

На правах рукописи

МАЛЯВКО АЛЕКСАНДР НИКОЛАЕВИЧ

РЕГУЛЯЦИЯ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР ДРОЖЖЕЙ
Hansenula polymorpha

02.00.10 – биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук**

Москва – 2014

Работа выполнена на кафедре химии природных соединений Химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Научные руководители:

Донцова Ольга Анатольевна, доктор химических наук, профессор, член-корр. РАН, Химический факультет Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Зверева Мария Эмильевна, кандидат химических наук, доцент, Химический факультет Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Официальные оппоненты:

Туницкая Вера Леонидовна, доктор химических наук, ведущий научный сотрудник Лаборатории молекулярных основ действия физиологически активных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

Агафонов Михаил Олегович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Лаборатории молекулярной генетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимии имени А.Н. Баха Российской академии наук.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт Биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Защита состоится 16 декабря 2014 года в 17 часов на заседании Диссертационного совета Д 501.001.41 по химическим наукам при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40, НИИ ФХБ, аудитория 501.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова и на сайте Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (по адресу <http://www.chem.msu.ru/rus/theses/2014/2014-09-25-malyavko/>).

Автореферат разослан 2014 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук, доцент

Смирнова И. Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Концы эукариотических хромосом (теломеры) имеют структуру отличную от внутренних участков хромосом. Особое строение теломер позволяет им выполнять важнейшие функции, такие как защита хромосом от слияния и деградации, что необходимо для поддержания стабильности генома и жизнеспособности клеток. Однако, в результате недорепликации при каждом клеточном делении теломеры укорачиваются, и по достижении теломерами критической длины клетки гибнут. Теломераза – ферментативный комплекс, способный синтезировать теломерную ДНК, поддерживая длину теломер на нормальном уровне. Неограниченный пролиферативный потенциал одноклеточных эукариот, половых и стволовых клеток поддерживается за счёт теломеразы. Примечательно, что большинство типов раковых клеток также активирует теломеразу, и это придаёт им возможность делиться бесконечно. Поэтому теломераза является привлекательной мишенью для противоопухолевой терапии.

Стабильность генома обеспечивается контролем длины теломер, что включает в себя регуляцию различных и иногда противоположных по действию ферментов: нуклеаз, репликативных полимераз и теломеразы. Тем не менее, многие аспекты регуляции длины теломер до сих пор остаются невыясненными. За последние десятилетия было изучено множество факторов, отвечающих за контроль длины теломер различных организмов. Наибольшее количество данных получено для дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Однако, детали функционирования теломерных белков и теломеразы человека сильно отличаются от таковых в *S. cerevisiae*. Сравнительный анализ может выявить консервативные и видоспецифические аспекты регуляции длины теломер, поэтому изучение функционирования теломеразы и теломерных белков других видов почкующихся дрожжей является актуальной задачей.

Данная работа посвящена изучению регуляции длины теломер дрожжей *Hansenula polymorpha*. Этот модельный организм, сохраняя преимущества работы с одноклеточными эукариотами, обладает рядом особых интересных свойств. *H. polymorpha* является термотолерантным организмом, что должно облегчать *in vitro* работу с его молекулярными компонентами. Также *H. polymorpha* отличается от *S. cerevisiae* особенно короткими теломерами и гомогенностью теломерных повторов, что делает изучение регуляции длины теломер дрожжей *H. polymorpha* интересной и актуальной задачей.

Особенностью теломеразы *H. polymorpha* является необычное свойство матричного участка теломеразной РНК (HrTER). *In vitro* теломераза *H. polymorpha* удлиняет ДНК

субстрат на один дополнительный нуклеотид (по сравнению с ожидаемым количеством нуклеотидов), и такое добавление является результатом обратной транскрипции нуклеотида A170 HpTER. Более того, получающийся продукт удлинения не является больше субстратом для теломеразы *in vitro*, значит обратная транскрипция A170 должна ограничивать работу теломеразы и, следовательно, длину теломер *in vivo*. Однако, экспериментальных подтверждений возможности регуляции длины теломер *in vivo* при помощи обратной транскрипции A170 получено не было.

Цель работы:

Охарактеризовать регуляцию длины теломер дрожжей *Hansenula polymorpha*:

1. Изучить возможность регуляции длины теломер при помощи обратной транскрипции A170.
2. Проанализировать белки, участвующие в регуляции длины теломер.

Новизна и практическая значимость работы. В представленной работе охарактеризована регуляция длины теломер дрожжей *Hansenula polymorpha*. Результаты проведённых экспериментов показали существование в этом виде почкующихся дрожжей двух факторов, ограничивающих длину теломер.

Первый из них – обратная транскрипция нуклеотида A170 теломеразной РНК *H. polymorpha* и, как результат, встраивание дополнительного dT нуклеотида. Этот процесс ограничивает длину теломер *H. polymorpha* за счёт нарушения способности продукта удлинения теломеразой репозиционироваться в начало матричного участка. Аналогов данному способу регуляции активности теломеразы в других организмах не найдено. В литературе описаны примеры включения неверных нуклеотидов на 3'-конец теломерного повтора *in vitro*, однако эти случаи являлись результатом мутаций компонентов теломеразы. Таким образом, данное свойство теломеразы является новым способом контроля длины теломер.

Второй важный фактор контроля теломер *H. polymorpha* – белок Rif1. Удаление гена этого белка приводит к удлинению теломер *H. polymorpha*, следовательно, его функция заключается в ингибировании работы теломеразы. Участие этого белка в регуляции теломеразы является общим, по крайней мере, для двух других эволюционно далёких видов дрожжей – *S. cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*. Однако, полученные в работе данные говорят о различии механизмов действия гомологов Rif1 в *H. polymorpha* и *S. cerevisiae*.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались на следующих конференциях: CSHL Meeting "Telomeres and telomerase", Нью-Йорк, США, 30 апреля-4 мая, 2013; FEBS Congress 2013 "Mechanisms in Biology", Санкт-Петербург, Россия, 7-11 июля, 2013; GDRI

meeting 2014 "From Molecular to Cellular Events in Human Diseases", Париж, Франция, 17-19 октября, 2013.

Структура и объём работы. Диссертационная работа изложена на 100 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, результаты и обсуждение, материалы и методы, выводы и список литературы. Материал иллюстрирован 34 рисунками и 5 таблицами. Библиографический указатель включает 187 процитированных работ.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Обратная транскрипция A170

Детекция дополнительного dT на теломерах in vivo

На основании комплементарности теломерному повтору матричный участок HpTER должен представлять собой последовательность из 17 нуклеотидов (комплементарную двум повторам GGGTGGCG + ещё один нуклеотид – C187, рисунок 1). Однако, ранее проведённая характеристика теломеразной активности *H. polymorpha in vitro* выявила использование для обратной транскрипции дополнительного нуклеотида – A170. Так, к олигонуклеотиду G4 5'-(GGGTGGCG)₄-3' вместо одного повтора 5'-GGGTGGCG-3' теломераза добавляет последовательность 5'-GGGTGGCGT-3' (Рисунок 1). Следовательно, вместо предсказанных 17 нуклеотидов, матричный участок HpTER содержит 18.

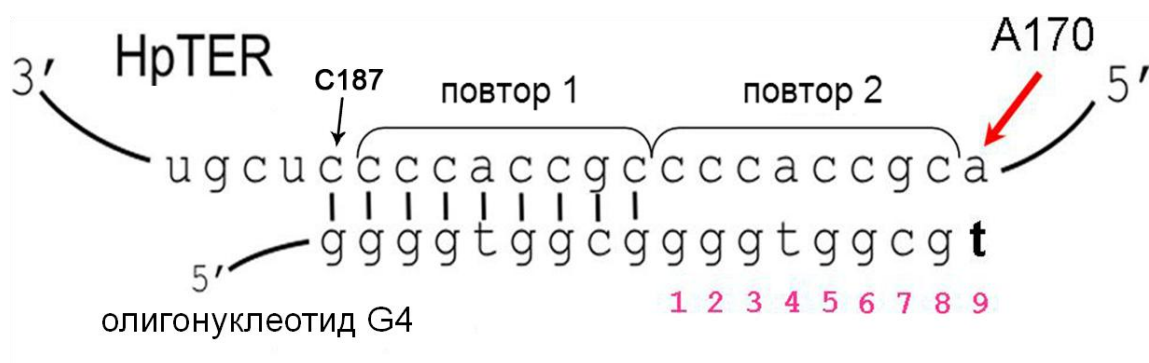


Рисунок 1. Схема удлинения олигонуклеотида G4 теломеразой *H. polymorpha in vitro*.

Однако, среди последовательностей теломер, полученных в результате секвенирования генома *H. polymorpha*, не было обнаружено ни единого случая присутствия дополнительного dT после последовательности 5'-GGGTGGCG-3'. Последовательность 5'-GGGTGGCGT-3' не является субстратом теломеразы *in vitro*, поскольку не может отжигаться в матричном участке, значит, дополнительный dT может

удаляться для работы теломеразы, что должно затруднять его детекцию в составе теломерных повторов *in vivo*.

Невозможность использования теломеразой последовательности 5'-GGGTGGCGT-3' *in vitro* и необходимость удаления дополнительного dT для работы теломеразы означает, что единственным местом в теломере где dT может находиться (если транскрипция A170 происходит) – самый 3'-конец теломеры. Анализируемые ранее последовательности теломер, полученные в результате секвенирования генома *H. polymorpha*, могли не содержать концевых теломерных повторов, и поэтому включения dT не наблюдали.

Для того, чтобы получить последовательности теломер *H. polymorpha* вместе с концевыми повторами было решено применить следующий подход. Первый этап – получение фрагментов, содержащих теломерные последовательности *H. polymorpha*, при помощи «теломерного» ПЦР, второй – высокопроизводительное секвенирование полученных фрагментов. «Теломерный» ПЦР проводили по методике, успешно применяемой ранее для получения последовательностей теломер в других организмах, с небольшой модификацией (Рисунок 2).

«Теломерный» ПЦР

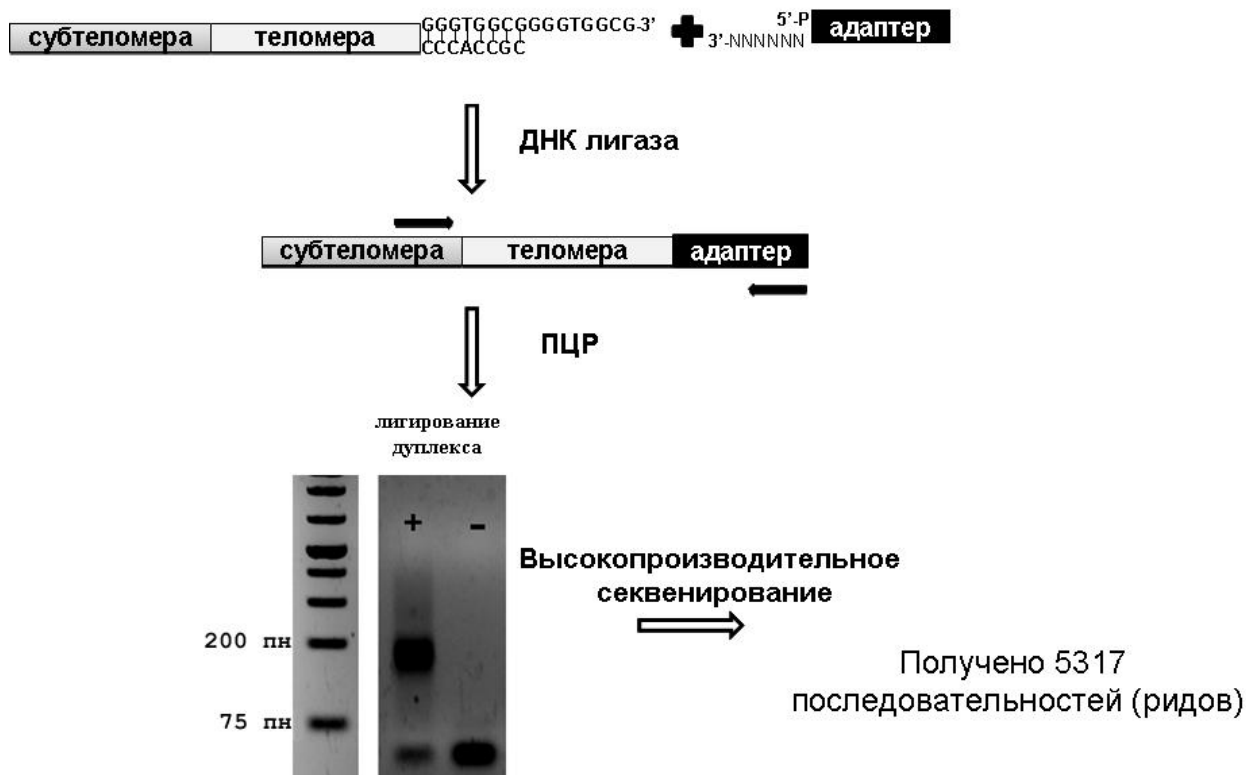


Рисунок 2. Схема эксперимента для определения последовательностей теломерных повторов *H. polymorpha*.

К геномной ДНК из штамма *H. polymorpha* дикого типа (DL1-1) лигировали заранее сформированный короткий двуцепочечный фрагмент ДНК с 3'-выступающей одноцепочечной случайной последовательностью («адаптер»). Выступающий конец «адаптера» нужен, поскольку теломеры также имеют 3'-выступающий конец; а случайная последовательность позволяет «адаптеру» присоединиться ко всем теломерам независимо от точной последовательности последнего теломерного повтора. Далее проводили ПЦР с использованием олигонуклеотида, комплементарного субтеломерной области, и другого олигонуклеотида, комплементарного последовательности адаптера, в качестве прямого и обратного праймеров, соответственно. В результате получали ДНК фрагмент длиной около 200 пн, содержащий теломерные повторы *H. polymorpha* (Рисунок 2).

Последовательности теломерных повторов в полученных ДНК фрагментах определяли при помощи высокопроизводительного секвенирования (по методу Roche/454 Life Sciences). Секвенирование проводили в лаборатории Николая Викторовича Равина (Центр «Биоинженерия» РАН). В результате было получено 5317 последовательностей (ридов). Риды получались в результате прочтения ДНК как с прямого праймера (тогда рид представляет собой G-цепь теломеры), так и с обратного (C-цепь теломеры). Большинство ридов представляли собой продукты неполного прочтения ДНК фрагментов, однако, встречались и «полноразмерные» риды. Пример такого «полноразмерного» рида представлен на рисунке 3. На данном примере хорошо видно, что внутренние теломерные повторы представлены последовательностью 5'-GGGTGGCG-3' (либо допустимыми вариантами, с пропусками G в указанных позициях: 5'-GGGTGGCG-3'), и только самый последний повтор (непосредственно перед адаптером) имеет dT нуклеотид в нужном положении 5'-GGGTGGCGT-3'.

>H9J94MM01DGYI7 length=181 xy=1306_0833 region=1 run=R_2013_05_16_16_15_48_
 AAGCGCAGAGTTGGTTTTCAAGATGCGGTCTGAGGCTCTGGTGGCGGGT
 GCGGGTGGCGGGTGGTGGCGGGTGGCGGGTGGCGGGTGGCGGGTGGCGGGTGGCG
 GGGTGGCGGGTGGCGGGTGGCGGGTGGCGGGTGGCGGGTGGCGGGTGGCG
 GGGTGGCGGGTGGCGGTATCTACAGTGAGTCGTACGC

Рисунок 3. Пример «полноразмерного» рида ПЦР фрагмента, содержащего теломерную ДНК *H. polymorpha*. Серым цветом выделена субтеломерная часть, чёрным – адаптерная последовательность. Последний теломерный повтор подчёркнут. Дополнительный dT нуклеотид выделен красным цветом.

Таким образом, дополнительный dT нуклеотид действительно встречается в теломерах *H. polymorpha* в составе последнего теломерного повтора. Мы решили проанализировать частоту встречаемости dT среди полученных в данном эксперименте ридов. Поскольку большинство ридов были продуктами неполного прочтения ДНК фрагментов, и среди внутренних теломерных повторов дополнительный dT не находился, то мы проанализировали только риды, содержащие крайние повторы (таких ридов оказалось 1248). Среди этих ридов мы посчитали процентное содержание каждого из возможных вариантов последовательности последнего повтора. Результаты данного анализа представлены на рисунке 4.

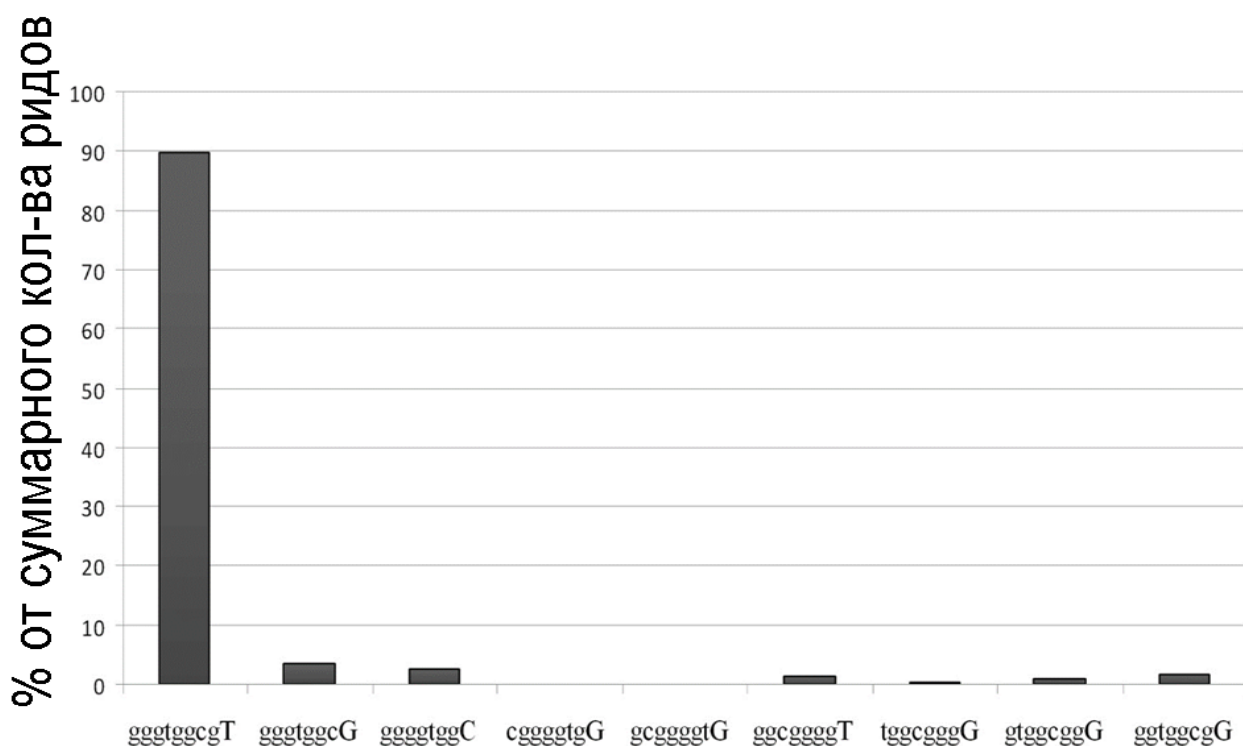


Рисунок 4. Частота встречаемости каждого из вариантов конечного теломерного повтора.

В результате оказалось, что подавляющее большинство (90%) всех проанализированных конечных повторов представлено последовательностью 5'-GGGTGGCGT-3'. Этот результат свидетельствует в пользу того, что практически каждая теломера в клетке *H. polymorpha* содержит дополнительный dT на самом 3'-конце.

Влияние мутаций нуклеотида A170 HpTER на длину теломер

Для того, чтобы изучить функциональное значение обратной транскрипции A170 и включения дополнительного dT на конец теломеры, мы провели мутагенез матричного участка HpTER. В первую очередь мы заменили нуклеотид A170 в матричном участке на каждый из трёх других возможных нуклеотидов (A170U, A170C, A170G).

Для получения штаммов *H. polymorpha*, экспрессирующих мутантные формы HpTER, штамм, в котором удалён ген теломеразной РНК (Δ HpTER), был трансформирован плазмидами, несущими ген *HpTER* с мутацией. Длина теломер в полученных штаммах измерялась методом Саузерн блот анализа концевых рестрикционных фрагментов. Этот метод заключается в обработке геномной ДНК эндонуклеазой рестрикции, разделении полученных фрагментов в агарозном геле, переносе ДНК на мембрану и визуализации фрагментов, содержащих теломерные повторы, гибридизацией с радиоактивно-меченным олигонуклеотидом 5'-(GGGTGGCG)₄-3'. По разнице в подвижности в агарозном геле фрагментов, содержащих теломерные повторы, можно судить о длине теломер.

Результаты измерения длины теломер в штаммах с мутациями A170U, A170C и A170G представлены на рисунке 5. Из полученных данных видно, что введение мутации A170C в матричный участок теломеразной РНК *H. polymorpha* приводит к значительному увеличению длины теломер. Возрастает как средняя длина, так и гетерогенность длины. В то же время мутации A170U и A170G практически не влияют на длину теломер.

Каким же образом мутация A170C может приводить к увеличению длины теломер? Для ответа на этот вопрос нужно сравнить между собой продукты удлинения теломеразой с различными нуклеотидами в положении 170 матричного участка HpTER (Рисунок 6). Если в положении 170 находится аденозин (ситуация дикого типа), то в результате синтеза теломерной ДНК последним нуклеотидом оказывается «нетеломерный» dT. Как уже упоминалось, такой продукт действия теломеразы не может быть использован для синтеза следующего теломерного повтора до тех пор, пока дополнительный dT не будет удалён с 3'-конца ДНК. Необходимость проведения этого дополнительного шага должна ограничивать работу теломеразы. В случае мутаций A170G и A170U в HpTER, продукт удлинения теломеразой также не может являться субстратом теломеразы, ведь на 3'-конец теломер присоединяются нуклеотиды (dC и dA), не присутствующие в данном положении теломерных повторов в норме (Рисунок 6).

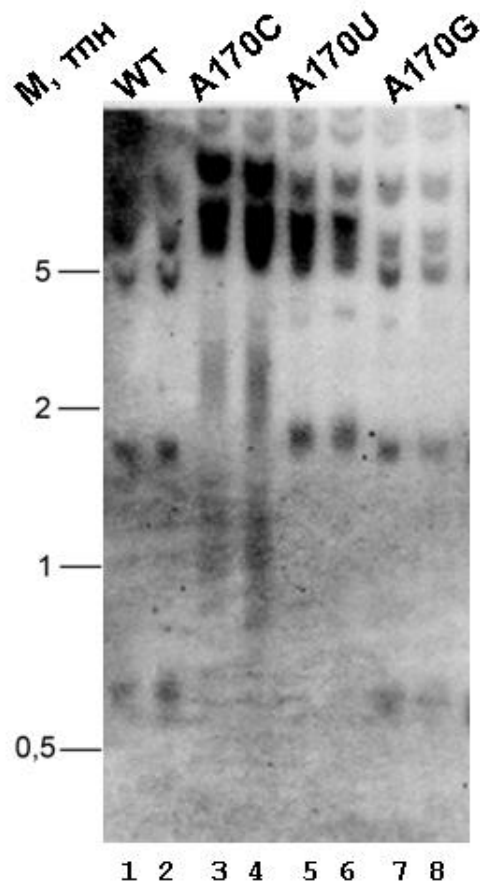


Рисунок 5. Саузерн блот анализ концевых рестриционных фрагментов в штаммах с мутациями A170C (дорожки 3, 4), A170U (дорожки 5, 6) и A170G (дорожки 7, 8). В качестве контроля использовали штамм $\Delta HpTER$, трансформированный плазмидой с геном HpTER дикого типа (WT, дорожки 1 и 2). М – маркер.



Рисунок 6. Схема влияния мутаций A170 на синтез теломерной ДНК теломеразой.

Напротив, замена аденозина в 170-м положении на цитозин радикально изменяет ситуацию. В качестве последнего нуклеотида теломеразы с мутацией A170C добавляет dG – нуклеотид, который и должен находиться в этом месте повтора. Продукт работы теломеразы оказывается полностью комплементарным началу матричного участка, следовательно, мутация A170C в HpTER снимает необходимость удаления 3'-концевого нуклеотида перед следующим раундом синтеза теломерного повтора (Рисунок 6). Это должно приводить к увеличению числа теломерных повторов, добавленных теломеразой. Действительно, наблюдаемая в данном эксперименте длина теломер в штаммах с мутациями A170G и A170U практически не отличается от штамма дикого типа (Рисунок 5), тогда как результатом введения мутации A170C являются удлинённые и гетерогенные теломеры в соответствующем штамме (Рисунок 5).

С другой стороны, полученному результату могут быть даны альтернативные объяснения. Например, мутация A170C (но не A170G и A170U) в матричном участке HpTER может приводить к снижению эффективности добавления дополнительного нуклеотида. Это также привело бы к возможности использования продукта синтеза теломеразой, без необходимости дополнительного шага удаления 3'-концевого нуклеотида. Ещё одной альтернативой является нарушение взаимодействия с теломерным 3'-выступающим концом фактора связывания одноцепочечной части теломеры. На примере делящихся дрожжей и человека было показано, как связывание таких факторов важно для регуляции работы теломеразы и длины теломер.

Для того чтобы опровергнуть эти альтернативные объяснения и подтвердить наше предположение о влиянии встраивания дополнительного нуклеотида на способность теломеразы использовать продукт своей работы повторно без лишнего шага, мы создали ещё два штамма с мутациями в матричном участке HpTER (Рисунок 7А). Одна из мутаций – замена цитозина в положении 178 на аденозин (C178A). Такая мутация придаёт способность теломеразе репозиционировать теломерный повтор с дополнительным нуклеотидом на конце не за счёт изменения природы дополнительного нуклеотида, а за счёт изменения природы участка матрицы HpTER, используемого для отжига. Другая мутация – дополнительная к A170C замена цитидина в положении 171 на аденозин (A170C/C171A, далее – CA170AC). При действии теломеразы с такой двойной мутацией снова возникает необходимость в удалении (уже двух) 3'-концевых нуклеотидов для эффективного повторного использования продукта своей работы. В то время как мутация C178A должна приводить к удлинению теломер (аналогичному ситуации в A170C), теломеры в штамме с мутацией CA170AC в теломеразной РНК должны снова стать короткими и гомогенными (Рисунок 7А).

Длина теломер в штаммах, экспрессирующих НpТЕР с мутациями С178А и СА170АС, была проанализирована методом Саузерн блоттинга концевых рестрикционных фрагментов. Результаты представлены на рисунке 7Б. Из данных, изображённых на этом рисунке, видно, что введение мутации С178А в НpТЕР приводит к удлинению теломер и увеличению гетерогенности их длины; причём теломеры в штамме с такой мутацией подобны теломерам в штамме с мутацией А170С (Рисунок 7Б, ср. дорожки 7, 8 и 1, 2). Это согласуется с нашим предположением о том, что мутация С178А должна приводить к повышению способности теломеразы использовать продукт своей работы повторно. С другой стороны, согласно нашему предположению, замена С171А подавляет фенотип штамма А170С – теломеры в штамме с двойной мутацией СА170АС короткие и гомогенные (Рисунок 7Б, дорожки 3, 4 и 1, 2), как в штамме дикого типа (даже несколько короче; рисунок 7Б, дорожки 3, 4 и 5, 6).

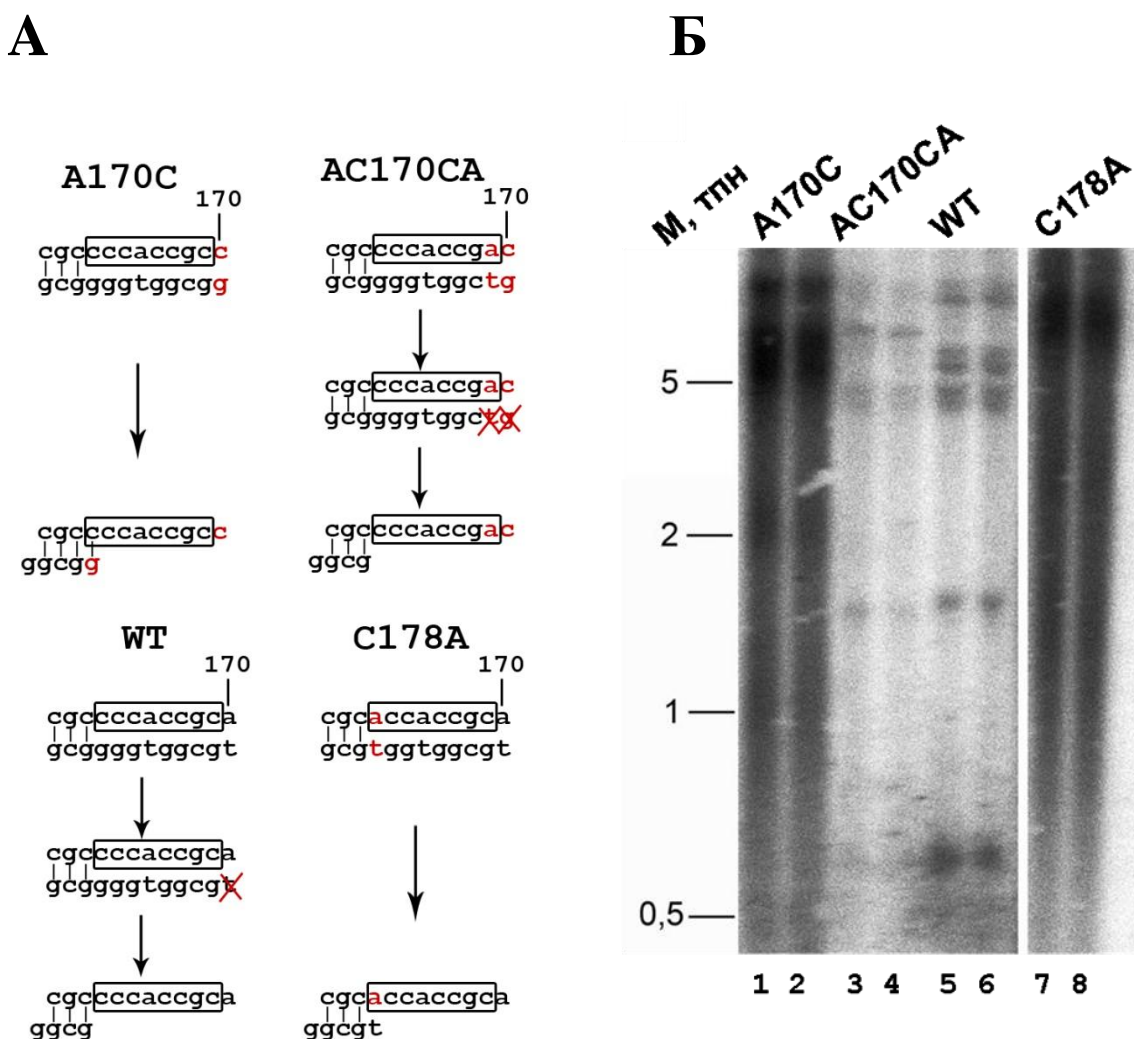


Рисунок 7. Влияние мутаций С178А и АС170СА в матричном участке НрТЕР на длину теломер. А. Схема влияния мутаций С178А и АС170СА на синтез теломерной ДНК теломеразой. Б. Саузерн блот анализ концевых рестриционных фрагментов в штаммах с мутациями С178А (дорожки 7, 8) и АС170СА (дорожки 3, 4). В качестве контроля использовали штамм Δ НрТЕР, трансформированный плазмидой с геном НрТЕР дикого типа (WT, дорожки 5 и 6), а также штамм с мутацией А170С (дорожки 1, 2). М – маркер.

Для дополнительного подтверждения полученных данных, мы провели измерение теломер в штаммах с описанными мутациями в НрТЕР альтернативным методом – методом «теломерного» ПЦР, используемым ранее для определения последовательности последнего теломерного повтора. Данный метод позволяет получить фрагменты ДНК, содержащие теломерные повторы одной из теломер *H. polymorpha*. О длине теломер можно судить по подвижности получаемых фрагментов в агарозном геле. Для контроля специфичности также проводили ПЦР с использованием в качестве матрицы геномной ДНК без предварительного лигирования «адаптера».

Результаты измерения длины теломер этим методом в штаммах с мутациями матричного участка НрТЕР представлены на рисунке 8. Теломеры в штаммах А170С и АС170СА короткие и гомогенные (аналогично ситуации в штамме дикого типа), тогда как в штаммах А170С и С178А теломеры удлинённые и гетерогенные. Стоит отметить, что наблюдаемый в дорожках А170С и С178А продукт короткой длины является неспецифическим, поскольку точно такой же продукт получается в контрольном опыте (Рисунок 8). Данные, полученные этим методом и методом Саузерн блоттинга, полностью согласуются между собой.

Таким образом, в данном разделе показано, что обратная транскрипция нуклеотида А170 матричного участка НрТЕР (и встраивание дополнительного dT нуклеотида) происходит *in vivo* и этот процесс ограничивает длину теломер *H. polymorpha*. Причём, ограничение длины теломер происходит за счёт нарушения способности продукта удлинения теломеразой репозиционироваться в начало матричного участка.

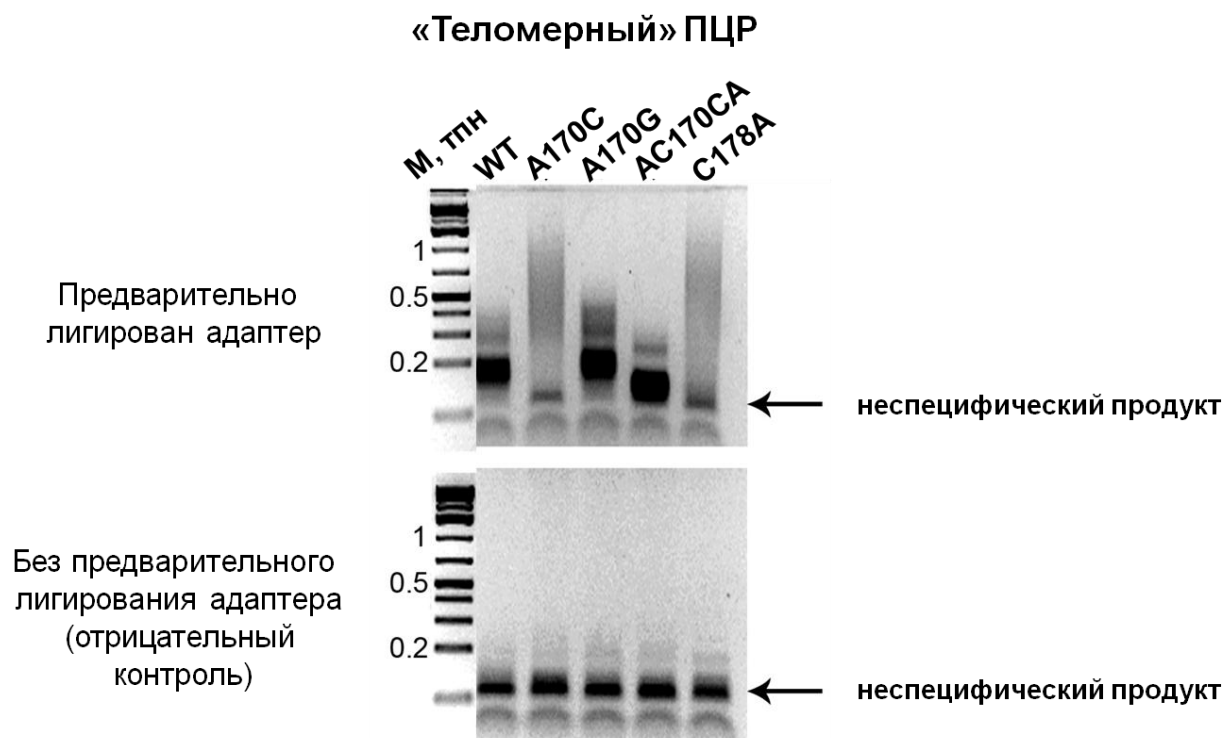


Рисунок 8. Длина теломер в мутантных штаммах, измеренная методом «теломерного» ПЦР. М – маркер.

2. Регуляция длины теломер *H. polymorpha*. Теломерные белки

Основной механизм регуляции длины теломер *S. cerevisiae* осуществляется белками Rap1, Rif1, Rif2, комплексом MRX и киназой Tel1. Белок Rap1 непосредственно связывает теломерную ДНК и привлекает на теломеры белки Rif1 и Rif2 за счёт их взаимодействия с С-концевым доменом Rap1. MRX комплекс связывает теломерную ДНК и привлекает киназу Tel1, их ассоциация с теломерами стимулирует работу теломеразы по не до конца понятному механизму. Белки Rap1, Rif1 и Rif2 ингибируют работу теломеразы за счёт нарушения ассоциации MRX/Tel1 с теломерной ДНК. Мутация в гене *RAP1* (приводящая к потере С-концевого домена), равно как и удаление генов *RIF1* и *RIF2*, приводит к значительному удлинению теломер *S. cerevisiae*. С другой стороны, результатом удаления гена *TEL1*, либо гена одного из компонентов комплекса MRX, является укорочение теломер. Для ответа на вопрос о консервативности механизмов поддержания длины теломер *H. polymorpha* и *S. cerevisiae* мы решили проверить влияние удаления соответствующих генов *H. polymorpha* на длину теломер. В качестве компонента комплекса MRX был выбран белок Mre11.

Идентификация гомологов указанных белков в геноме *H. polymorpha* осуществлялась при помощи программы BLAST со стандартными параметрами. Поиск осуществлялся по базе данных NCBI, содержащей последовательности предсказанных белков *H. polymorpha*, с использованием последовательностей соответствующих белков *S. cerevisiae* в качестве поискового запроса. Основным критерием отбора служило значение оценки выравнивания (alignment score): предсказанный белок *H. polymorpha* считался гомологом соответствующего белка *S. cerevisiae* в том случае, когда значение оценки выравнивания двух белков превышало 40.

В результате для четырёх белков *S. cerevisiae* были найдены гомологи в *H. polymorpha* (таблица 1). Исключением оказался белок Rif2: его гомолог не был обнаружен в *H. polymorpha*. Это не удивительно, поскольку во многих других видах почкующихся дрожжей также не могли обнаружить гомолога Rif2.

Таблица 1. Гомологи *H. polymorpha* белков-регуляторов длины теломер.

Белок <i>S. cerevisiae</i>	Rap1		Rif1	Rif2	Tel1	Mre11
Гомолог в <i>H. polymorpha</i> (номер в базе GenBank)	Rap1A (ESW96538.1)	Rap1B (ESW98690.1)	Rif1 (ESW98598.1)	-	Tel1 (ESW99476.1)	Mre11 (ESW95820.1)
Оценка выравнивания (alignment score)	147	72.4	44.7	-	531	433
% идентичности	26%	27%	19%	-	32%	47%
Пороговое значение (E-value)	$9e^{-38}$	$1e^{-13}$	$2e^{-04}$	-	$1e^{-153}$	$5e^{-143}$

Поиск BLAST выдал два кандидата в гомологи белка Rap1, удовлетворяющих критериям отбора: Rap1A (ESW96538.1) и Rap1B (ESW98690.1). Наличие двух гомологов говорит о возможном разделении функций Rap1 в *H. polymorpha*. Дупликация теломерных белков – довольно распространённое явление: в некоторых видах дрожжей рода *Candida* присутствует два гомолога Cdc13, в клетках мыши – два гомолога POT1. Тем не менее, нельзя исключить вероятности того, что один из обнаруженных нами Rap1 белков *H. polymorpha* потерял теломерную функцию в ходе эволюции.

Для того чтобы понять, какой из гомологов белков Rap1 связывает теломеры в *H. polymorpha*, мы получили штамм, экспрессирующий белок Rap1B с

гемагглютининовым тагом (НА таг) на С-конце. Для этого мы заменили на хромосоме ген *RAP1B* на модифицированный ген (*RAP1B-НА*). К сожалению, нам не удалось получить аналогичный штамм с тагированным Rap1A. Это может быть связано с тем, что наличие тага в данном положении нарушает функцию Rap1A, которая необходима для жизни клетки. Rap1 является критически важным для жизнедеятельности *S. cerevisiae* – делеция гена *RAP1* в *S. cerevisiae* является летальной. Однако удаление С-концевого домена хорошо переносится клетками *S. cerevisiae*. Поэтому мы получили штамм, экспрессирующий мутантный Rap1A, в котором С-концевой домен белка заменён на НА таг (путём соответствующей замены генов на хромосоме). Для связывания с ДНК С-концевой домен Rap1 не нужен, поэтому полученный тагированный вариант белка без С-домена также поможет нам ответить на вопрос о взаимодействии Rap1A с теломерами *H. polymorpha*. Замену генов на хромосоме в полученных штаммах подтверждали ПЦР анализом.

Проверку ассоциации Rap1 белков с теломерами осуществляли методом иммунопреципитации хроматина по схеме, изображённой на рисунке 9А. Клетки штаммов Rap1A-ΔС-НА, Rap1B-НА и дикого типа обрабатывали формальдегидом для фиксации взаимодействий белок-ДНК. Затем из фиксированных клеток получали экстракты и воздействовали на них ультразвуком для фрагментации хроматина. При этом получались фрагменты ДНК длиной около 500 пн. Из полученных экстрактов выделяли тагированные белки при помощи аффинной хроматографии с использованием НА-агарозы (агароза, ковалентно модифицированная антителами к НА тагу). Экстракт, полученный из штамма дикого типа (не имеющий тагированных белков), использовали для оценки количества ДНК, выделяющейся за счет неспецифических взаимодействий. Наличие теломер в совыделяющейся с тагированными белками ДНК проверяли ПЦР анализом с использованием праймеров 1, при этом амплифицируется фрагмент ДНК из субтеломерной области хромосомы VII длиной около 200 пн, отстоящий от конца хромосомы не более, чем на 200 пн. В качестве контроля специфичности проводили ПЦР с праймерами 2, которые амплифицируют фрагмент ДНК (длиной около 200 пн), отстоящий от конца хромосомы на 100 000 пн. Результаты ПЦР анализа приведены на рисунке 9Б. Обогащение ПЦР продукта праймеров 1 в случае штаммов Rap1A-ΔС-НА и Rap1B-НА (по сравнению со штаммом дикого типа) свидетельствует о взаимодействии белков Rap1A и Rap1B с теломерной ДНК. О специфичности этого взаимодействия свидетельствует отсутствие аналогичного обогащения ПЦР продукта праймеров 2.

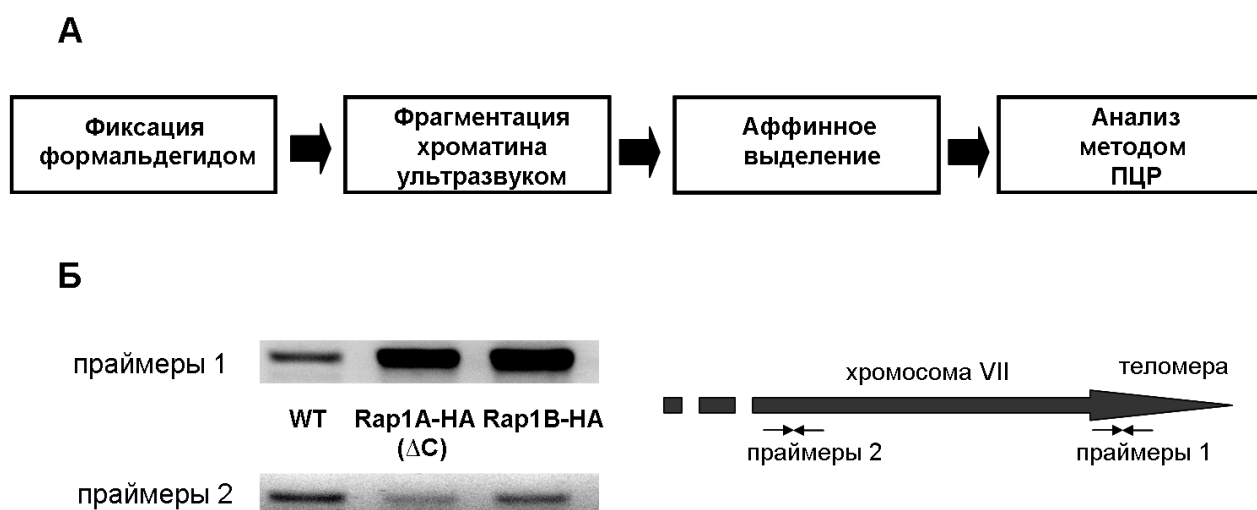
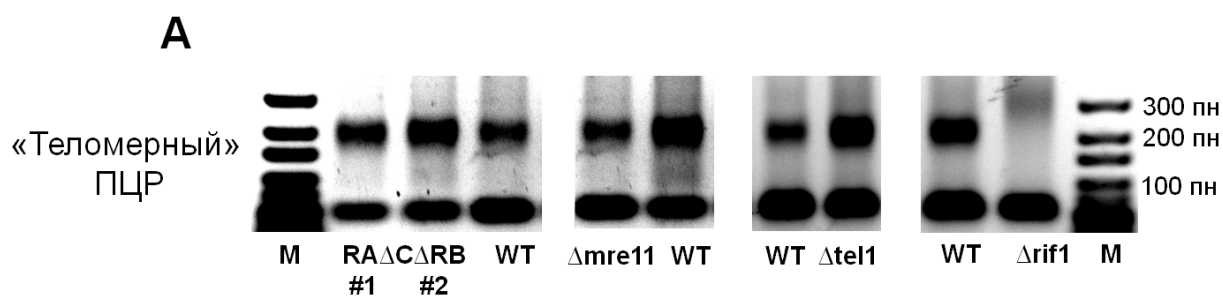


Рисунок 9. Оценка ассоциации Rap1 белков с теломерами методом иммунопреципитации хроматина. А – схема эксперимента. Б – схема и результат ПЦР анализа.

Таким образом, оба гомолога Rap1 взаимодействуют с теломерами *H. polymorpha in vivo*. Далее мы решили проверить участие белков Rap1A, Rap1B, Rif1, Mre11 и Tel1 в регуляции длины теломер *H. polymorpha*. Для этой цели мы создали штаммы с делециями генов этих белков ("нокаутные" штаммы) путём замены соответствующих генов на хромосоме на ген LEU2. Получить штамм с делецией гена *RAP1A* нам не удалось, что согласуется с необходимостью функции Rap1A для жизни клетки. Для оценки влияния Rap1A на длину теломер мы использовали полученный ранее штамм, в котором С-концевой домен заменён на HA таг. Ведь именно С-концевой домен должен играть ключевую роль в регуляции длины теломер. Поскольку Rap1A и Rap1B могут иметь сходную функцию, мы также создали штамм, в котором одновременно удалены ген *RAP1B* и С-концевой домен Rap1A (штамм RAΔCΔRB). Замену генов на хромосоме в полученных штаммах подтверждали ПЦР анализом.

Полученные штаммы культивировали в течение 50 поколений. Из клеток после культивирования выделяли геномную ДНК и измеряли длину теломер при помощи «теломерного» ПЦР. Результаты представлены на рисунке 10А. Оказалось, что ни удаление *RAP1B*, ни удаление С-концевого домена Rap1A, ни их совместная мутация не приводит к изменению длины теломер. Более того, длина теломер в штаммах *Atell* и

Δmre11 также не отличается от длины в штамме дикого типа. Только удаление *RIF1* приводит к значительному удлинению теломер.



Б

Белок <i>S. cerevisiae</i>	Rap1		Rif1	Rif2	Tel1	Mre11
Длина теломер в Δ штамме	+		+	+	-	-
	(ΔC домен)					
Белок <i>H. polymorpha</i>	Rap1A	Rap1B	Rif1	нет	Tel1	Mre11
Длина теломер в Δ штамме	wt	wt	+		wt	wt
	(ΔC домен)					

Рисунок 10. Длина теломер в нокаутных штаммах и штамме дикого типа (WT). А – результаты «теломерного» ПЦР. На рисунке не приведены результаты «теломерного» ПЦР для штаммов *Rap1A-ΔC-НА* и *Δrap1B*, поскольку результат не отличается от такового для штамма *RAΔCΔRB*. #1 и #2 – два независимо полученных штамма *RAΔCΔRB*. М – маркер. Б – сравнение длины теломер в штаммах *S. cerevisiae* и *H. polymorpha* с делециями указанных генов. «+» – теломеры в штамме с соответствующей мутацией длиннее, чем в штамме дикого типа, «-» – теломеры короче, чем в штамме дикого типа, «wt» – теломеры такой же длины, как в штамме дикого типа.

Таким образом, единственным (из проанализированных гомологов *S. cerevisiae*) белком, регулирующим теломеры *H. polymorpha*, оказался белок Rif1 (Рисунок 10Б). Это несколько удивительно, ведь выбранные нами белки *S. cerevisiae* являются участниками одного регуляторного пути. Так, согласно модели "счёта белков", ингибирующее действие ScRif1 осуществляется после его привлечения на теломеры за счёт взаимодействия с С-концевым доменом ScRap1. В *H. polymorpha* два Rap1 белка, тем не менее, ни удаление

одного из них, ни удаление С-концевого домена другого, ни совместная мутация не приводят к изменению длины теломер. С другой стороны, действие ScRif1 на теломеразу опосредовано ScTel1 киназой. Однако, ни HpTel1, ни привлекающий её на теломеры HpMRX комплекс не участвуют в регуляции длины теломер, как показали наши эксперименты. Следовательно, HpRif1 ингибирует теломеразу, используя другие механизмы.

За время изучения механизмов контроля длины теломер *S. cerevisiae* накопились данные, свидетельствующие о том, что теломерная функция ScRif1 более сложна, чем это представлено в модели «счёта белков». Например, ScRif1 может привлекаться на ДНК независимо от ScRap1. При этом он ингибирует накопление комплекса ScRPA, который в свою очередь задействован в привлечении теломеразы. Это говорит о возможности существования альтернативного регуляторного пути с участием ScRif1. Существование такого пути в *H. polymorpha* могло бы объяснить функцию HpRif1. Другое возможное объяснение может быть связано с ролью Rif1 в репликации. Во многих организмах Rif1 является важным фактором контроля времени «разгорания» ориджинов репликации: в отсутствие Rif1 многие участки генома реплицируются раньше положенного. Выдвинута гипотеза о центральной роли времени репликации в регуляции длины теломер делящихся дрожжей *S. pombe*: короткие теломеры, содержащие меньше белков Taz1 и Rif1 (в *S. pombe* Rif1 привлекается на теломеры за счёт взаимодействия с белком Taz1, связывающим теломерную ДНК напрямую) реплицируются раньше и, как следствие, привлекают большее количество теломеразы. Проверка этих предположений в *H. polymorpha* представляется интересным направлением дальнейших исследований. С другой стороны, открытие альтернативного механизма действия HpRif1 может расширить репертуар функций, выполняемых гомологами Rif1 в других организмах.

Факторы связывания двуцепочечной части теломерной ДНК контролируют длину теломер во всех изученных организмах. В свете этого полученные нами данные в *H. polymorpha* несколько противоречивы. Однако мы не можем исключить того, что оставшая часть белка Rap1A (N-концевой или ДНК-связывающий домены) важна для регуляции теломер. Тем не менее, с уверенностью можно утверждать, что в этом случае механизм действия Rap1A будет другим, нежели в *S. cerevisiae*.

ВЫВОДЫ

1. Теломеры термотолерантных дрожжей *Hansenula polymorpha* содержат на 3'-конце дополнительный dT нуклеотид, который не обнаруживается в составе внутренних теломерных повторов.
2. Обратная транскрипция теломеразной каталитической субъединицей нуклеотида A170 теломеразной РНК, в результате которой происходит добавление дополнительного dT, является фактором, ограничивающим длину теломер *H. polymorpha*.
3. Белки Rap1, Tel1 и Mre11 не участвуют в контроле длины теломер *H. polymorpha* в отличие от их гомологов в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*.
4. Делеция гена белка Rif1 приводит к увеличению длины теломер у *H. polymorpha* аналогично своему гомологу в *S. cerevisiae*.
5. Белок Rif1 регулирует длину теломер *H. polymorpha* независимо от Rap1.
6. Регуляция длины теломер *H. polymorpha* теломерными белками радикально отличается от таковой в *S. cerevisiae*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Rubtsova MP, Vasilkova DP, Malyavko AN, Naraikina YV, Zvereva MI, Dontsova OA. "Telomere lengthening and other functions of telomerase". *Acta Naturae*, 2012, 4(2), 44-61.
2. Smekalova EM*, Malyavko AN*, Zvereva MI, Mardanov AV, Ravin NV, Skryabin KG, Westhof E, Dontsova OA. "Specific features of telomerase RNA from *Hansenula polymorpha*". *RNA*, 2013, 19(11), 1563-74.
*Авторы внесли равный вклад.
3. Malyavko AN, Parfenova YY, Zvereva ME, Dontsova OA. "Telomere length regulation in budding yeasts". *FEBS Lett.*, 2014, 588(15), 2530-6.
4. Malyavko AN, Smekalova EM, Zvereva MI, Dontsova OA. "Processing of telomerase RNA from thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha*". CSHL Meeting Telomeres and telomerase. Cold Spring Harbor, NY, USA. 2013.
5. Malyavko AN, Zvereva MI, Dontsova OA. "A strategy of isolation of telomerase from yeast *Hansenula polymorpha*". FEBS Congress 2013 "Mechanisms in Biology". St. Petersburg, Russia. 2013.
6. Malyavko AN, Smekalova EM, Zvereva MI, Mardanov AV, Ravin NV, Skryabin KG, Westhof E, Dontsova OA. "Telomere length regulation in *Hansenula polymorpha*". GDRI meeting 2014 "From Molecular to Cellular Events in Human Diseases". Paris, France. 2013.