oriP*. С другой стороны, эти модификации могут регулировать аспекты взаимодействия *oriP* с хроматином, что также может быть критично для эписомной стабильности.

Характерно, что некоторые другие вирусы обладают аналогичными нуклеотидными последовательностями связывания с выделенными нами белками. Поэтому можно предполагать, что предложенные нами механизмы регуляции вирусных функций с использованием посттрансляционных модификаций могут быть общими для целой группы вирусов.

Если даже вирусы, одни из наиболее просто организованных живых существ, используют такой тонкий процесс посттрансляционных модификаций для поддержания своих функций, тем более это характерно для сложно организованных микроорганизмов, к числу которых относятся дрожжи. Регуляция транскрипции у таких организмов играет наиважнейшую роль, а изучение механизмов регуляции особенно отдельных генов или групп генов, а не всего генома представляется весьма актуальным. Большую роль в этом случае играют активаторы и ко-факторы (ко-активаторы). Одним из таких регуляторных белков является основной транскрипционный фактор ТFIIA, поскольку еще ранее он был отмечен как позитивный регулятор транскрипции *in vitro*. Можно было бы предположить, что

посттрансляционные модификации и здесь могут играть свою роль, модулируя функции TFIIA на разных промоторах.

Мы показали, что стабильное взаимодействие между TFIIA и TBP важно для инициации транскрипции лишь с определенной группы промоторов *in vivo*. Мы предполагаем, что взаимодействие TFIIA с TBP может регулировать активность этих промоторов, будучи посредником между активатором и TBP и таким образом играя роль ко-фактора, или же за счет непосредственного усиления связывания TBP со специфическими коровыми промоторами. На этих промоторах взаимодействие между TFIIA и TBP скорее всего будет являться лимитирующим фактором.

Мы охарактеризовали необходимость взаимодействий между TFIIA и TBP для роста и для поддержания высокого уровня экспрессии некоторых генов класса II в *S. cerevisiae*. Стабильность этих взаимодействий особенно важна для активатор-индуцибельной экспрессии промоторов с выраженным ТАТА элементом, и для группы генов, контролирующей прогрессию клеточного цикла. Эти результаты подтверждают биохимические исследования, согласно которым TFIIA является ко-активатором, функция которого зависит от структуры корового промотора.

Очевидно, что взаимодействие TFIIA с TBP является эволюционно консервативным от дрожжей до человека и, вероятно, играет важную роль на многих уровнях генной регуляции. Следовательно, TFIIA может быть объектом посттрансляционных модификаций, что, вероятно, играет существенную роль в специфической регуляции экспрессии отдельных генов или группы генов.

Действительно, мы обнаружили, что TFIIA фосфорилируется в дрожжах *in vivo*. Мы продемонстрировали, что фосфорилирование TFIIA усиливает TFIIA-TBP-ДНК комплексобразование *in vitro* и важно для поддержания максимальных уровней транскрипций *in vivo*. Максимальный уровень транскрипции особенно может зависеть от эффективности транскрипционной реинициации, которая, согласно другим исследованиям, коррелирует со стабильностью TBP-TFIIA комплекса [Zawel et al., 1995]. Фосфорилирование TFIIA *in vivo* коррелирует с жизнеспособностью дрожжей. Необходимо отметить, что значение фосфорилирования в поддержании жизнеспособности дрожжей проявляется только в совокупности с мутацией, влияющей на ассоциацию TFIIA с TBP. Можно предположить, что сами по себе слабые контакты между белками в совокупности значительно усиливают взаимодействия между TFIIA, TBP и ДНК. Фосфорилирование Toa1 может

вносить существенный вклад в образование прямого контакта между ним и ТВР или ДНК, или же индуцировать конформационные изменения, усиливающие стабильность TFIIA–ТВР–ДНК комплекса.

Известно, что активность некоторых других основных транскрипционных факторов также регулируется их фосфорилированием [Hampsey, 1998]. Это относится к С-концевому домену большей субъединицы РНК-полимеразы II и к TFIIID. В обоих случаях их фосфорилирование коррелирует с репрессией инициации транскрипции. Напротив, нами показано, что фосфорилирование TFIIA коррелирует с увеличением транскрипционной активности. Эти результаты отражают различные роли TFIIA, TFIIID и РНК-полимеразы II в процессе инициации транскрипции. TFIIID и РНК-полимераза II являются классическими основными транскрипционными факторами, в то время как TFIIA на многих, в частности индуцибельных, промоторах играет позитивную роль транскрипционного модулятора.

Таким образом, на примере поли-АДФ-рибозилирования и фосфорилирования мы показали, что микроорганизмы имеют в своем активе различные посттрансляционные модификации, которые используются в регуляции таких жизненноважных процессов, как репликация и транскрипция. Тем самым этот факт указывает на универсальность роли посттрансляционных модификаций в жизни всех организмов, от вирусов до человека.

ВЫВОДЫ

1. Выделенные нами белки клеток человека, взаимодействующие с DS элементом сайта инициации репликации *oriP* вируса Эпштейна-Барр, являются факторами, регулирующими длину теломер. Их взаимодействие с *oriP* строго зависит от ключевого вирусного белка EBNA1. Клеточный белок TRF2 непосредственно связывается с нонамерными сайтами DS элемента в присутствии EBNA1, кооперативно усиливая способность последнего к комплексообразованию с ДНК.

2. Показано, что клеточные белки, в том числе поли(АДФ-рибозо)полимеразы, являются частью системы регуляции репликации и поддержания стабильности генома вируса Эпштейна-Барр. Нами установлено наличие как пассивного, так и энзиматически активного механизма этой регуляции, к которому относится поли-АДФ-рибозилирование белков репликационного комплекса.

3. Выявлено, что основной транскрипционный фактор ТФИА, в зависимости от структуры корового промотора, может функционировать как ко-активатор. При этом взаимодействие между ТФИА и ТВР является определяющим фактором в регуляции инициации транскрипции *in vivo* определенных генов в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*.
4. Впервые показано, что ТФИА фосфорилируется *in vivo* в дрожжах. Эта модификация ТФИА важна как для формирования прединициационного транскрипционного комплекса, так и для поддержания максимального уровня транскрипции некоторых индуцибельных генов.
5. На примере микроорганизмов, находящихся на разных уровнях развития — вирусов и дрожжей — нами подтверждена универсальность посттрансляционных модификаций белков, в частности, поли-АДФ-рибозилирования и фосфорилирования, как механизма регуляции важнейших функций живых существ.

Список публикаций по теме диссертации

1. Ozer J. Association of transcription factor IIA with TATA binding protein is required for transcriptional activation of a subset of promoters and cell cycle progression in *Saccharomyces cerevisiae* / J.Ozer, L.E.Lezina, J.Ewing, S.Audi, P.M.Lieberman // *Mol. Cell. Biol.* – 1998. – 18. – P. 2559–2570.
2. Solow S.P. Phosphorylation of TFIIA stimulates TATA binding protein – TATA interaction and contributes to maximal transcription and viability in yeast / S.P.Solow, L.Lezina, P.M.Lieberman // *Mol. Cell. Biol.* – 1999. – 19. – P. 2846–2852
3. Lezina L. Telomeric Proteins Regulate Episomal Maintenance of Epstein-Barr Virus Origin of Plasmid Replication / L.Lezina, Z.Deng, C-J.Chen, S.Shtivelband, W.So, P.M.Lieberman // *Molecular Cell.* – 2002. - Vol. 9. – P. 493–503.
4. Лёзина Л.Е. Исследование механизма связывания теломерных белков с сайтом инициации репликации Эпштейн-Барр вируса / Л.Е.Лёзина, О.Н.Ильинская, П.М.Либерман // *Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии: Сб. ст.* – Томск, 2004 – Т. 3 – С. 32–34.
5. Лёзина Л.Е. Идентификация белков, связывающихся с сайтом репликации Эпштейн-Барр вируса / Л.Е.Лёзина, О.Н.Ильинская, П.М.Либерман // *Материалы и технологии XXI века: Тез. док. IV научн. конференции молодых ученых.* – Казань, 2004 – С. 48

