

УДК 577.218

Теломерный белок Cdc13 дрожжей *Hansenula polymorpha*

А. Н. Малявко^{1*}, О. А. Донцова^{1,2,3}¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва, 119991 Россия²Сколковский институт науки и технологий, Москва, 121205 Россия³Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

*E-mail: malyavkoan@gmail.com

Поступила в редакцию 27.11.2019

Принята к печати 17.12.2019

DOI: 10.32607/actanaturae.10944

РЕФЕРАТ Теломеры – особые структуры на концах хромосом – играют важнейшую роль в защите генетической информации. Строение теломер чрезвычайно разнообразно, даже у близкородственных видов теломеры зачастую заметно различаются. В данной работе в клетках термотолерантных дрожжей *Hansenula polymorpha* мы идентифицировали гомолог теломерного белка Cdc13. Показано, что этот белок способен специфично связывать одноцепочечную ДНК теломер, а также взаимодействовать с белком Stn1. Обнаружено взаимодействие между Cdc13 и белком TERT (основной компонент теломеразного комплекса), что указывает на возможное участие Cdc13 в привлечении теломеразы на теломеры *H. polymorpha*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА теломеры, теломераза, Cdc13.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БСА – бычий сывороточный альбумин; оцДНК – одноцепочечная ДНК; PMSF – фенолметансульфонилфторид.

ВВЕДЕНИЕ

Теломеры – защитные структуры на концах эукариотических хромосом, состоящие из коротких повторяющихся G/C-богатых последовательностей ДНК и связанных с ними специальных теломерных белков. Особая организация концевых участков хромосом необходима для их защиты от узнавания системами репарации двухцепочечных разрывов. Теломеры – динамичные структуры: длина теломерной ДНК варьирует между хромосомами одной клетки и находится под влиянием множества факторов, регулирующих процессы укорочения (недорепликация, деградация) и удлинения (рекомбинация, теломераза) [1]. РНК-белковый комплекс теломеразы содержит теломеразную РНК (TER) с коротким участком, служащим матрицей для синтеза теломерных повторов, обратную теломеразную транскриптазу (TERT) и ряд вспомогательных белков, модулирующих синтез теломерной ДНК.

Помимо двухцепочечной ДНК теломеры большинства организмов содержат короткий G-богатый одноцепочечный участок (выступающий 3'-конец). В почкующихся дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* этот

участок ассоциирован с белком Cdc13 [2, 3], который играет ключевую роль в биогенезе теломер [4]. Так, мутация Cdc13-1 приводит к накоплению одноцепочечной теломерной ДНК и RAD9-зависимой остановке клеточного цикла в фазе G2/M [5]. Некоторые мутации в Cdc13 приводят к увеличению длины теломерной ДНК (например, V133E, K50Q, cdc13-5^{Δ894-924}) [6–8], в то время как мутации L91R, P235S, напротив, вызывают укорачивание теломер [6, 9], а штаммы с мутацией cdc13-2^{E252K} фенотипически не отличаются от штаммов с удаленными генами теломеразы [2]. Такие отличия связаны с нарушением белок-белковых взаимодействий, в которые вовлечены различные участки Cdc13. Этот белок состоит из четырех доменов, имеющих укладку типа OB-fold. Посредством домена OB3^{DBD} Cdc13 с высокой прочностью и специфичностью связывает теломерную оцДНК [10, 11]. N-Концевой домен OB1 необходим для димеризации белка, он участвует также в привлечении ДНК-полимеразы α к синтезу C-богатой цепи теломер [6, 7, 12, 13]. Домен OB2 содержит сигнал ядерной локализации, предположительно вносит вклад в димеризацию белка и связывание с другими

белковыми партнерами [14, 15]. Между OB1 и OB2 располагается домен RD, положительно влияющий на синтез теломерной ДНК за счет привлечения теломеразы на теломеры и ее активации [16]. В состав RD входят два коротких участка, которые отвечают за взаимодействия с вспомогательным белком теломеразы – Est1 [17]. С-Концевой домен OB4, по всей видимости, вовлечен во взаимодействие с белком Stn1 [4, 8, 14, 18]. Белки Cdc13, Stn1 и Ten1 образуют комплекс CST, который считается теломер-специфическим аналогом комплекса RPA и играет важнейшую роль на теломерах многих эукариотических организмов [19].

В процессе эволюции теломерные последовательности почкующихся дрожжей сильно изменились, тем не менее, у большинства изученных видов 3'-выступающие концы связаны гомологами Cdc13 [20]. Однако у многих видов дрожжей рода *Candida* гомологи Cdc13 дублированы (Cdc13A и Cdc13B) [21]. Кроме того, каждый из гомологов обладает только двумя (из четырех) OB-fold-доменами, которые, по всей видимости, соответствуют OB3^{DBD} и OB4 [22, 23]. Несмотря на потерю OB1 и OB2, эти белки способны связывать теломерную ДНК и Stn1, они участвуют в регуляции длины теломер и проявляют склонность к димеризации [23, 24]. При этом у *C. parapsilopsis* связывать ДНК с высокой аффинностью способен только гетеродимер Cdc13A/Cdc13B [25].

В данной работе нами описан гомолог Cdc13 термотолерантных дрожжей *Hansenula polymorpha* – вида, эволюционно значительно удаленного как от *S. cerevisiae*, так и от видов рода *Candida*. Обнаружено, что по доменной организации HpCdc13 близок к Cdc13 *C. albicans*, но его ген представлен в геноме одной копией. HpCdc13 обладает свойствами, описанными для Cdc13 других дрожжей: он специфично связывается с оцДНК теломер, димеризуется, взаимодействует с Stn1. Более того, нами показано, что HpCdc13, несмотря на отсутствие RD-домена, способен взаимодействовать с теломеразой *H. polymorpha*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Экспрессия и выделение белка HpCdc13

Ген *Cdc13* из штамма *H. polymorpha* DL-1 (ATCC 26012, или *Ogataea parapolyomorpha* DL-1) клонировали в вектор pET30aTEV (любезно предоставленный Даниелой Родэс (Кембридж, MRC LMB, Великобритания)), который кодирует аффинные эпитопы 6His и S (добавляемые на N-конец белка), отсекаемые протеазой TEV. Полученной плазмидой трансформировали штамм *Escherichia coli* BL21

Star (DE3) pRARE. Синтез белка индуцировали 1 mM изопропилтио-β-D-галактозидом при 21°C в течение ~16 ч.

Клетки осаждали центрифугированием, ресуспендировали в буфере для лизиса (50 mM бис-Трис-пропан, pH 8.0, 500 mM NaCl, 10 mM β-меркаптоэтанол, 10% глицерин, 0.05% Твин 20, 30 mM имидазол, 1× коктейль ингибиторов протеаз и фосфатаз Halt (Thermo Fisher Scientific, США)) и разрушали ультразвуком (амплитуда 80%; 2 раза по 2 мин: 3 с каждые 10 с). Белок инкубировали в течение 30 мин с Ni-NTA-агарозой, промывали 4 раза буфером для лизиса, затем элюировали буфером для лизиса с добавлением 300 mM имидазола.

Затем буфер заменяли на TEV-буфер (50 mM бис-Трис-пропан, pH 8.0, 300 mM NaCl, 1 mM дитиотреитол, 10% глицерин, 0.05% Твин 20, 0.3 mM PMSF) при помощи гель-фильтрационных колонок PD Minitrap G-25 (Sigma, США). 6His-S-эпитоп отрезали рекомбинантной TEV-протеазой (50 мкг на 1 мг Cdc13), инкубируя при +4°C в течение ~16 ч.

Отрезанный эпитоп и TEV-протеазу (тоже содержит 6His-эпитоп) удаляли при помощи дополнительной очистки на Ni-NTA-агарозе. В этих условиях HpCdc13 без эпитопа способен связываться с Ni-NTA, но легко смывается TEV-буфером с добавлением 50 mM имидазола. Затем буфер заменяли буфером для хранения (50 mM бис-Трис-пропан, pH 8.0, 300 mM NaCl, 1 mM дитиотреитол, 5% глицерин, 0.3 mM PMSF) при помощи PD Minitrap G-25 (Sigma) и хранили при +4°C. Концентрацию белка измеряли спектрофотометрически по поглощению при λ = 280 нм (коэффициент экстинкции рассчитывали при помощи ExPaSy ProtParam).

Электрофоретический анализ связывания Cdc13 с ДНК в полиакриламидном геле

Олигонуклеотиды метили по 5'-концу с помощью T4-полинуклеотидкиназы и [γ-³²P]АТФ (Thermo Fisher Scientific) согласно протоколу производителя, затем очищали на колонках Illustra MicroSpin G-25 (GE Healthcare). Связывание проводили в 20 мкл смеси, содержащей 0.1 нМ олигонуклеотид, 1–300 нМ Cdc13, 10 mM бис-Трис-пропан, pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.5 mM дитиотреитол, 5% глицерин, 0.5 мг/мл БСА. Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин, добавляли 1 мкл буфера для нанесения (0.5× Трис-боратный буфер, 50% глицерин, бромфеноловый синий, ксиленцианол) и наносили на 8% полиакриламидный гель (содержащий 1× Трис-боратный буфер и 5% глицерин). Электрофорез проводили в течение 35 мин при 180 В при комнатной температуре. Радиоактивный сигнал детектировали с помощью системы Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare).

Дрожжевая двугибридная система

Векторы pGADT7 (для получения белка, слитого с доменом Gal4-AD) и pGBKT7 (для получения белка, слитого с доменом Gal4-BD) и штамм *S. cerevisiae* AH109 любезно предоставлены С.С. Соколовым (лаборатория фотохимии биомембран, МГУ им. М.В. Ломоносова). Анализируемые гены *H. polymorpha* DL-1 были клонированы в векторы pGADT7 и pGBKT7 по сайтам SmaI/NdeI и SmaI/NotI соответственно; за исключением *CDC13*, который клонировали в плазмиду pGADT7 по сайтам SmaI/EcoRI. В случае EST1 был клонирован участок, кодирующий аминокислотные остатки 1–591, поскольку попытка экспрессировать полноразмерный белок в штамме AH109 не привела к получению жизнеспособных колоний. Стоит отметить, что данный фрагмент EST1 высококонсервативен – известно, что соответствующий фрагмент из дрожжей *Kluyveromyces lactis* содержит все участки, необходимые для взаимодействия с Cdc13 [17]. Анализируемые пары плазмид трансформировали в штамм AH109 по описанному протоколу [26], отбор клонов проводили на селективной среде SC-Leu-Trp. Единичные колонии ресуспендировали в стерильной воде и высевали на чашки с 2% агаром и необходимой селективной средой (SC-Leu-Trp или SC-Leu-Trp-His).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поиск гомолога Cdc13 в *H. polymorpha*

С целью обнаружения гомолога Cdc13 был проведен итеративный поиск PSI-BLAST по базе всех аннотированных белков почкующихся дрожжей с использованием в качестве поискового запроса последовательности белка Cdc13A *C. albicans*. В результате в *H. polymorpha* DL-1 обнаружили открытую рамку считывания HPODL_00415 (в базе данных Uniprot – W1QJ57) длиной 403 аминокислотных остатка, что значительно короче ScCdc13 (924 аминокислотных остатка), но примерно совпадает с длиной CaCdc13 (447 аминокислот). Уровень гомологии CaCdc13 и HPODL_00415 (далее HpCdc13) крайне низок: белки имеют лишь 15% идентичных и 31% схожих аминокислот, что распространено среди гомологов теломерных белков. Мы также провели поиск гомологов HPODL_00415 среди белков с известной структурой при помощи сервера HHpred, который использует при выравнивании не только последовательность, но и предсказанную вторичную структуру белков. Оказалось, что N-концевая часть HpCdc13 похожа на ДНК-связывающий домен OB3^{DBD} белка Cdc13 *S. cerevisiae* (PDB: 1KXL_A). Вторая копия гена *CDC13* в геноме *H. polymorpha* DL-1 не обнаружена. Таким образом, мы заключаем, что в клетках

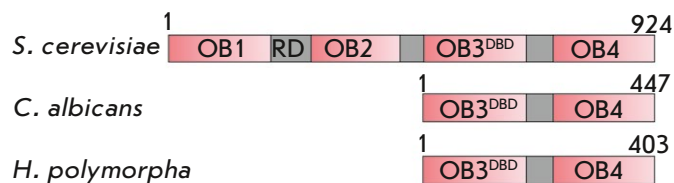


Рис. 1. Схема доменной организации гомологов Cdc13. Указаны номера первого и последнего аминокислотного остатка

H. polymorpha нами обнаружен вероятный гомолог белка Cdc13, доменная организация которого, скорее всего, сходна с организацией CaCdc13 (два OB-fold-домена, соответствующих OB3^{DBD} и OB4 ScCdc13) (рис. 1).

ДНК-связывающие свойства Cdc13 из *H. polymorpha*

Чтобы подтвердить, что обнаруженный нами гомолог Cdc13 может быть фактором, ассоциированным с 3'-выступающим концом теломер *H. polymorpha*, мы изучили способность этого белка связывать ДНК *in vitro*. Мы экспрессировали HpCdc13 в *E. coli* и выделили рекомбинантный белок при помощи аффинной хроматографии (рис. 2А). Полученный препарат белка инкубировали с различными ДНК-олигонуклеотидами и оценивали эффективность их связывания по изменению электрофоретической подвижности в нативном полиакриламидном геле. Как и следовало ожидать, HpCdc13 связывает олигонуклеотид G2, содержащий два теломерных повтора *H. polymorpha* (рис. 2Б, таблица). Наблюдали довольно прочное взаимодействие: больше половины G2 ДНК находится в комплексе при концентрации Cdc13 всего 1 нМ (рис. 2Б). В тех же условиях Cdc13 не связывает олигонуклеотиды C4 и GC4, содержащие четыре повтора C-цепи теломер и четыре повтора двухцепочечной теломерной ДНК соответственно, а также контрольный олигонуклеотид rnd с нетеломерной последовательностью. Следовательно, Cdc13 взаимодействует специфически с G-богатым 3'-выступающим концом теломер. Мы также протестировали два олигонуклеотида с G-богатой последовательностью, но отличной от теломерной ДНК *H. polymorpha* (олигонуклеотиды SACCE и CANAR, содержащие теломерные повторы *S. cerevisiae* и *C. arabinofermentans* соответственно, таблица). Оказалось, что Cdc13 способен связать эти олигонуклеотиды, однако получающиеся комплексы были нестабильными (в отличие от комплекса Cdc13-G2) и разрушались в процессе электрофореза. Таким образом, показано, что обнаруженный нами гомолог Cdc13 может распознавать 3'-выступающий конец теломер *H. polymorpha*.

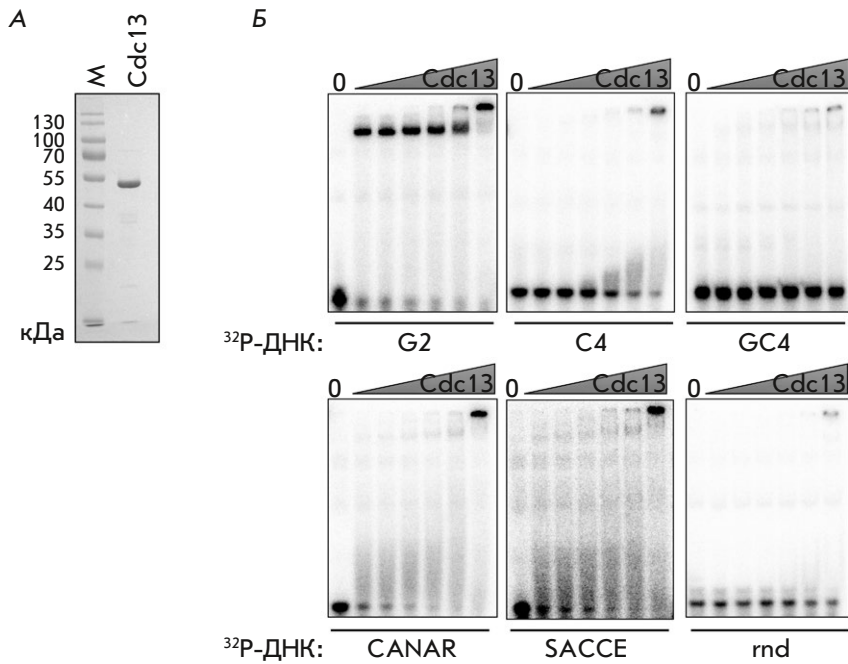


Рис. 2. ДНК-связывающие свойства рекомбинантного Cdc13 *H. polymorpha*. А – анализ выделенного и очищенного рекомбинантного Cdc13 в денатурирующем полиакриламидном геле. М – маркер длины. Б – 0.1 нМ олигонуклеотид инкубировали с Cdc13 в возрастающей концентрации (1, 3, 10, 30, 100, 300 нМ) и анализировали с помощью электрофореза в нативном полиакриламидном геле. Названия олигонуклеотидов указаны под каждой из электрофореграмм, их последовательности приведены в таблице

ДНК-олигонуклеотиды, использованные в работе

Олигонуклеотид	Последовательность (5' → 3')
G2	GTAGATACGACTCACTGGGTGGCGGGGTGGCG
C4	GCCACCCCGCCACCCCGCCACCCCGCCACCCC
GC4 (sense)	GGGTGGCGGGGTGGCGGGGTGGCGGGGTGGCG
GC4 (antisense)	CGCCACCCCGCCACCCCGCCACCCCGCCACCCC
CANAR	GGTGTGGGTGTTGGGTGTTGGG
SACCE	GTGTGTGGGTGTGTGGGTGTGTG
rnd	GTAGATACGACTCACTGTAGATACGACTCACT

НpCdc13 как компонент комплекса CST

Другой важной отличительной чертой дрожжевых белков Cdc13 является тот факт, что они входят в состав комплекса CST. В составе комплекса Cdc13 контактирует непосредственно с белком Stn1, который, в свою очередь, связан с Ten1 [19]. Существование таких взаимодействий у гомологов *H. polymorpha* мы проверили при помощи дрожжевой двугибридной системы на основе штамма AH109 *S. cerevisiae*, используя ген *HIS3* в качестве репортерного. В данной системе связывание белков можно детектировать по способности штамма расти на среде без гистидина. Действительно, мы наблюдали взаимодействие между парами белков Cdc13–Stn1 и Stn1–Ten1 *H. polymorpha*, но не Cdc13–Ten1 (рис. 3А), как описано у других видов дрожжей. Кроме того, по данным, полученным в двугибридной системе, Cdc13 (а также Stn1) *H. polymorpha* проявляет способность димеризоваться (рис. 3А), что также известно на примере других видов дрожжей [4]. Таким образом, Cdc13 *H. polymorpha* может входить в состав комплекса CST.

Возможная функция Cdc13 на теломерах *H. polymorpha*

Важная черта гомологов Cdc13 из *S. albicans* и *H. polymorpha*, отличающая их от Cdc13 из *S. cerevisiae*, – небольшой размер, а именно, отсутствие двух N-концевых ОВ-доменов и участка RD между ними (рис. 1). В клетках *S. cerevisiae* этот участок отвечает за взаимодействие Cdc13 с компонентом теломеразного комплекса Est1, что необходимо для посадки теломеразы на 3'-конец теломер и синтеза теломерной ДНК [17]. Означает ли отсутствие RD-домена в укороченных гомологах Cdc13 потерю этой важной функции? Мы протестировали НpCdc13 и НpEst1 при помощи двугибридной системы и не обнаружили взаимодействия между этими белками (рис. 3Б), что согласуется с отсутствием RD-домена в Cdc13 *H. polymorpha*. Однако мы наблюдали взаимодействие между НpCdc13 и НpTERT – основным компонентом теломеразного комплекса. Этот результат указывает на то, что Cdc13 *H. polymorpha* все-таки может выполнять функцию привлечения

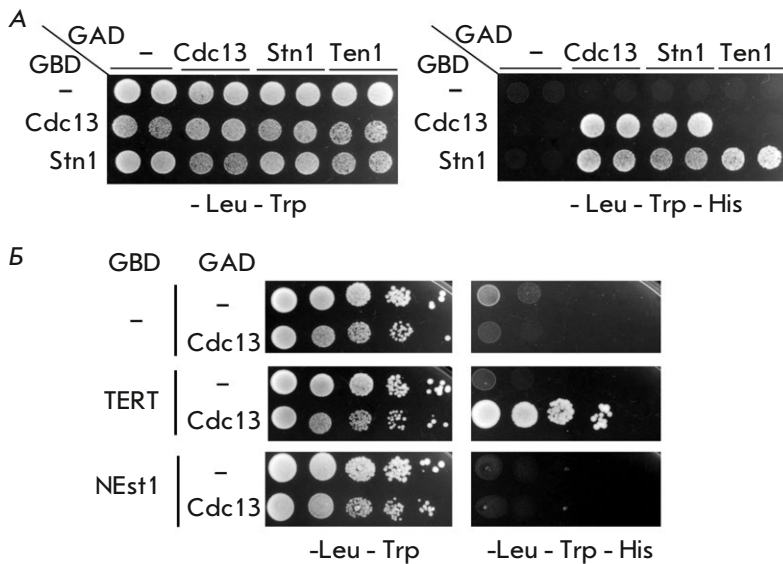


Рис. 3. Белок-белковые взаимодействия Cdc13 из *H. polymorpha*, установленные при помощи дрожжевой двугибридной системы. А – колонии клеток АН109, экспрессирующие пары указанных белков (слитых с Gal4-BD (GBD) или с Gal4-AD (GAD)), были разбавлены до $A_{600} \sim 0.05$, высеваны на чашки со средой SC без указанных аминокислот (приведены под чашками) и проинкубированы при 30°C в течение 4 дней. Для каждой пары белков высевали по две колонии соответствующего штамма. Б – то же, что и А, только с другими парами белков. На чашки высевали клетки с $A_{600} \sim 0.5$ и четыре десятикратных разведения

теломеразы на теломеры, хотя механизм этого привлечения иной, чем в *S. cerevisiae*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе идентифицирован белок *H. polymorpha*, способный выполнять функцию фактора, ассоциированного с 3'-выступающим концом теломер. Как и Cdc13 из дрожжей рода *Candida*, обнаруженный нами белок по своей структуре значительно отличается от гомолога в *S. cerevisiae*. Наши резуль-

таты свидетельствуют в пользу того, что Hrcdc13 взаимодействует с каталитической субъединицей теломеразы, что, вероятно, важно для ассоциации теломеразы и 3'-конца теломер. Полученные данные расширяют понимание механизмов регуляции длины теломер у эукариотических организмов. ●

Исследования поддержаны Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 17-04-01692 А).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Shay J.W., Wright W.E. // Nat. Rev. Genet. 2019. V. 20. № 5. P. 299–309.
- Nugent C.I., Hughes T.R., Lue N.F., Lundblad V. // Science. 1996. V. 274. № 5285. P. 249–252.
- Lin J.-J., Zakian V.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. № 24. P. 13760–13765.
- Mersaoui S.Y., Wellinger R.J. // Curr. Genet. 2019. V. 65. № 1. P. 109–118.
- Garvik B., Carson M., Hartwell L. // Mol. Cell. Biol. 1995. V. 15. № 11. P. 6128–6138.
- Sun J., Yang Y., Wan K., Mao N., Yu T.-Y., Lin Y.-C., DeZwaan D.C., Freeman B.C., Lin J.-J., Lue N.F., et al. // Cell Res. 2011. V. 21. № 2. P. 258–274.
- Qi H., Zakian V.A. // Genes Dev. 2000. V. 14. № 14. P. 1777–1788.
- Chandra A., Hughes T., Nugent C., Lundblad V. // Genes Dev. 2001. V. 15. № 4. P. 404–414.
- Meier B., Driller L., Jaklin S., Feldmann H.M. // Mol. Cell. Biol. 2001. V. 21. № 13. P. 4233–4245.
- Hughes T.R., Weilbaecher R.G., Walterscheid M., Lundblad V. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. № 12. P. 6457–6462.
- Mitton-Fry R.M., Anderson E.M., Theobald D.L., Glustrom L.W., Wuttke D.S. // J. Mol. Biol. 2004. V. 338. № 2. P. 241–255.
- Mitchell M.T., Smith J.S., Mason M., Harper S., Speicher D.W., Johnson F.B., Skordalakes E. // Mol. Cell. Biol. 2010. V. 30. № 22. P. 5325–5334.
- Hsu C.-L. // Nucl. Acids Res. 2004. V. 32. № 2. P. 511–521.
- Mason M., Wanat J.J., Harper S., Schultz D.C., Speicher D.W., Johnson F.B., Skordalakes E. // Structure. 2013. V. 21. № 1. P. 109–120.
- Mersaoui S.Y., Bonnell E., Wellinger R.J. // Nucl. Acids Res. 2018. V. 46. № 6. P. 2975–2989.
- Pennock E., Buckley K., Lundblad V. // Cell. 2001. V. 104. № 3. P. 387–396.
- Chen H., Xue J., Churikov D., Hass E.P., Shi S., Lemon L.D., Luciano P., Bertuch A.A., Zappulla D.C., Géli V., et al. // Cell. 2018. V. 172. № 1–2. P. 331–343.e13.
- Hang L.E., Liu X., Cheung I., Yang Y., Zhao X. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2011. V. 18. № 8. P. 920–926.
- Rice C., Skordalakes E. // Computational Struct. Biotechnol. J. 2016. V. 14. P. 161–167.
- Steinberg-Neifach O., Lue N.F. // Front. Genet. 2015. V. 6. P. 162.
- Lue N.F., Chan J. // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. № 40. P. 29115–29123.
- Sun J., Yu E.Y., Yang Y., Confer L.A., Sun S.H., Wan K., Lue N.F., Lei M. // Genes Dev. 2009. V. 23. № 24. P. 2900–2914.
- Yu E.Y., Sun J., Lei M., Lue N.F. // Mol. Cell. Biol. 2012. V. 32. № 1. P. 186–198.
- Lue N.F., Zhou R., Chico L., Mao N., Steinberg-Neifach O., Ha T. // PLoS Genet. 2013. V. 9. № 1. P. e1003145.
- Steinberg-Neifach O., Wellington K., Vazquez L., Lue N.F. // Nucl. Acids Res. 2015. V. 43. № 4. P. 2164–2176.
- Gietz R.D., Schiestl R.H. // Nat. Protocols. 2007. V. 2. № 1. P. 31–34.