

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра химии природных соединений

*На правах рукописи*

**Петрова Ольга Алексеевна**

**Структурные исследования компонентов теломерного  
комплекса дрожжей *Hansenula polymorpha***

Специальность

02.00.10 – биоорганическая химия

03.01.03 – молекулярная биология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научные руководители:

д.х.н., профессор,

акад. РАН **Донцова О.А.**

к.х.н., доцент

**Зверева М.Э.**

Москва - 2018

## Оглавление:

Список сокращений .....	6
1. Введение .....	8
2. Обзор литературы. Структура и функция теломеразы.....	11
2.1 Основные компоненты теломеразы .....	11
2.1.1 Теломеразная обратная транскриптаза (TERT) .....	14
2.1.1.1 TERT ring .....	16
2.1.1.2 TEN домен TERT .....	20
2.1.1.3 TRBD домен TERT .....	22
2.1.1.4 RT домен TERT .....	31
2.1.1.5 STE домен TERT .....	32
Выводы из раздела 2.1.1 .....	35
2.1.2 Теломеразная РНК .....	37
2.1.2.1 Матричный участок .....	39
2.1.2.2 TBE элемент .....	41
2.1.2.3 Псевдоузел.....	42
2.1.2.4 STE элемент.....	42
2.1.2.5 Сайты связывания ассоциированных белков.....	44
Выводы из раздела 2.1.2.....	45
2.2 Дополнительные компоненты теломеразы .....	47
2.2.1 Структура дополнительных компонентов теломеразного комплекса реснитчатых.....	47
2.2.2 Структура дополнительных компонентов теломеразного комплекса человека .....	50
2.2.3 Структура дополнительных компонентов теломеразного комплекса дрожжей.....	56
2.2.3.1 CDC13 .....	56
2.2.3.2 Est1 .....	57
2.2.3.3 Est3 .....	57

2.3 Заключение обзора литературы.....	61
3. Результаты и их обсуждение.....	63
3.1 Постановка задачи .....	63
3.2 Идентификация генов дополнительных белковых компонентов теломеразы дрожжей <i>H.polyomorpha</i> .....	66
3.2.1 Биоинформатическая идентификация гена белка hpEst1 .....	66
3.2.2 Экспериментальное подтверждение взаимосвязи гена-кандидата белка hpEst1 и системы поддержания длины теломер.....	69
3.2.3 Биоинформатическая идентификация гена белка hpEst3 .....	71
3.2.4 Экспериментальное подтверждение взаимосвязи гена-кандидата белка hpEst3 и системы поддержания длины теломер.....	73
3.3 Разработка метода выделения белков hpEst1 и hpEst3, пригодных для структурных и функциональных исследований .....	75
3.4 Структурные исследования белка hpEst3.....	78
3.5 Поиск границ доменов каталитической субъединицы дрожжей <i>H.polyomorpha</i> (hpTERT).....	81
3.5.1 Биоинформатический анализ последовательности hpTERT .....	82
3.5.2 Разработка метода выделения доменов hpTERT, пригодных для структурных исследований.....	84
3.6 Структурные исследования N-концевого домена hpTERT (hpTEN).....	89
3.6.1 Структурные исследования hpTEN методом кристаллографии .....	89
3.6.2 Структурные исследования hpTEN методом спектроскопии ЯМР ..	90
3.6.3 Сравнение структур hpTEN, полученных методом ЯМР спектроскопии и кристаллографии .....	91
3.6.4 Сравнение структур hpTEN и ttTEN .....	93
3.6.5 Взаимодействие hpTEN с нуклеиновыми кислотами .....	97
3.6.6 Предположительная роль TEN домена в работе теломеразы.....	103
3.7 Заключение .....	108

4.	Выводы.....	110
5.	Материалы и методы .....	111
5.1	Реактивы, буферные растворы, штаммы и биопрепараты.....	111
5.2	Методики, использованные в работе .....	117
5.2.1	Клонирование.....	117
5.2.1.1	ПЦР .....	117
5.2.1.2	Выделение плазмидной ДНК.....	118
5.2.1.3	Приготовление векторов и вставок.....	118
5.2.1.4	Разделение фрагментов ДНК в агарозном геле .....	119
5.2.1.5	Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля .....	119
5.2.1.6	Лигирование .....	119
5.2.2	Приготовление компетентных клеток <i>E. coli</i> .....	120
5.2.3	Трансформация компетентных клеток <i>E. coli</i> .....	120
5.2.4	Секвенирование плазмид .....	121
5.2.5	Клонирование генов <i>hpEst1</i> , <i>hpEst3</i> и <i>hpTEN</i> в экспрессионный вектор .....	121
5.2.6	Получение штаммов дрожжей <i>H. polymorpha</i> , «нокаутных» по генам <i>Est1</i> и <i>Est3</i> .....	122
5.2.6.1	Получение кассет для трансформации дрожжей.....	122
5.2.6.2	Трансформация клеток <i>H. polymorpha</i> .....	124
5.2.7	Выделение геномной ДНК <i>H. polymorpha</i> .....	125
5.2.8	Саузерн-блот анализ рестрикционных фрагментов теломер .....	125
5.2.8.1	Получение и разделение рестрикционных фрагментов теломер .	125
5.2.8.2	Перенос ДНК на нитроцеллюлозную мембрану .....	126
5.2.8.3	Приготовление зондов для гибридизации.....	126
5.2.8.4	Гибридизация мембраны с зондами.....	127
5.2.9	Проверка сенесценс фенотипа штамма с нокаутом гена-кандидата методом разведения на чашках Петри .....	128



5.2.10 Выделение и очистка рекомбинантных белков hpEst1, hpEst3, hpTEN.....	128
5.2.10.1 Первая стадия очистки белков металл-хелатной хроматографией .....	128
5.2.10.2 Протеолитическое удаление аффинного тага .....	129
5.2.10.3 Гель-фильтрация.....	129
5.2.11 Проведение полиакриламидного гель-электрофореза и проверка экспрессии белка hpEst1 методом Вестерн-блот .....	130
5.2.12 Спектроскопия кругового дихроизма .....	131
5.2.13 Термофлюориметрия .....	132
5.2.14 Динамическое светорассеяние .....	132
5.2.15 Биоинформатический анализ.....	133
6. Список литературы .....	135
7. Приложение.....	157
7.1 Приложение 1 .....	157
7.1.1 Результаты динамического светорассеяния (DLS) для очищенного рекомбинантного белка hpEst3 .....	157
7.1.2 Пример результатов термофлюориметрии (ТФ, TF) для очищенного рекомбинантного белка hpEst3 .....	158
7.1.3 Результаты измерения кривой кругового дихроизма (КД) для очищенного рекомбинантного белка hpEst3 .....	159
7.2 Приложение 2.....	160
7.2.1 Результаты динамического светорассеяния (DLS) для очищенных рекомбинантных белков hpN-2, hpN-25, hpTEN.....	160
7.2.2 Пример результатов термофлюориметрии (ТФ, TF) для очищенных рекомбинантных белков hpN-2, hpN-25, hpTEN.....	163
7.2.3 Результаты измерения кривой кругового дихроизма (КД) для очищенных рекомбинантных белков hpN-2, hpN-25, hpTEN.....	165
7.3 Приложение 3 .....	167

## Список сокращений

кДа	килодальтон
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	рибонуклеиновая кислота
одДНК	одноцепочечная ДНК
одРНК	одноцепочечная РНК
гДНК	геномная ДНК
ДТТ	1,4-дитио-DL-триэтол
ПЦР	полимеразная цепная реакция
БСА	бычий сывороточный альбумин
ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота
ПААГ	полиакриламидный гель
ИПТГ, IPTG	изопропил- $\beta$ -тиогалактопиранозид
Ni-NTA	нитрил-триуксусная кислота
ТЕМЕД	N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамид
TERT	теломеразная обратная транскриптаза
TEN	N-концевой домен TERT
TRBD	РНК-связывающий домен
RT-, OT-домен	обратнотранскриптный домен
STE-домен	C-концевой домен
RAP	repeat addition processivity, процессивность 2 типа
TR, TER, (TLC1)	теломеразная РНК (теломеразная РНК в дрожжах)
TBE	5' граничный элемент TER
STE	элемент на терминальной ветви TER
TWJ	место смыкания трех спиралей
DBD	ДНК связывающий домен
TPR	тетратрикопептидные повторы
SDS	додецилсульфат натрия



## 1. Введение

Большинство организмов в качестве генетического материала содержат линейную ДНК, организованную в хромосомы. При этом возникает проблема невозможности полного копирования хромосомной ДНК. Согласно каноническим механизмам репликации, данная проблема, именуемая «проблемой недорепликации», связана с неспособностью репликативных полимераз начинать синтез ДНК *de novo*. Сперва праймаза синтезирует короткую РНК-затравку, которая впоследствии удаляется, а система репарации затем заполняет образовавшуюся брешь. Однако бреши на концах хромосом не могут быть заполнены, что приводит к потере ДНК при каждом клеточном делении и укорочению хромосом. На концах эукариотических хромосом находятся участки, названные теломеры. Они состоят из ДНК повторов и специализированных ассоциированных с ними белков. С каждым клеточным делением теломеры укорачиваются. При достижении теломерами критической длины, клетки входят в состояние сенесценса и погибают (так называемый «предел Хейфлика») [1].

Основным механизмом поддержания длины теломер является активация теломеразы. Теломераза представляет собой сложный комплекс, включающий обратную транскриптазу, которая участвует в поддержании стабильности генома, синтезируя повторяющиеся теломерные последовательности на концах эукариотических хромосом по РНК матрице, входящей в состав теломеразного комплекса. В норме теломераза не активна в большинстве соматических клеток, однако активность теломеразы детектируется во всех клетках с высоким пролиферативным потенциалом, например, стволовых, половых и зародышевых, а также у одноклеточных эукариот. С другой стороны, теломераза также отвечает за неограниченное деление клеток практически во всех типах раковых образований [2]. С этим связано всё возрастающее внимание к пониманию структуры и механизмов работы теломеразы, так как теломераза является перспективной мишенью в противораковой терапии [3, 4].

Основными компонентами теломеразного комплекса являются теломеразная обратная транскриптаза, каталитическая субъединица (TERT или Est2 в дрожжах) и теломеразная РНК, содержащая матричный участок, комплементарный последовательности теломерного повтора (TR, TER или TLC1 в дрожжах). Этим двум компонентам достаточно для активности теломеразы *in vitro*, однако в клетке, для поддержания длины теломер требуются дополнительные белковые компоненты, необходимые для сборки, локализации и активности теломеразы *in vivo*, например, в дрожжах это белки Est1 и Est3.

Для создания инструментов, позволяющих управлять селективностью теломеразы, необходимо понимание работы всех её компонентов на молекулярном уровне. Изучению теломеразы препятствует весьма низкая стабильность её компонентов. Структурные данные для этих компонентов на настоящий момент очень ограничены. Для теломеразного комплекса человека, информация о структуре ограничивается данными электронной микроскопии с разрешением 23 Å [5]. В единственной существующей на данный момент кристаллической структуре каталитической субъединицы TERT жука *Tribolium castaneum* не достаёт характерного для теломеразных обратных транскриптаз N-концевого домена, который является независимым и обладает отдельными функциями в работе фермента [6].

Все опубликованные на настоящий момент модели TEN домена теломеразы человека смоделированы на основе единственной существующей кристаллической структуры N-концевого домена TERT теломеразы *Tetrahymena thermophila* [7]. Однако анализ аминокислотной последовательности показывает, что степень гомологии последовательности TEN реснитчатых (в том числе TERT из *Tetrahymena*) значительно ниже последовательностей TEN других видов, включая млекопитающих и дрожжи. Таким образом, структура высокого разрешения TEN из любого другого организма, кроме реснитчатых, будет гораздо более подходящей матрицей для моделирования структуры TEN домена теломеразы человека. Кроме того, такая

информация сможет показать структурную гомологию среди TEN доменов разных классов, ввиду низкой гомологии в аминокислотных последовательностях. Всё это делает изучение структуры белковых компонентов теломеразы дрожжей важной и актуальной задачей.

Известно, что белки из термостабильных организмов обычно более стабильны своих нетермостабильных аналогов. В связи с этим, в качестве модельного организма нами были выбраны термотолерантные дрожжи *Ogataea polymorpha* (*Hansenula polymorpha*).

Целью данной работы является поиск и структурное исследование белковых компонентов теломеразного комплекса дрожжей *Hansenula polymorpha*.

## 2. Обзор литературы. Структура и функция теломеразы.

### 2.1 Основные компоненты теломеразы

Теломеразная активность впервые была показана Кэррол Грейдер и Элизабет Блэкберн на клеточном экстракте реснитчатых *Tetrahymena thermophila* [8], а затем и на других реснитчатых [9, 10]. Более чем десятилетие спустя теломераза была обнаружена в иммортализованной человеческой раковой клеточной линии HeLa [11] и в большом количестве типов рака [2], что вывело интерес к изучению теломеразы на новый уровень.

Теломераза представляет собой сложный рибонуклеопротеидный комплекс, состоящий из РНК (telomerase RNA - TER) и связанных с ней белков, включая теломеразную обратную транскриптазу (telomerase reverse transcriptase – TERT. В *S. pombe* этот белок носит название Trt1, хотя в дрожжах более распространено название Est2 – Ever Shorter Telomeres – так как мутации гена этого белка приводят к появлению фенотипа укорачивающихся теломер [12].). Основной функцией теломеразы является удлинение 3' конца линейной хромосомы путем синтеза нескольких копий G-богатых теломерных ДНК повторов (G-цепи), используя в качестве матрицы участок, входящий в состав теломеразной РНК. Нуклеотидная последовательность и длина теломерного повтора различается в разных организмах [13]. При этом, длина теломеры, может варьироваться от нескольких единиц до нескольких тысяч повторов, а 3' выступающий конец G-богатой цепи также варьируется от нескольких единиц до сотен нуклеотидов. Теломераза также может участвовать в регуляции синтеза С-цепи ДНК [14]. TERT и TER обладают ограниченной обратнотранскриптазной активностью *in vitro*, однако для работы фермента *in vivo*, теломеразе требуются дополнительные белки, вовлеченные в биогенез, привлечение теломеразы на теломеры, теломерные белки, связывающие G- и С-цепи [15].

Теломеразная активность не детектируется в большинстве соматических клеток, в стволовых и зародышевых клетках присутствует на среднем уровне, а в большинстве раковых клеток детектируется высокая активность теломеразы [16]. В то время как в соматических клетках экспрессия компонентов теломеразы очень жестко регулируется, в большинстве типов раковых опухолей активная теломераза успешно экспрессируется на высоком уровне, позволяя раковым клеткам делиться неограниченно [17]. Прямая связь между поддержанием длины теломер и неограниченным пролиферативным потенциалом была впервые продемонстрирована *in vitro* на двух линиях человеческих клеток, в которых была экспрессирована теломераза. В клетках в отсутствие теломеразы наблюдалось укорочение теломер и сенесценс, в то время как теломераза-экспрессирующие клетки имели удлиненные теломеры, активно делились и демонстрировали пониженную активность бета-галактозидазы, биомаркера сенесценса. Примечательно, что клетки, экспрессирующие теломеразу, имели нормальный кариотип и превысили нормальный срок их жизни, по меньшей мере, на 20 удвоений. Таким образом была показана связь между укорочением теломер и клеточным репликативным потенциалом *in vitro* [18]. Самый конец каждой хромосомы представляет собой 3' выступающую последовательность ДНК [19]. Этот одноцепочечный участок является субстратом для теломеразы. Одноцепочечный 3' конец ДНК отжигается на матричный участок теломеразной РНК, а TERT осуществляет синтез теломерного повтора по механизму обратной транскрипции, этот этап работы теломеразы называют элонгация [20] (Рисунок 2.1). Активность теломеразы на этом этапе также называют процессивностью 1 типа, она определяется количеством нуклеотидов одного теломерного повтора, добавленных без диссоциации фермента. Когда теломерный повтор синтезирован, теломераза осуществляет транслокацию, 3' конец новосинтезированной ДНК перемещается в начало матричного участка и теломераза может начать синтезировать следующий повтор. Таким образом теломераза может добавлять несколько повторов один за другим без -





### 2.1.1 Теломеразная обратная транскриптаза (TERT)

Впервые каталитическая субъединица теломеразы была идентифицирована в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* с помощью мутаций в гене EST2 (Ever Shorter Telomere), которые приводили к укорочению теломер и сенесценсу, задержано-летальному фенотипу, в котором клетки перестают делиться после 50-75 поколений [22]. Позднее был выделен TERT теломеразного комплекса *Euplotes aediculatus* (p123) [23], *Tetrahymena thermophila* и *Oxytricha trifallax* [24]. Было показано, что TERT *E. aediculatus* является гомологом белка из *S. cerevisiae*, а при делеции гена, кодирующего данный белок, увеличивается число дефектов теломер. На данный момент гомологи TERT также обнаружены в млекопитающих, птицах, рыбах, грибах, растениях и реснитчатых [25, 26, 27, 28].

Анализ аминокислотных последовательностей TERT выявил эволюционно консервативные домены, характерные для обратных транскриптаз [29]. Теломераза является полимеразой, использующей РНК-матрицу для синтеза ДНК, то есть является обратной транскриптазой (ОТ или RT – reverse transcriptase). Поэтому наличие обратно-транскриптазного каталитического домена (ОТ-домена или RT-домена) свойственно для всех TERT [28].

Первое свидетельство того, что TERT является особым видом ОТ, а именно каталитической субъединицей теломеразы, появилось после *in vivo* исследований, показавших, что точечные мутации эволюционно консервативных аминокислотных остатков каталитической триады ОТ, включающей три остатка аспарагиновых кислот, приводит к укорочению теломер в дрожжах *in vivo* и падению ферментативной активности *in vitro* [29]. Следующее свидетельство появилось после исследований, показавших, что активность теломеразы может быть реконструирована *in vitro* ко-экспрессией TERT и TER в ретикулоцитном лизате кролика [28, 30, 31].

Большинство теломеразных обратных транскриптаз достаточно консервативны и имеют общую доменную организацию (Рисунок 2.2):

- 1) N-концевой домен (essential N-terminal domain - TEN)

- 2) РНК-связывающий домен (telomerase RNA-binding domain – TRBD)
- 3) обратнотранскриптазный домен (reverse transcriptase domain - RT)
- 4) С – концевой домен (C-terminal extension - CTE)

Кроме каталитического активного сайта, обратнотранскриптазного домена, консервативного среди всех обратных транскриптаз, RT-домен TERT обладает двумя дополнительными мотивами, специфичными именно для TERT: Insertion in Fingers Domain (IFD) и мотив 3 (Рисунок 2.2) [32, 33]. IFD, мотив 3 и Т-мотив в РНК-связывающем домене позволяют легко идентифицировать и сравнивать TERT из различных организмов [25].

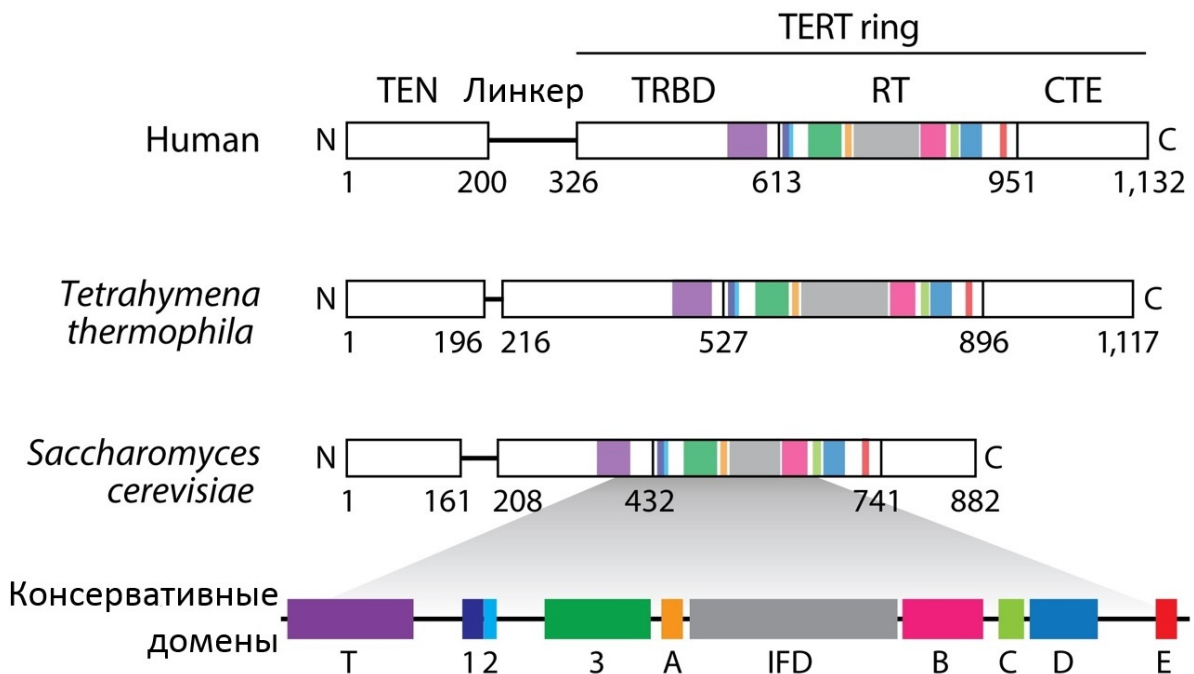


Рисунок 2.2. Схематическое изображение доменной организации TERT. Схема доменного состава TERT человека, *Tetrahymena thermophila* и *Saccharomyces cerevisiae*. В состав TERT входят: TEN - N-концевой домен, линкер и кольцевая структура (TERT ring), включающая в себя TRBD – РНК-связывающий домен, RT – каталитический (обратнотранскриптазный) домен и CTE – С-концевой домен. Границы доменов обозначены в соответствии с положением в аминокислотной последовательности. Эволюционно консервативные: Т-мотив (фиолетовый), а также мотивы 1 (темно-синий), 2

(светло-голубой), 3 (зеленый), А (оранжевый), IFD (серый), В (розовый), С (салатовый), D (голубой) и E (красный) [25].

Хотя подобная доменная организация свойственна почти всем известным теломеразным каталитическим субъединицам, существует несколько исключений. Область линкера варьируется по длине и на данный момент остаётся не до конца ясной роль TEN домена в сборке и активности теломеразы. TERT нематод и некоторых насекомых не содержат N-концевого домена, так называемого TEN-домена [25], который в остальных организмах играет важную роль в узнавании ДНК субстрата, элонгации и процессивности как 1, так и 2 типа. Теломераза *S. cerevisiae* сохраняет активность без TEN домена *in vivo* [34], а теломераза человека без TEN домена может осуществить синтез одного повтора *in vitro* [35]. Кроме того, у *Gardia lamblia* и нематод отсутствует С-концевой домен [36].

#### 2.1.1.1 TERT ring

Наиболее полная из существующих на данный момент структур TERT – это структура каталитической субъединицы теломеразы мучного жука *Tribolium castaneum* (tcTERT) [6]. TcTERT, как и TERT нематод и некоторых насекомых, не содержит N-концевой домен [37], необходимый для активности теломеразы и процессивности в других эукариотических организмах, включая человека, дрожжи и *T.thermophila*. Внутримолекулярное взаимодействие TRBD и CTE приводит к получению структуры в форме кольца, состоящей из TRBD, RT и CTE (TERT ring) (Рисунок 2.3). Четыре основных домена TERT – РНК-связывающий домен, домен пальцы, вовлеченный в связывание нуклеотидов и процессивность, домен ладонь, содержащий активный сайт фермента, и домен большой палец, вовлеченный в связывание ДНК и процессивность, образуют структуру TERT ring (Рисунок 2.3).

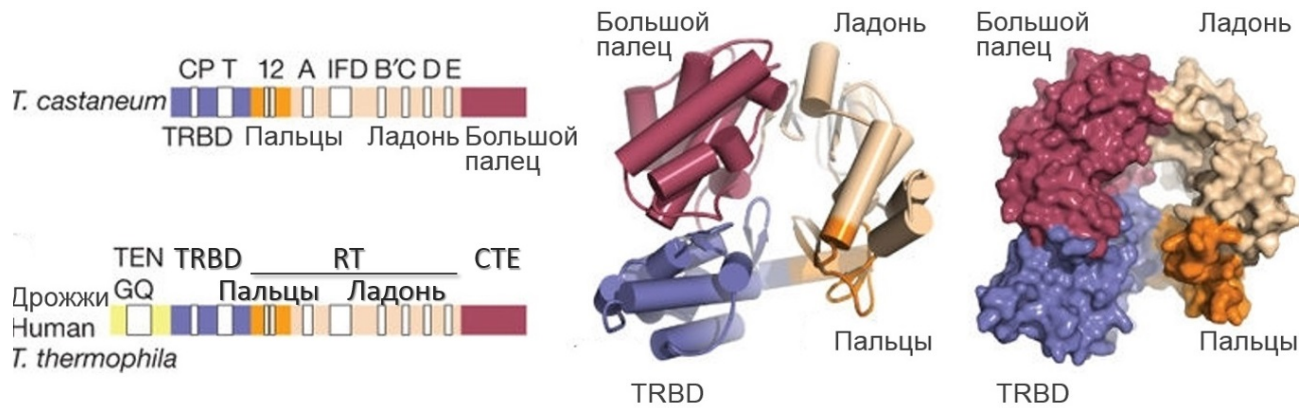


Рисунок 2.3 Доменная организация TERT *Tribolium castaneum* [6].

Слева, сверху: соотнесение структуры и последовательности TERT *T. castaneum*. Отмечены консервативные домены. Слева, внизу: соотнесение структуры и последовательности TERT *T. castaneum* с последовательностью TERT дрожжей, человека и *T. thermophila*. TEN-домен, отсутствующий в TERT *T. castaneum*, присутствует в других последовательностях TERT. Справа, кристаллическая структура TERT *T. castaneum* (3DU6, [6]). Изображены каталитический домен с тремя субдоменами и TRBD.

*Tc*TERT имеет кольцеобразную форму, похожую на пространственные структуры других полимераз (Рисунок 2.4). При сравнении структур TERT со структурами обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека, вирусными РНК полимеразами и В-семейством ДНК полимераз, совпадает пространственное расположение домена большого пальца этих ферментов с STE доменом TERT по отношению к субдоменам пальца и ладонь [6]. Как и его структурные гомологи, TERT ring состоит из доменов пальца, ладонь и большой палец, которые необходимы для связывания нуклеиновых кислот и нуклеотидов, а также для катализа [6].

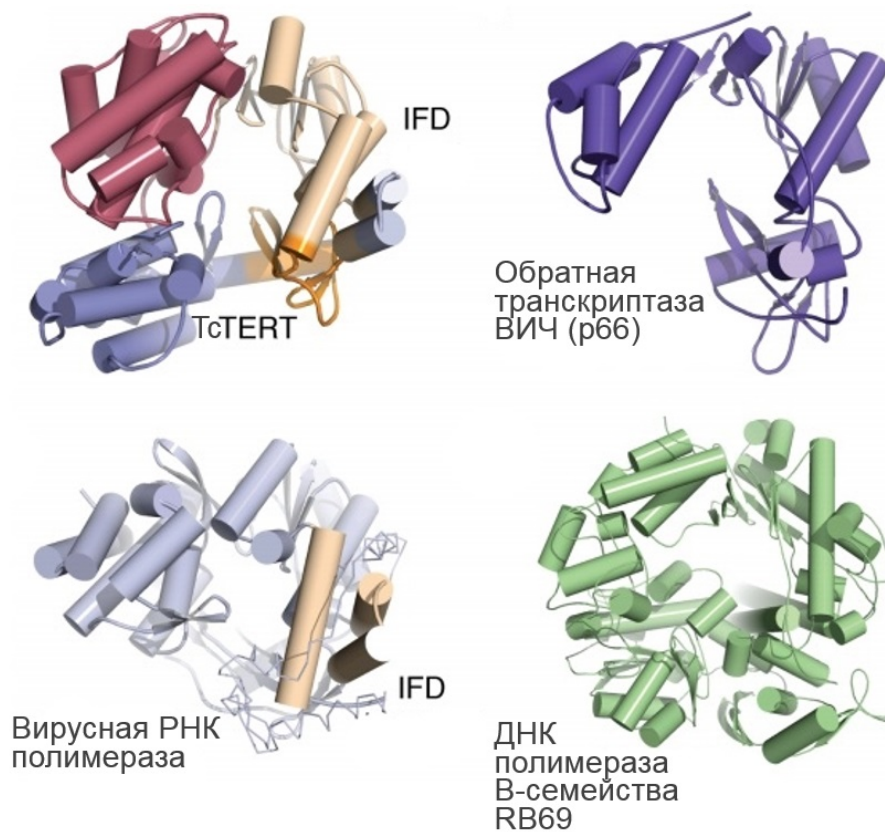


Рисунок 2.4.  
Сравнение структур тсTERT, обратной транскриптазы ВИЧ, вирусной РНК полимеразы и ДНК полимеразы В-семейства. Структура полимеразного домена обратной транскриптазы ВИЧ (p66) (PDB code ID 1N5Y). Структура

вирусной полимеразы гепатита С (PDB Code ID 2BRL) Структура ДНК полимеразы В-семейства, RB69 (PDB Code ID 1WAF). Все четыре структуры имеют заметное сходство в доменной организации. [6].

TRBD и СТЕ–домены, разделенные RT–доменом, сближены в пространстве и образуют между собой обширные гидрофобные контакты. Образование такой структуры приводит к формированию сильно положительно заряженной полости в центре TERT ring. Активный сайт расположен в центральной части кольца [38]. Консервативные остатки, расположенные во внутренней полости кольца, ответственны за связывание нуклеотидов, РНК-ДНК дуплекса, его правильное позиционирование и удлинение 3'-конца теломерной ДНК. Эта полость 22 Å шириной, 21 Å глубиной и может вмещать семь оснований двуцепочечной нуклеиновой кислоты (Рисунок 2.5). Внутри этой полости связывается одна молекула ДНК-РНК гибрида, образующего спиральную структуру благодаря Уотсон-Криковским взаимодействиям. Такая



структура аналогична ДНК-ДНК и РНК-РНК дуплексам, связанным с обратной транскриптазой ВИЧ [39].

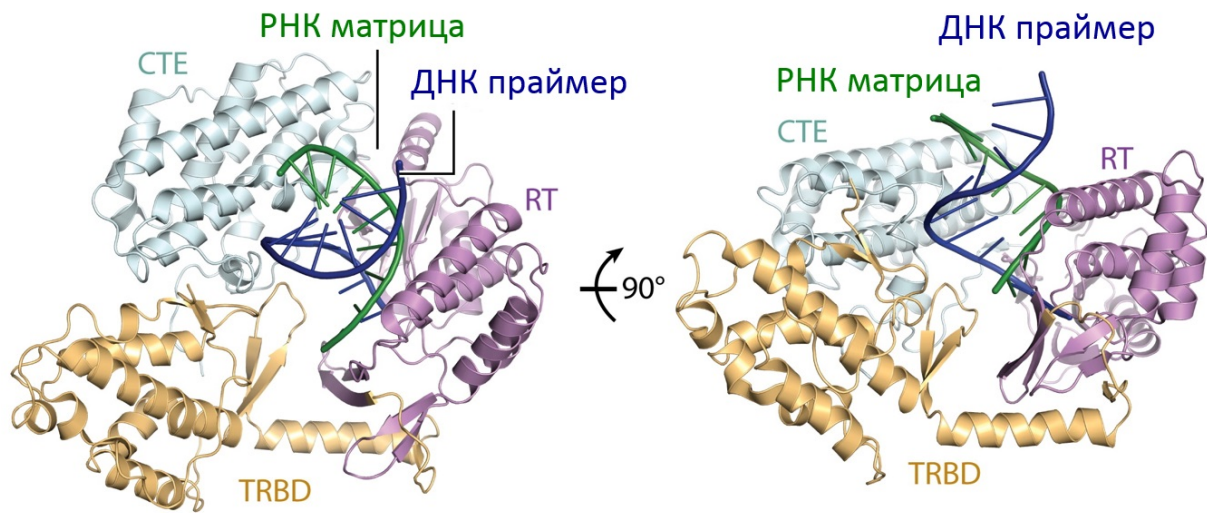


Рисунок 2.5. Кристаллическая структура TERT ring *T.castaneum*, содержащая ДНК-РНК гетеродуплекс, имитирующий теломерную ДНК (зелёный) и матричный участок теломеразной РНК (синий) [38]. РНК-связывающий домен (TRBD) (золотой); обратнотранскриптный домен (RT), включает в себя субдомены пальцы (мотивы 1 и 2) и ладонь (мотивы А, IFD, В', С, D, E) (фиолетовый); С-концевой домен, домен большой палец (голубой)

Связывание матричного участка РНК происходит благодаря консервативным мотивам 2 и В' в доменах пальцы и ладонь соответственно. Оба этих мотива расположены рядом и выше активного сайта фермента. Контакты между белком и сахарофосфатным остовом матричной РНК обеспечивают доступные растворителю основания вблизи активного центра фермента, что обеспечивает селективность связывания. Взаимодействие TERT и ДНК происходит через петлю и спираль домена большой палец. Эти контакты обеспечивают стабильность, требуемую для активности теломеразы, и облегчают позиционирование 3'-концевых нуклеотидов вблизи области связывания праймера (мотив E), которая, в свою очередь, позиционирует 3'-концевой гидроксил ДНК-праймера в активном центре фермента [38].

### 2.1.1.2 TEN домен TERT

N-концевой домен TERT (TEN – essential N-terminal domain, N-концевой домен) необходим для работы теломеразы, однако его роль может сильно отличаться для разных видов. Для него наблюдается наиболее низкая консервативность среди разных видов. TERT некоторых насекомых не содержит TEN домен, а активность теломеразы детектируется на очень низком уровне [40]. Такие организмы обладают независимым от теломеразы механизмом поддержания длины теломер, который уменьшает потребность в активности теломеразы для достижения стабильности генома [41]. Например, в *Drosophila* роль теломеразы выполняют три специализированных ретротранспозона: HeT-A, TART и Tahre [42].

Теломераза человека с удалённым TEN доменом может синтезировать один теломерный повтор, однако в этом случае наблюдается потеря RAP. Данные по реконструкции теломеразы *in vivo* демонстрируют участие TEN домена человека (hTEN) в РНК-зависимом позиционировании ДНК субстрата, что обеспечивает RAP. Также было показано участие hTEN во взаимодействии hTERT и hTER [35]. Несколько вариантов hTEN с аминокислотными заменами демонстрировали сильное снижение активности теломеразы *in vitro* из-за более сильного связывания и неправильного позиционирования праймера в активном сайте или из-за нарушения встраивания dNTP [43]. Кроме того, в составе hTEN был выделен участок DAT (dissociates activities of telomerase – разделяет активность теломеразы). Этот участок включает основания 68-133. Теломераза с мутациями, введёнными в эту область, сохраняет исходную активность *in vitro*, но полностью теряет активность *in vivo*. Наиболее вероятно, что этот регион участвует во взаимодействии hTERT с теломерными белками [44]. Множество исследований указывают на участие hTEN в привлечении теломеразы на теломеры при взаимодействии с TPP1/POT1 теломерными белками, а также обеспечение RAP посредством облегчения этапа транслокации [44, 45, 46, 47]. Для теломеразы с мутациями, введёнными в DAT область hTEN (78, 100 и 132 аминокислотные остатки) резко снижался уровень



RAP (repeat addition processivity), индуцируемый TPP1/POT1 *in vitro*, либо теломераза не привлекалась на теломеры *in vivo*, либо и то и другое. Таким образом, область DAT в hTEN считается местом взаимодействия hTERT-TPP1 [44, 48]. Основываясь на этих данных можно предположить, что hTEN вероятно вовлечен в конформационные перестройки при связывании субстрата теломеразы в активном сайте фермента. Мутационный анализ показал, что hTEN также влияет на процессивность теломеразы, специфически взаимодействуя фрагментом, содержащим консервативный аминокислотный остаток глицин 100 (Gly100) с теломерным белком TPP1.

Функциональная роль TEN домена в дрожжах недостаточно хорошо изучена. Было показано, что теломераза *S. cerevisiae* без TEN домена сохраняет активность *in vivo* [34]. Есть данные, что TEN в дрожжах влияет на RAP и возможно участвует в позиционировании ДНК праймера на матричной РНК [49]. В другой работе было показано, что при введении мутаций в TEN домен наблюдается потеря процессивности *in vitro* и укорочение теломер *in vivo* [50]. Существуют данные о прямом взаимодействии TEN домена нескольких видов дрожжей рода *Candida* с белком теломеразного комплекса дрожжей Est3. Est3 необходим для поддержания теломер *in vivo* и имеет структурное и функциональное сходство с теломерным белком TPP1. При этом для Est3 ДНК связывающая активность была показана только в присутствии TEN [51]. В то же время для scEst3, ДНК связывающая активность детектировалась и в отсутствие TEN домена [52].

Удаление TEN домена в реснитчатых *T. thermophila* (ttTEN) приводит к полной потере активности теломеразы [53]. При этом введение мутаций в ttTEN влияет на инициацию и элонгацию теломеразы, но не на процессивности 2 типа (repeat addition processivity - RAP) [54]. Кроме того, было показано, что ttTEN связывает теломерную ДНК и стабилизирует РНК-ДНК дуплекс в активном сайте TERT, таким образом стимулируя теломеразную активность [55]. Кроме того, было показан сиквенс-специфическое связывание ttTEN одноцепочечного ДНК праймера и сиквенс-неспецифическое связывание с РНК [7].

На настоящий момент опубликована только одна структура TEN домена TERT – это TEN *T.thermophila* (аминокислотные остатки 2-191) (Рисунок 2.6) [7].

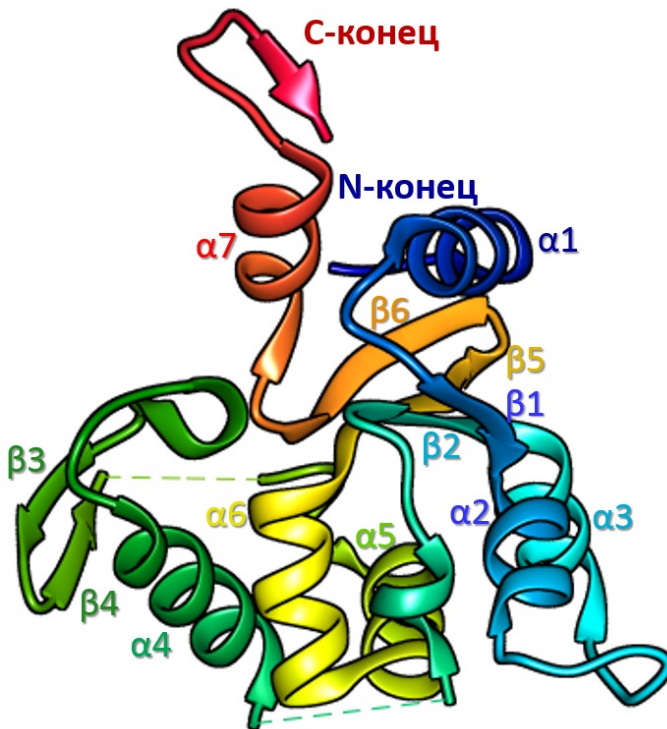


Рисунок 2.6

Кристаллическая структура TEN домена TERT *T.thermophila* (PDB Code ID 2B2A). Структура окрашена от С- к N-концу от красного к синему соответственно.

TtTEN домен имеет уникальный фолд, который представляет собой смешанную  $\alpha\beta$  структуру, состоящую из 2 антипараллельных  $\beta$ -листов, окруженных семью  $\alpha$ -спиралями и короткой  $\beta$ -шпилькой (Рисунок 2.6). Петли, соединяющие  $\beta 2$  и  $\alpha 4$  (аминокислотные остатки 77-87), а также  $\beta 4$  и  $\alpha 5$  (аминокислотные остатки 122-127), также, как и аффинный эпитоп из шести гистидинов на N-конце и аминокислотные остатки 2-12 отсутствуют в электронной плотности, возможно, ввиду неупорядоченности [7].

### 2.1.1.3 TRBD домен TERT

TRBD домен TERT (TRBD – Telomerase RNA Binding Domain, РНК-связывающий домен) расположен между TEN доменом и обратнотранскриптазным RT доменом. В отличие от TEN домена, TRBD обладает высокой консервативностью среди TERT различных организмов и необходим для работы теломеразы как *in vivo*, так и *in vitro* [56]. TRBD отвечает за формирование стабильного рибонуклеопротеидного комплекса, с высокой специфичностью связывая теломеразную РНК. TRBD содержит уникальные консервативные CP- и T- мотивы, а также специфичный для реснитчатых CP2-

мотив, вовлеченные в узнавание и связывание РНК, также образующие обширные контакты со шпилькой 1 и ТВЕ шпилькой (ТВЕ – Template Boundary Element – 5' граничный элемент – шпилька, ограничивающая матричный участок теломеразной РНК (Рисунок 2.12)) [57, 58].

Первая структурная информация об РНК связывающем домене теломеразной каталитической субъединицы появилась в 2007 году. Была решена структура TRBD *T.thermophila* с разрешением 1.71Å (Рисунок 2.7) [59].

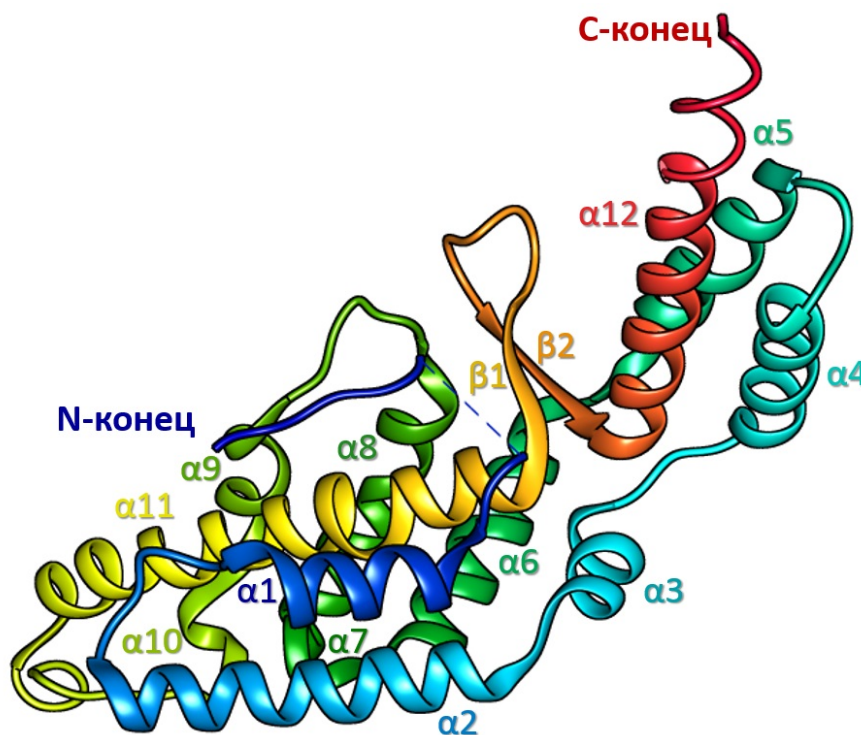


Рисунок 2.7

Кристаллическая структура TRBD *T.thermophila* (PDB Code ID 2R4G). Структура окрашена от С- к N-концу от красного к синему соответственно.

В электронной плотности присутствуют сигналы от аминокислотных остатков 259–265 и 277–519. Структура ttTRBD имеет уникальный фолд и состоит из 12  $\alpha$ -спиралей, связанных между собой несколькими петлями, и 2 коротких  $\beta$  листов.  $\alpha$ -спирали организованы таким образом, что молекула как бы разделена на две асимметричные половины, связанные между собой тремя длинными петлями. Большая половина состоит из девяти  $\alpha$ -спиралей, одна из которых ( $\alpha 11$ ) расположена в середине домена и проходит через всю его длину, образуя контакты со всеми остальными восемью  $\alpha$ -спиралями (Рисунок 2.7).

Меньшая половина молекулы состоит из трёх спиралей ( $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  и  $\alpha 12$ ). Эти спирали расположены под углом  $\approx 120^\circ$  к плоскости большей половины белка (Рисунок 2.7). Меньшая половина белка более подвижна, по сравнению с

большой половиной, что видно из более высокого В-фактора. Это может быть связано с отсутствием РНК субстрата [59]. Интересной особенностью структуры ttTRBD является  $\beta$ -шпилька, образованная 15 аминокислотными остатками, соединяющая спирали  $\alpha 11$  и  $\alpha 12$  большой и малой половин молекулы белка соответственно.  $\beta$  шпилька выступает из основания полости, образованной двумя половинами белка, и находится под углом  $45^\circ$  к плоскости меньшей половины молекулы (Рисунок 2.7). Её позиционирование и тот факт, что эта шпилька хорошо определена в плотности, можно отнести к спирали  $\alpha 7$  и петле, которая соединяет её со спиралью  $\alpha 8$ . Оба эти элемента удобно расположены в задней части  $\beta$  шпильки, удерживая её на месте [59].

РНК связывающий сайт ttTRBD представляет собой вытянутую частично гидрофобную, частично гидрофильную бороздку на поверхности белка, в состав которой входят Т- и СР-мотивы. Т-мотив расположен в центре молекулы, на месте стыка малой и большой половин белка. Он состоит из  $\beta$ -шпильки и  $\alpha 12$ . Эти структурные элементы формируют узкий карман ( $\approx 10\text{\AA}$ ) (Т-карман). СР-мотив образован спиралью  $\alpha 3$  и следующей петлёй. Он образует широкую ( $\approx 20\text{\AA}$ ) сильно положительно заряженную полость, расположенную под Т-карманом. Эти мотивы высоко консервативны и связывают одно- и двуцепочечную РНК с высокой аффинностью и специфичностью [59].

Структура TRBD, входящая в состав TERT жука *T. castaneum* также почти полностью состоит из  $\alpha$ -спиралей обладает хорошим сходством со структурой ttTRBD (среднеквадратичное отклонение, Root-mean-square deviation (RMSD)  $2.7\text{ \AA}$ ), что указывает на высокую степень структурной консервативности между этими доменами среди организмов различных филогенетических групп [6]. РНК-связывающая бороздка находится на внутренней поверхности кольца TERT ring, в непосредственной близости от активного центра. Считается, что это позволяет 5'-концу РНК входить внутрь кольца, где находится каталитический сайт фермента. Структурная информация подтверждается биохимическими исследованиями для теломераз реснитчатых, дрожжей и

человека, которые показали, что CP- и T- мотивы являются необходимыми для связывания теломеразной РНК и активности теломеразы *in vitro* и *in vivo* [60] [56] [34]. TRBD-домен TERT *S.cerevisiae* аналогичным образом содержит CP-, QFP- и T-мотивы. Мутации в регионе QFP влияют на связывание с теломеразной РНК и приводят к значительному ослаблению взаимодействия белка с теломеразной РНК, что говорит о важности данного региона для взаимодействия с TER.

С разрешением 2.37 Å, была решена структура TRBD позвоночного – рыбы бурый скалозуб, или бурый фугу (лат. *Takifugu rubripes*) (Рисунок 2.8) [61].

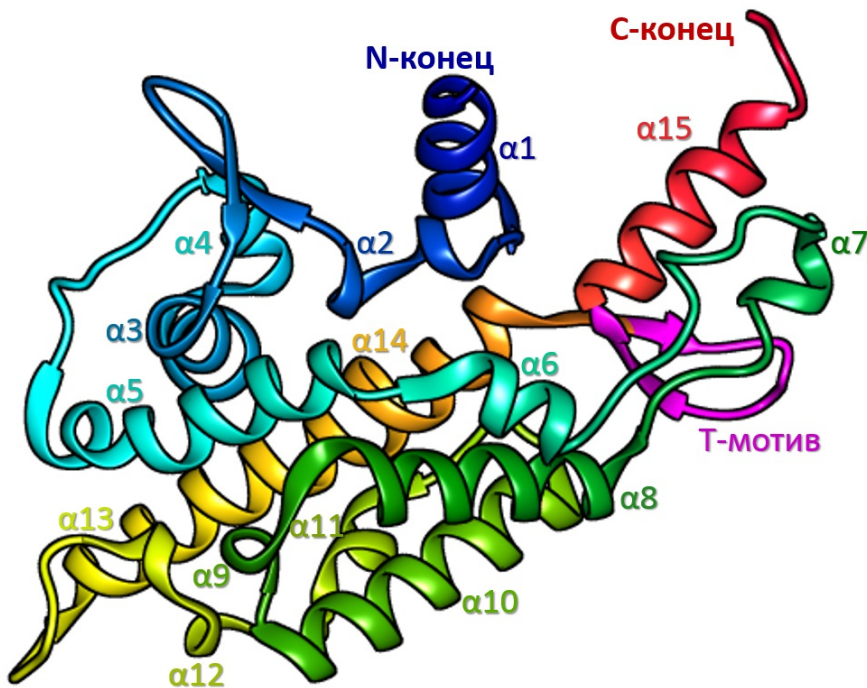


Рисунок 2.8

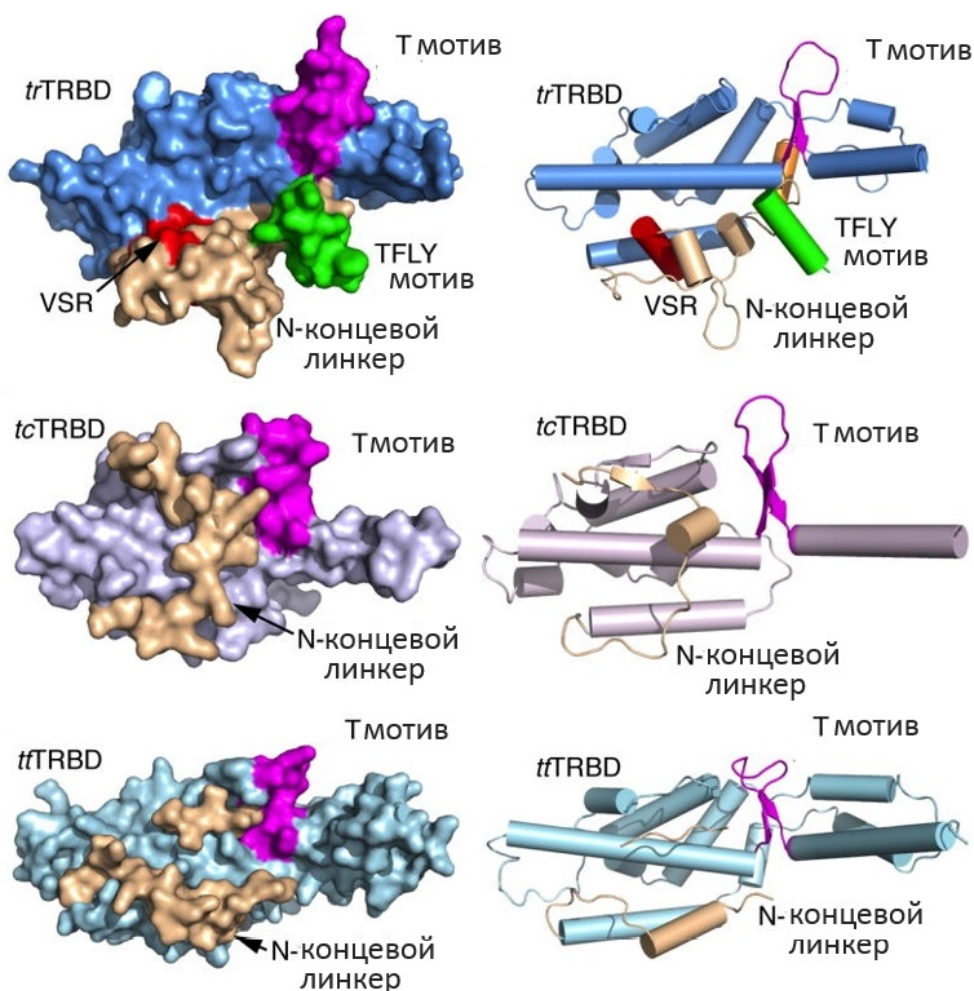
Кристаллическая структура TRBD *Takifugu rubripes*. (PDB Code ID 4LMO). Структура окрашена от C- к N-концу от красного к синему соответственно. Консервативный T-мотив выделен розовым.

trTRBD состоит из аминокислотных остатков 294–545. В состав trTRBD входят консервативные CP-, T- и специфический для позвоночных VSR мотив (VSR - vertebrate-specific RNA binding motif), который обеспечивает дополнительные контакты между TERT и TER. Он расположен в районе N-концевого линкера TERT и включает в себя короткую  $\alpha$ -спираль (Рисунок 2.8,  $\alpha 4$ , окрашена голубым), расположенную перпендикулярно спиральям  $\alpha 5$  и  $\alpha 14$ , идущих параллельно друг другу и проходящих через весь домен (Рисунок 2.8.  $\alpha 5$  –



светло-голубой и  $\alpha 14$  – желто-оранжевый). При этом часть  $\alpha 4$  погружена под петли и спирали, ограничивающие VSR мотив, содержащий консервативные аминокислотные остатки, участвующие в связывании с фрагментом CR4/5 (CR4/5 – Conserved Region 4/5, образует структуру Three-way junction (TWJ) (далее в обзоре)) теломеразной РНК [62]. Например, VSR мотив TERT человека расположен в районе с 355 по 366 аминокислотный остаток [63].

Другая особенность N-концевой части trTRBD – это короткая  $\alpha$ -спираль ( $\alpha 1$ ), расположенная перед VSR мотивом (Рисунок 2.8,  $\alpha 1$  окрашена синим), названная TFLY мотив (в её состав входят консервативные остатки TxxFLY). Она расположена перед VSR мотивом вблизи CP- и T- мотивов, таким образом участвуя в образовании T-CP кармана и предположительно участвует в связывании TBE элемента теломеразной РНК (TBE – Template Boundary Element) [59], а мутации в этой области негативно влияют на процессивность теломеразы [61]. TRBD *T.rubripes*, *T.castaneum* и *T.thermophila* обладают



высокой структурной гомологией (Рисунок 2.9) [61].

Рисунок 2.9 Кристаллические структуры TRBD *T.rubripes*, *T.castaneum* и *T.thermophila* обозначены trTRBD, tcTRBD и ttTRBD соответственно.

Структурные различия наблюдаются в области N-концевого линкера (Рисунок 2.9). Эта область обладает наименьшей консервативностью, например, TERT насекомых и червей содержит только часть этого линкера, который сильно варьируется как по длине, так и по последовательности даже для близких организмов [36]. При этом N-концевой линкер позвоночных содержит специфические для высших эукариот мотивы VSR и TFLY, вовлеченные в связывание TER. Из этого можно предположить, что N-концевой линкер TRBD менялся в ходе эволюции вместе с теломеразной РНК для поддержания высоко аффинного связывания и образования стабильного рибонуклеопротеидного комплекса.

Отдельно стоит рассмотреть структуры TRBD домена в комплексе с РНК. Это структуры TRBD пресноводной рыбы японская оризия или японская медака (лат. *Oryzias latipes*) в комплексе с CR4/5 (Conserved Region 4 и 5) фрагментом теломеразной РНК [64], и структура TRBD *T.thermophila* в комплексе с TBE (Template Boundary Element) [65].

CR4/5 домен теломеразной РНК позвоночных специфически связывает TRBD домен TERT и необходим для сборки и активности теломеразы [66, 62]. CR4/5 домен состоит из трёх консервативных участков – шпилек P5, P6 и P6.1, которые предположительно образуют структуру, называемую three-way-junction (TWJ) (Рисунок 2.10). При этом наибольшей консервативностью обладает шпилька P6.1, необходимая для активности теломеразы. [67]. В дрожжах также был идентифицирован консервативный TWJ элемент, аналогичный CR4/5 домену позвоночных [68]. Сайт связывания TRBD и CR4/5 частично затрагивает QFP мотив TRBD, расположенный между CP- и T- мотивами, а также включает N-концевой участок спирали  $\alpha 2$  (Рисунок 2.10). При этом другие консервативные мотивы, такие как TFLY, VSR, T- и CP- не участвуют в связывании CR4/5 и предположительно выполняют другую роль в работе теломеразы. Например, в связывании Template Boundary Element (TBE) [61].

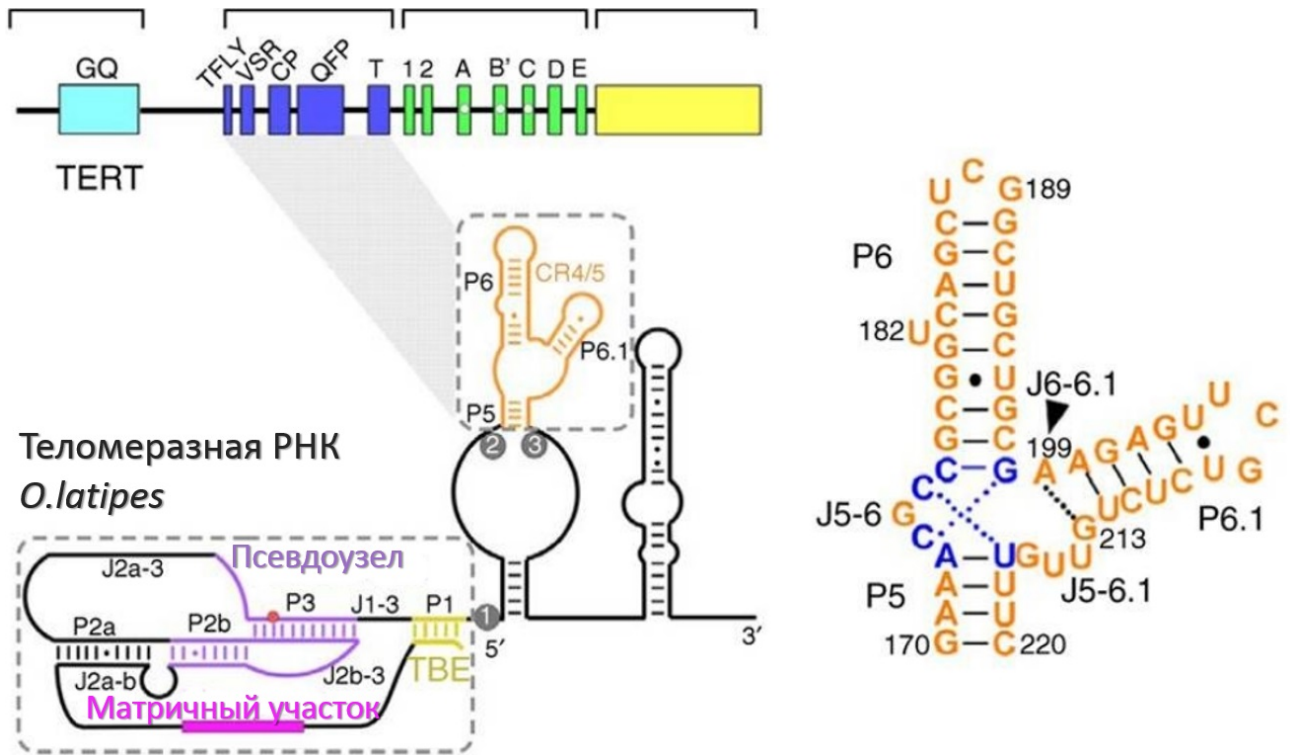


Рисунок 2.10. Сверху: схема расположения консервативных мотивов в последовательности oTERT. Внизу: модель вторичной структуры теломеразной РНК *Oryzias latipes*. Цветами выделены консервативные функциональные домены [64].

Из структуры комплекса TRBD–CR4/5 видно, что CR4/5 образует TWJ структуру L-формы (Рисунок 2.11). Шпильки P5 и P6 Stems P5 and P6 расположены соосно, образуя более длинную часть РНК в форме буквы L.

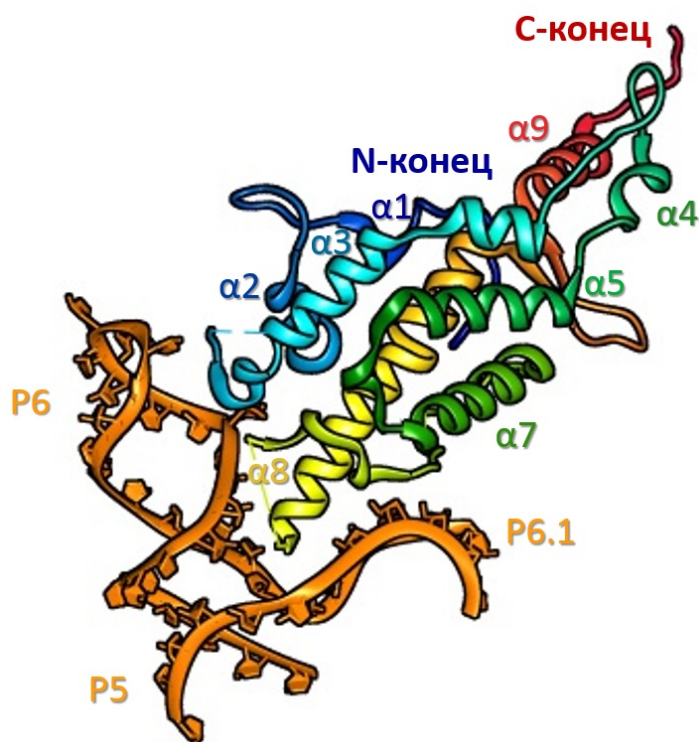


Рисунок 2.11

Кристаллическая структура TRBD *Oryzias latipes* (PDP Code ID 4O26). Структура окрашена от С- к N-концу от красного к синему соответственно.



В структуре *T.castaneum* TERT, связанной с модельным гибридом РНК-ДНК в активном центре, ориентация матричной РНК по отношению к tcTRBD соответствует модели, согласно которой взаимодействие с высоко аффинной РНК в этой области TERT может устанавливать границу матричного участка [38].

В теломеразе *T.thermophila* основание шпильки II и фланкирующая одноцепочечная РНК соответствуют ТВЕ элементу TER (5' граничный элемент, Template Boundary Element, ТВЕ) и связываются с T-, CP- и CP2- мотивами. Было показано влияние CP2- мотива на определение границы матричного участка, а также близкое расположение этого мотива к ТВЕ элементу TER, основанию петли II [58] (Рисунок 2.12). Введение мутаций в ТВЕ или в любой из мотивов T-, CP- и CP2- приводит к потере связывания белка с РНК и дефекты в обратной транскрипции *in vitro* [56, 58].

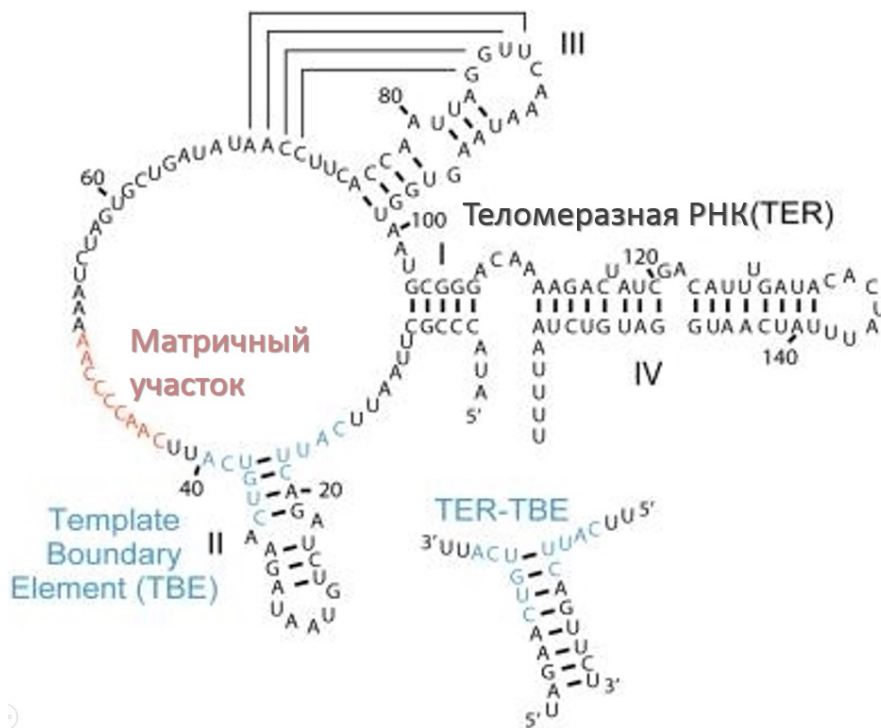


Рисунок 2.12

Модель вторичной структуры

теломеразной

РНК *T.thermophila*.

Матричный участок

отмечен розовым,

Template Boundary

Element (ТВЕ) отмечен

голубым. Отдельно

представлен фрагмент,

использующийся при

кристаллизации [65].

Для получения структуры ttTRBD в комплексе с ТВЕ была использована конструкция белка, включающая аминокислотные остатки 217-516, а отличие от более ранней структуры, в состав белка которой входили аминокислотные

остатки 259-519. Кроме того, шпилька II была оптимизирована посредством замены выпетливающих A22-A34 на U22-A34 (Рисунок 2.12). Разрешение полученной структуры составило 3 Å. В полученной структуре ttTRBD связывается в основании шпильки II, отводя 5'- и 3'-фланкирующие шпильку цепи в противоположных направлениях (Рисунок 2.11). Все РНК-белковые контакты наблюдаются у основания шпильки II, а остальная часть шпильки направлена перпендикулярно к поверхности белка (Рисунок 2.13). При этом основу взаимодействия ttTRBD-ТВЕ представляют собой полярные контакты между тремя консервативными мотивами и сахаро-фосфатным остовом РНК [65].

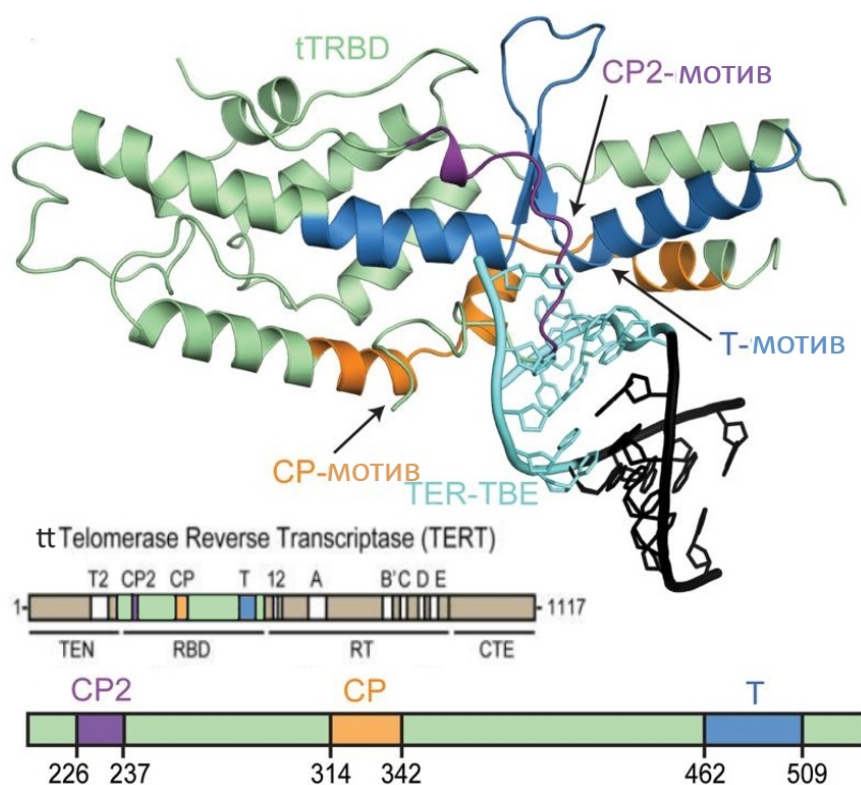


Рисунок 2.13

Кристаллическая структура комплекса ttTRBD-ТВЕ (PDB Code ID 5C9H). ttTRBD окрашен светло-зелёным, CP2-, CP-, и Т-мотивы окрашены фиолетовым, оранжевым и синим соответственно. ТВЕ окрашена голубым, а остальная часть

шпильки II черным. Схема расположения консервативных мотивов в последовательности ttTERT [65].

Существует предположение, что CP2-мотив ttTRBD, вместе с CP- и Т-мотивами напрямую связывающий ТВЕ элемент теломеразной РНК в *T.thermophila*, структурно и функционально гомологичен TFLY мотиву, идентифицированному у позвоночных *T.rubripes* и *O.latipes* [65]. Это кажется

вполне возможным, так как TFLY, VSR, T- и CP- мотивы oTRBD не участвуют в связывании CR4/5 и могут участвовать в связывании 5' граничного элемента (TBE) [61]. При этом ранее было показано, что функциональным аналогом шпильки II *Tetrahymena*, представляющей собой TBE элемент, является шпилька P1 теломеразной РНК позвоночных [69]. В связи с этим дальнейшей задачей может быть изучение взаимодействия шпильки P1 и TRBD позвоночных.

#### 2.1.1.4 RT домен TERT

Центральный домен (RT – Reverse Transcriptase, обратнотранскриптазный домен) обладает высокой консервативностью с другими обратными транскриптазами и имеет семь канонических обратнотранскриптазных мотивов, 1, 2, A, B или B', C, D, E, важных для каталитической активности и включает в себя субдомены пальцы и ладонь. Структура RT домена tcTERT представляет собой смесь  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -листов, организованных в два субдомена: пальцы и ладонь, аналогично ретровирусным обратным транскриптазам [39], вирусным РНК полимеразам [70] и ДНК полимеразам В-семейства [71] (Рисунок 2.14).

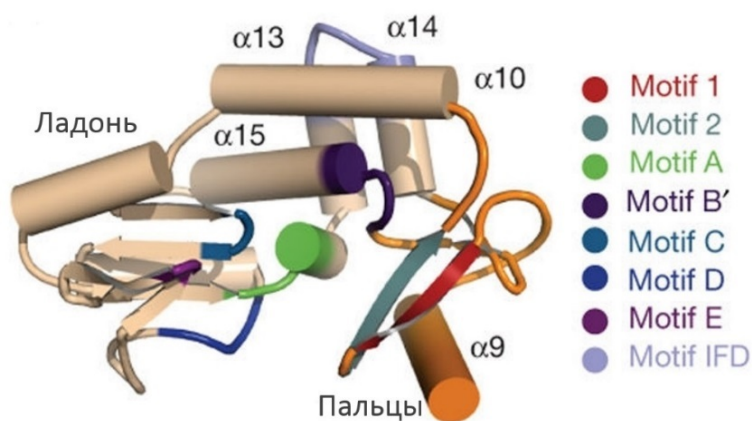


Рисунок 2.14.

Обратнотранскриптазный домен tcTERT состоит из субдоменов ладонь и пальцы. Субдомен пальцы состоит из мотивов 1 (красный) и 2 (серый) и вовлечен в

связывание нуклеотидов и РНК. Субдомен ладонь состоит из мотивов А (зеленый), В (фиолетовый), С (голубой), D (синий), E (сиреневый) и IFD (светло-голубой) и вовлечен в связывание нуклеотидов, нуклеиновых кислот и синтез ДНК.

Кроме того, обратнотранскриптазный домен теломеразы содержит инвариантную триаду аспартатов, которая предположительно вовлечена в связывание ионов металлов и катализ.

Принципиальное отличие между доменом ладонь TERT и обратной транскриптазы HIV – это наличие длинной последовательности между мотивами А и В в TERT. Она представляет собой IFD мотив, необходимый теломеразе для процессивности и привлечения на теломеры при участии TPP1, что предполагает взаимодействие IFD с TPP1 теломерным белком человека [32, 72, 73]. В структуре tcTERT, IFD мотив состоит из двух антипараллельных  $\alpha$ -спиралей ( $\alpha 13$  и  $\alpha 14$ ), расположен на внешней периферии TERT ring и на границе доменов пальцы и ладонь (Рисунок 2.14). Эти две спирали расположены практически параллельно центральной оси плоскости кольца, образуют множественные контакты со спиралями  $\alpha 10$  и  $\alpha 15$ , и играют важную роль в структурной организации этой части обратнотранскриптазного домена (Рисунок 2.14) [6]. При этом контакты между матричным участком TER и мотивами 2 и В располагают остатки РНК близко к активному центру фермента, обеспечивая связывание нуклеотидов и селективность [38]. Мутационный анализ TERT также подтверждает высокую степень функциональной консервативности теломеразных и ретровирусных RT [74].

#### 2.1.1.5 CTE домен TERT

С-концевой домен TERT (СТЕ – С-Terminal Extension, С-концевой домен или домен большой палец) имеет важное значение для активности и процессивности теломеразы [75, 76, 77]. С-концевой домен TERT (СТЕ) имеет довольно низкую консервативность среди различных организмов, однако в нём выделяют мотивы E-I, E-II, E-III и E-IV.

В структуре TERT *T. castaneum* СТЕ-домен расположен определенным образом по отношению к остальным доменам и представляет собой так называемый домен большой палец, если следовать общепринятой классификации доменов полимераз. Он представляет собой удлиненный пучок

спиралей и содержит несколько длинных петель, экспонированных на поверхность (Рисунок 2.15). Он обладает уникальным фолдом, при этом при наложении tcTERT на структуры обратной транскриптазы HIV, вирусной РНК полимеразы и ДНК полимеразы В-семейства, СТЕ располагается аналогично доменам большого пальца этих ферментов относительно субдоменам пальца и ладонь. Таким образом СТЕ выполняет функцию субдомена большой палец в теломеразной каталитической субъединице, что подтверждается результатами биохимических экспериментов [75].

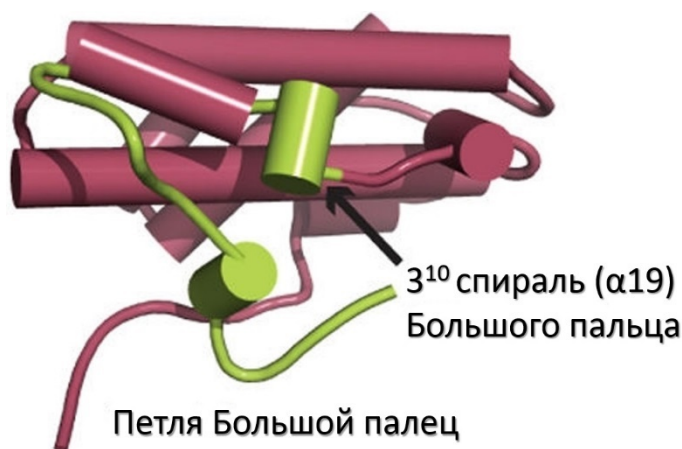


Рисунок 2.15. Структура СТЕ-домена *T.castaneum*. Спиральный домен большой палец TERT состоит из петли (петля большой палец, окрашена салатным), вовлеченной в доменную организацию и связывание ДНК [6].

Петля большой палец, соединяющая субдомены ладонь и большой палец, и являющаяся продолжением мотива E, также известна как регион связывания праймера (primer grip) теломеразы, то есть участок связывания 3' выступающей G-богатой цепи теломерной ДНК. Боковые цепи лизинов и аспарагинов, которые формируют часть этой петли, направлены к центру TERT и участвуют в правильном позиционировании праймера.

Другой интересной особенностью домена большой палец является спираль α19 или 3<sup>10</sup> спираль (3<sup>10</sup> спираль большого пальца) (Рисунок 2.15). Она проходит по поверхности кольца, вероятно взаимодействует с малой бороздкой двуцепочечных нуклеиновых кислот, таким образом участвуя в связывании и стабилизации РНК-ДНК гибрида. Удаление или мутации в этой области приводят к потере процессивности теломеразы человека и дрожжей, что явно указывает на важную роль этого мотива в работе TERT [75, 76, 77]. В TERT *T. castaneum* СТЕ-домен и TRBD-домен сближены в пространстве. Такое



расположение доменов TERT способствует образованию центральной поры, в которой могут быть расположены двуцепочечные нуклеиновые кислоты длиной 7-8 пар оснований, что хорошо согласуется с экспериментальными данными о длине гетеродуплекса в активном центре теломеразы [78,38].

В TERT *S. cerevisiae* С-концевой домен необходим для стабильности Est2p, а также активности и процессивности теломеразы [75].

В клетках человека этот домен также играет важную роль в поддержании длины теломер. Удаление С-концевого домена приводит к полной инактивации теломеразы. [77].

Недавно была получена кристаллическая структура СТЕ домена TERT теломеразы человека [79]. Структура была получена для конструкции, включающей в себя аминокислотные остатки 961-1132 и была решена с разрешением 2.31 Å. СТЕ домен состоит из шести  $\alpha$ -спиралей (Рисунок 2.16).

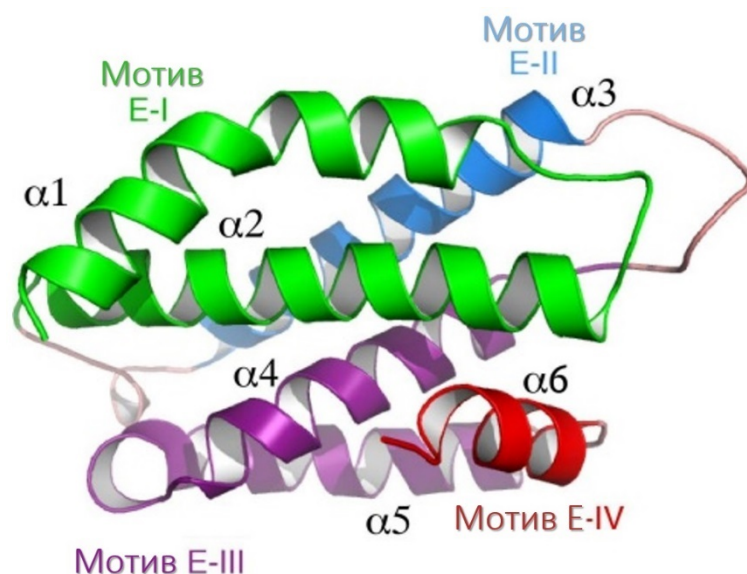


Рисунок 2.16.

Кристаллическая структура С-концевого домена TERT человека (hCTE) (PDB Code ID 5UGW). Мотивы E-I, E-II E-III и E-IV окрашены зелёным, голубым, фиолетовым и красным соответственно [79].

В состав этой конструкции входят три консервативных мотива: E-I, E-II и E-III, вовлеченные во взаимодействие с нуклеиновыми кислотами [38] [6]. Одним из высоко консервативных участков hCTE является так называемый FVYL карман, образованный петлями, соединяющими мотивы E-I, E-II и E-III. Ранее было показано, что он связывает шпильку Р6.1, входящую в состав CR4/5 домена теломеразной РНК. FVYL карман представляет собой небольшой зазор, образованный концами и соединениями спиралей  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  и  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  (Рисунок 2.16).

FVYL карман имеет ширину 14Å и глубину 8Å, этого пространства достаточно для вмещения 2-3 нуклеотидных остатков.

Полученная структура hCTE хорошо накладывается на структуру CTE-домена *T.castaneum* (Среднеквадратичное отклонение - RMSD 2.5 Å) (Рисунок 2.17).

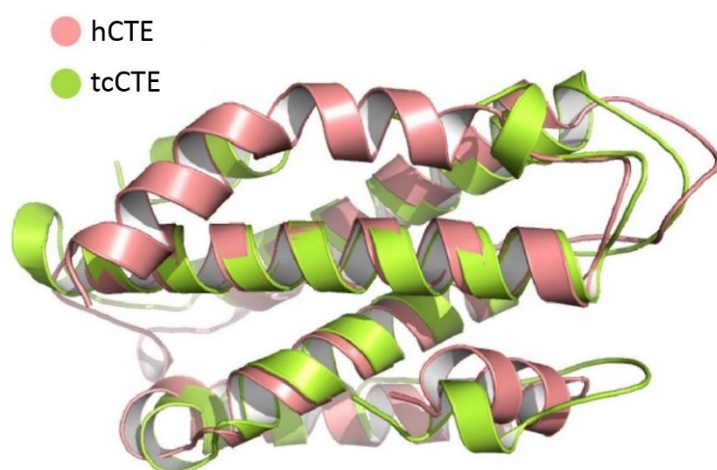


Рисунок 2.17. Наложение структур CTE доменов TERT человека (розовый) и *T.castaneum* (салатовый) [79].

Кроме того, были показаны мутации в hCTE, связанные с такими заболеваниями как апластическая анемия и идиопатический легочный фиброз. Эти мутации расположены в области hCTE, предположительно связывающей дуплекс ДНК с матричной РНК.

#### *Выводы из раздела 2.1.1*

Каталитическая субъединица теломеразы (теломеразная обратная транскриптаза, TEIomerase Reverse Transcriptase – TERT) состоит из нескольких доменов: TEN-домен, TRBD, RT-домен (включающий субдомены пальцы и ладонь) и CTE (субдомен большой палец), которые обладают важными свойствами для стабильности, функциональности, активности и процессивности теломеразы (Рисунок 2.18).

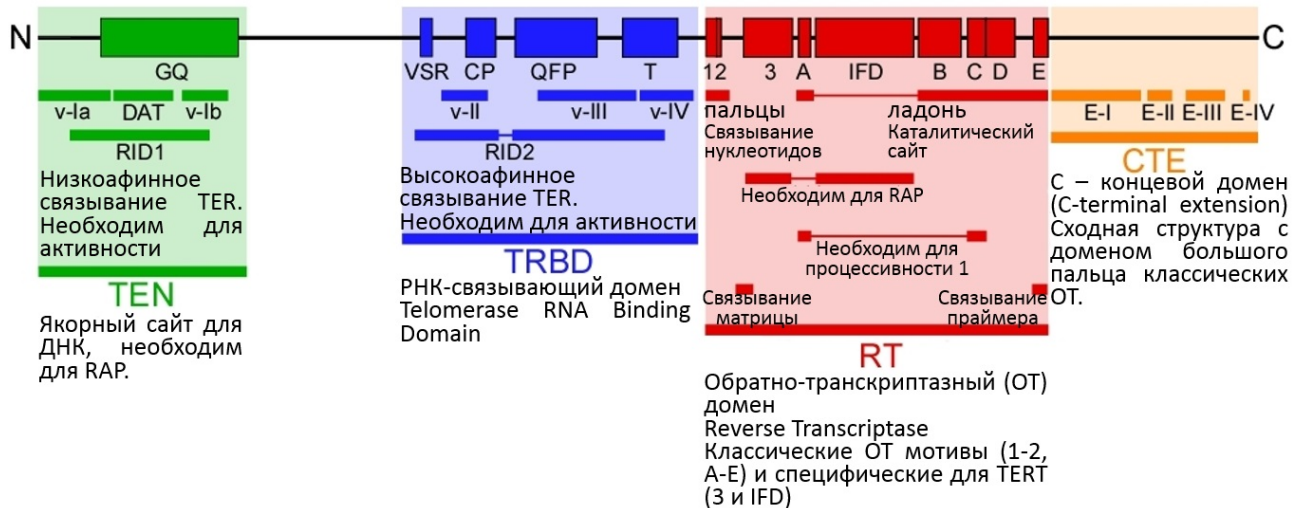


Рисунок 2.18. Схема доменной организации TERT. В состав TERT входят N-концевой домен (TEN, зелёный), РНК-связывающий домен (TRBD, синий), каталитический (обратотранскриптазный) домен (RT, красный) и C-концевой домен (CTE, оранжевый). Границы доменов обозначены в соответствии с положением в аминокислотной последовательности. [25].

TERT организован в закрытую кольцевую структуру (TERT ring), содержащую большую полость внутри кольца, где матричная РНК и ДНК связываются во время удлинения теломер. Закрытая конфигурация TERT ring стабилизируются взаимодействиями между доменом большой палец (CTE) и TRBD, а также связыванием теломеразной РНК. Несколько консервативных мотивов во внутренней полости TERT ring координируют матричный участок теломеразной РНК и теломерный выступающий конец ДНК и позиционируют 3' конец ДНК для осуществления катализа. Мотивы E-I и E-II домена большой палец связывают ДНК-РНК гибрид и стабилизируют теломеразный комплекс. Регион связывания праймера (primer grip region) CTE домена позиционирует ДНК в активном сайте фермента и мотивы 2 и B субдоменов пальца и ладонь, которые участвуют в позиционировании матричного участка теломеразной РНК в активном сайте фермента, обеспечивая связывание нуклеотидов и селективность.

TERT дрожжей *Hansenula polymorpha* также обладает доменной структурой, и этот факт может быть использован для новых структурных



исследований, которые могли бы помочь в понимании механизма работы теломеразы и ее регуляции.

### 2.1.2 Теломеразная РНК

Теломеразная РНК (Telomerase RNA – TR или TER, для дрожжей часто можно встретить другое название теломеразной РНК – Telomerase Component 1 – TLC1) в различных организмах значительно отличается по размеру, последовательности и вторичной структуре. Длина TER может варьироваться от ~150 нуклеотидов в *Tetrahymena thermophila* [80] до ~2030 нуклеотидов в *Candida glabrata* [81]. Несмотря на это, TER ресничных, дрожжей и млекопитающих имеет ряд общих структурных элементов (Рисунок 2.19):

1. Матричный участок для синтеза теломерного повтора
2. 5' граничный элемент (5' Template Boundary Element (TBE))
3. Псевдоузел
4. Элемент на терминальной ветви (“stem terminus” element (STE)), состоящий либо из шпильки, либо из шпильки с петлёй и структуры three-way junction (TWJ), либо только из TWJ, в зависимости от организма.



### 2.1.2.1 Матричный участок

Каждая TER содержит матричный участок для *de novo* синтеза теломерных ДНК повторов на концах хромосом. У подавляющего большинства эукариот теломерная ДНК содержит повторы шести нуклеотидной последовательности 5'-(TTAGGG)<sub>n</sub>-3' (Рисунок 2.20). При этом инфузории и растения синтезируют теломерные ДНК-последовательности с одноточечной мутацией или вставкой, тогда как теломерная ДНК большинства видов дрожжей различается сильнее [83].

Для синтеза теломерных повторов в матричном участке теломеразной РНК выделяют 2 фрагмента: комплементарный участок и матрицу (Рисунок 2.20). Комплементарный участок обеспечивает образование дуплекса с ДНК праймером в начале каждого цикла синтеза нового повтора, в то время как матрица определяет последовательность синтезируемого повтора. Матричный участок TER как правило содержит полтора – два теломерных повтора [80, 84]. Например, матричный участок TER человека состоит из 11 нуклеотидов, 5 нуклеотидов входят в комплементарный участок и 6 нуклеотидов – в матрицу, кодируя теломерный повтор GGTTAG (Рисунок 2.20). Комплементарный участок TER необходим теломеразе для процессивности 2 типа – repeat addition processivity (RAP), способности синтезировать несколько теломерных повторов подряд без диссоциации теломеразы. Было показано, что длина комплементарного участка напрямую влияет на RAP. Процессивность может быть сильно увеличена при удлинении комплементарного участка [69].

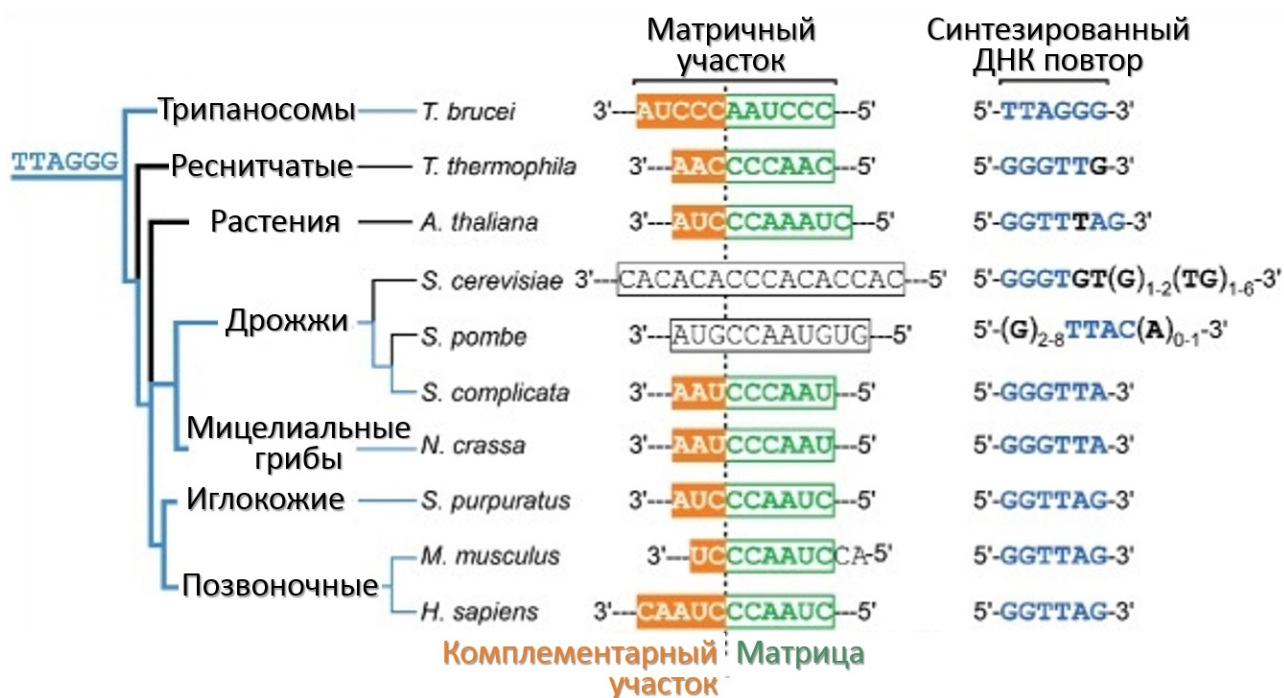


Рисунок 2.20 Эволюция теломерных ДНК повторов и матричных участков TER. Матричный участок TER состоит из 3' комплементарного участка (оранжевый) и 5' матрицы (зелёный). Комплементарный участок позиционирует 3' конец теломерной ДНК, а по матрице осуществляется синтез. Для матричного участка почкующихся и делящихся дрожжей матрица и комплементарный участок плохо определены (черный прямоугольник). 5'-TTAGGG-3' (синий) теломерные ДНК повторы эволюционно консервативны и обнаруживаются в большинстве эукариот. Отклонения от канонической последовательности выделено черным. На схеме представлены следующие виды: *Trypanosoma brucei*, *Tetrahymena thermophila*, *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saitoella complicata*, *Neurospora crassa*, *Strongylocentrotus purpuratus*, *Mus musculus* и *Homo sapiens*.

Кроме влияния на RAP, последовательность матричного участка влияет на активность теломеразы. Введение мутаций в TER человека влияют на скорость синтеза теломерных повторов [85]. Для одного вида дрожжей было показан механизм контроля длины теломер, на конец только что удлинённой теломеразой хромосомы добавляется дополнительный, следующий за

матрицей, нуклеотид, что препятствует повторному удлинению данной хромосомы [86].

Интересно, что число нуклеотидов в ДНК-РНК дуплексе теломеразы *S.cerevisiae* остаётся постоянным на протяжении элонгации [78]. При добавлении нуклеотидов на конец хромосомы, дуплекс в начале матричного участка разрушается. После полного копирования матрицы, происходит транслокация и новый раунд обратной транскрипции.

### 2.1.2.2 TBE элемент

За матричным участком следует двуцепочечная спираль, называемая 5'-граничным элементом (TBE – Template Boundary Element, 5' граничный элемент), которая в процессе обратной транскрипции препятствует прочтению последовательности, идущей за матрицей.

Среди всех TBE элементов выделяют два типа (Рисунок 2.19):

1. Примыкающая к матричному участку спираль, структурно схожая для всех эукариот
2. Находящаяся на некотором расстоянии от матричного участка спираль, обнаруживается только у позвоночных

TBE элемент первого типа физически ограничивает доступность одноцепочечной РНК, которую можно использовать в качестве матрицы. В TER реснитчатых TBE представляет собой короткую шпильку с петлёй на конце (stem-loop structure), шпилька II, она обладает высоко консервативной последовательностью и является сайтом связывания мотива CP2 TRBD домена TERT [58]. Связывание TERT препятствует использованию последовательности, фланкирующей матрицу, для дальнейшего синтеза. В жгутиковых TBE также состоит из примыкающей к матрице петли, предположительно связывающейся с TERT [87]. TBE элемент в дрожжах представляет собой стабильную шпильку, расположенную сразу за матричным участком [84].

ТВЕ элемент TER позвоночных отличается от остальных эукариот и представляет собой двуцепочечный фрагмент TER (шпилька P1), отделенный от матричного участка одноцепочечным линкером. TFLY мотив TRBD TERT связывает шпильку P1 либо прилегающий одноцепочечный линкер [61].

### 2.1.2.3 Псевдоузел

Другим консервативным элементом является псевдоузел, стабилизированный тройной спиралью [88]. Предполагается, что он правильно ориентирует дуплекс ДНК-субстрат/матрица в активном центре теломеразной обратной транскриптазы.

Структура псевдоузла TER человека, полученная с помощью ЯМР, подтвердила образование трёхмерной структуры тройной спирали, состоящий из двух шпилек, в которых половина стебля одной шпильки располагается между двумя половинами стебля другой шпильки (Рисунок 2.21).

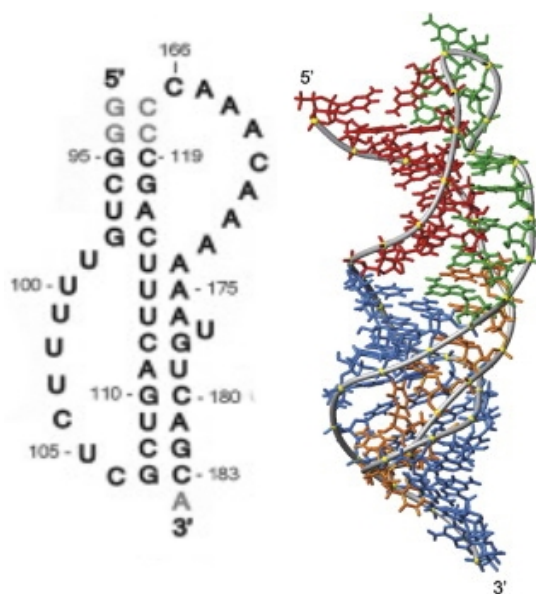


Рисунок 2.21. Вторичная структура псевдоузла TER человека (слева) и ЯМР структура с минимальной энергией псевдоузла TER человека (сахаро-фосфатный остов показан серой лентой).

При этом нарушение этой структуры приводит к нарушению активности теломеразы *in vivo* [89]. Аналогичные результаты были получены для псевдоузла пресноводной рыбы японская орязия или японская медака (лат. *Oryzias latipes*) [90]. Кроме того, было показано, что такая структура является консервативным и необходимым элементом TER дрожжей [91].

### 2.1.2.4 STE элемент

В структурах теломеразных РНК также можно выделить элемент на терминальной ветви (STE – Stem Terminus Element, элемент на терминальной

ветви): это либо концевая шпилька (спираль IV у *T.thermophila*), либо место смыкания трех спиралей TWJ (Three Way Junction - у дрожжей; структура CR4/5 (Conserved Region 4/5), представляющая собой шпильки P5, P6 и P6.1, образующие TWJ - у человека).

STE элемент был открыт в млекопитающих и было показано, что он необходим для активности теломеразы *in vitro* и *in vivo* [66]. STE элемент человека состоит из TWJ (носит название CR4/5 (Conserved Region 4/5)) и шпильки P6.1, причем нуклеотидная последовательность в области этой шпильки высоко консервативна от мыши до человека и необходима для активности теломеразы. TWJ структура идентифицирована во всех предсказанных вторичных структурах TER дрожжей и позвоночных [68]. При этом TWJ элемент в грибах, почкующихся дрожжах и в человеке, абсолютно необходим для активности теломеразы и взаимодействует с TERT [84].

Мицелиальные грибы содержат в составе TER и TWJ, и P6.1 шпильку [92]. TER реснитчатых не содержит TWJ структуру, но спираль IV имеет структурное и функциональное сходство со шпилькой P6.1 позвоночных, она необходима для активности теломеразы *in vitro* и стимулирует процессивность при добавлении *in trans* [93].

Хотя TWJ структура очень широко распространена, шпилька P6.1, примыкающая к TWJ TER человека, отсутствует в некоторых дрожжах, в том числе в *S.cerevisiae*. Более того, в делящихся дрожжах *S.cerevisiae* STE элемент теломеразной РНК (теломеразная РНК дрожжей – TLC1) не является необходимым для функционирования теломеразы. Для этих дрожжей было показано функционирование *in vivo* фрагмента теломеразной РНК размером 500 н.о. miniT. В этой РНК удалены внутренние регионы трех ветвей, но сохранены сайты связывания дополнительных белков: Est1, Ku-гетеродимера (Ku 70/80) и Sm-белков [94]. Теломеразный белок Est1 необходим для привлечения теломеразы на теломеры. Гетеродимер Ku 70/80 участвует в репарации двуцепочечных разрывов ДНК, а также важен для функционирования теломеразы на теломере. Sm-белки необходимы для созревания теломеразной

РНК, они образуют гептамерный комплекс в виде кольца, который связывается возле 3'-конца TER и является необходимым для стабильности теломеразной РНК. Для других делящихся дрожжей, *Schizosaccharomyces pombe*, было показано влияние STE элемента на работу TBE, а также на правильность синтезируемых теломерных повторов и, как следствие, связывание теломерных белков [95]. В то же время для дрожжей *Kluyveromyces* было показано, что мутации, нарушающие структуру TWJ, приводят к потере активности теломеразы *in vitro* [68]. Таким образом, функция STE элемента пока остаётся не до конца понятной.

#### 2.1.2.5 Сайты связывания ассоциированных белков

Структура теломеразной РНК содержит дополнительные элементы, обеспечивающие ассоциацию с белками, ответственными за созревание и стабильность TER, а также за локализацию теломеразного комплекса. Спираль IV и поли-U хвост на 3'-конце TER *T. thermophila* служат сайтом связывания белка p65, который участвует в сборке активного теломеразного комплекса p65–TER–TERT. 3'-конец TER млекопитающих содержит консервативный структурный домен, названный H/ACA (hairpin-Hinge-hairpin-ACA), с которым связывается две копии дискеринового комплекса, состоящего из белков дискерина, NHP2, NOP10 и GAR1. Также на 3'-конце TER в CR7 петле расположен САВ мотив связывания telomerase Cajal body protein 1 (TCAB1), отвечающий за локализацию TER в тельцах Кахаля, образованиях в клеточном ядре, где происходит процессинг малых ядерных и малых ядрышковых РНК, а также сборка рибонуклеопротеиновых комплексов, в том числе теломеразы.

В структурах TER дрожжей из центрального домена выходят три длинные ветви, на концах которых находятся сайты связывания белков Est1, Ku-гетеродимера (Ku 70/80) и Sm-белков. Предполагается, что дрожжевая TER отвечает за их посадку, но не обеспечивает их точное позиционирование в общем рибонуклеопротеидном комплексе [96]. Поддерживает эту идею возможность функционирования *in vivo* miniT размером 500 н.о. – TLC1 (TER



*S. cerevisiae*), в которой удалены внутренние регионы трех ветвей, но сохранены сайты связывания вышеперечисленных белков [94].

### *Выводы из раздела 2.1.2*

Теломеразная РНК (TER) – один из основных компонентов теломеразы. В отличие от каталитической субъединицы, TER сильно различаются по длине, последовательности и структуре (Рисунок 2.22). Однако, тем не менее, в структуре TER можно выделить несколько консервативных участков:

1. Матричный участок, с которого осуществляется синтез теломерной ДНК. Длина матричного участка обычно варьируется в пределах 1,5-2 теломерных повторов, он включает в себя комплементарный участок и матрицу для обратной транскрипции, определяющую нуклеотидную последовательность ДНК повтора.
2. TBE элемент, Template Boundary Element, 5' граничный элемент, представляет собой РНК шпильку. TBE в процессе работы теломеразы препятствует прочтению последовательности, идущей за матрицей.
3. Псевдоузел, взаимодействует с TERT и необходим для активности теломеразы, вероятно, участвуя в позиционировании ДНК-РНК дуплекса в активном центре фермента
4. STE элемент, «stem terminus» element, элемент на терминальной ветви, наименее консервативный компонент TER. Представляет собой либо концевая шпилька (реснитчатые), либо место смыкания трех спиралей TWJ (Three Way Junction (дрожжи) или CR4/5 – Conserved Region 4/5, включающая шпильки P5, P6 и P6.1, образующие TWJ (позвоночные).
5. Сайты связывания вид-специфических ассоциированных белков, H/ACA (hairpin-Hinge-hairpin-ACA) мотив на 3'-конце TER млекопитающих, спираль IV и поли-U хвост на 3'-конце TER *T.thermophila* или Est1-связывающая шпилька и сайт посадки Ku-гетеродимера (Ku 70/80) и Sm-белков в дрожжах.

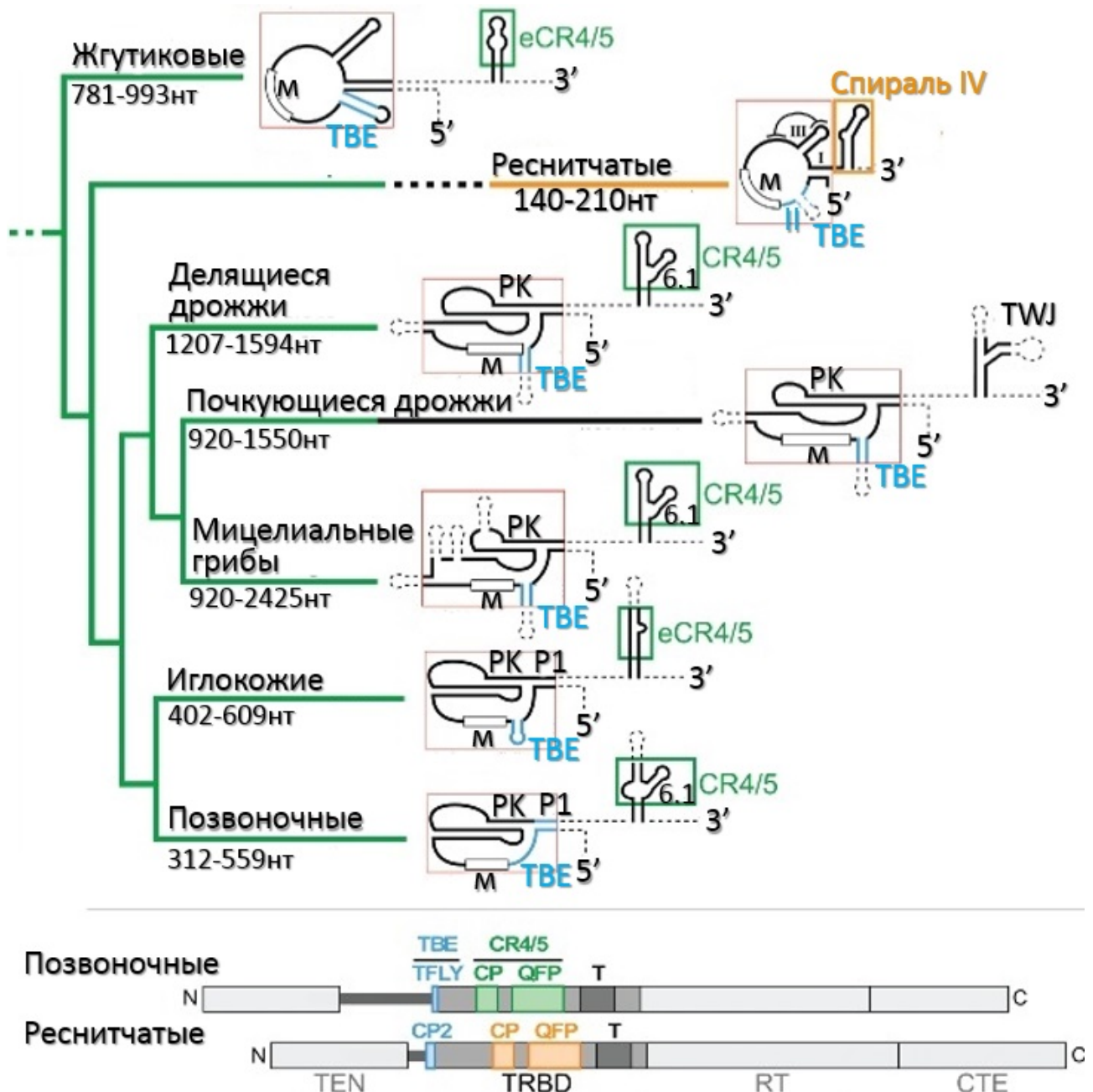


Рисунок 2.22. Структуры TER из различных организмов. Отмечены домены, необходимые для активности теломеразы. Коровая часть выделена красным квадратом, включает в себя матричный участок (м), TBE элемент (голубой) и псевдоузел (PK – PseudoKnot). CR4/5 элемент (Conserved Region 4/5) (зелёный) обладает схожей структурой даже среди удалённых видов (структура TWJ – смыкание трёх спиралей). CR4/5 иглокожих не содержит шпильку P6.1 и её наличие менее важно для работы теломеразы, а TWJ дрожжей *S. cerevisiae* также не содержит P6.1 шпильку и не обязателен для работы фермента. Спираль IV реснитчатых имеет структурное и функциональное сходство со шпилькой P6.1 и необходима для активности

теломеразы. Внизу: Схема доменного состава TERT реснитчатых и позвоночных. TRBD (РНК связывающий домен) содержит консервативные мотивы, TFLY и CP2 мотивы (голубой), взаимодействующие с TBE элементом, CP и QFP мотивы (зелёный) взаимодействуют с CR4/5 структурой. Взаимодействие спирали IV с TRBD доменом реснитчатых достоверно не показано [83].

## 2.2 Дополнительные компоненты теломеразы

*In vivo*, для успешного удлинения теломер требуются дополнительные субъединицы. Одни из них способствуют сборке активного теломеразного комплекса, другие регулируют его доступ к теломерам и посадку на них. Состав теломеразного комплекса различается в различных организмах, что влияет на механизм сборки и работы теломеразы. В данном обзоре мы рассмотрим дополнительные компоненты и работу теломеразы в таких организмах как реснитчатые, на примере *T. thermophyla* как наиболее хорошо изученного, дрожжи и человек.

### 2.2.1 Структура дополнительных компонентов теломеразного комплекса реснитчатых

Недавно была опубликована структура теломеразного комплекса реснитчатых *Tetrahymena Thermophila*, полученная методом криоэлектронной микроскопии с разрешением  $\approx 9 \text{ \AA}$  [97]. В этой работе был применён метод интегративной структурной биологии, позволяющий получить представление об общей структуре исследуемого объекта, комбинируя данные негативного контрастирования, криоэлектронной микроскопии, кристаллографии, ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии. В состав теломеразы *Tetrahymena* входят девять белков и TER (Рисунок 2.23, 2.24). Только TERT и белок p65 напрямую взаимодействуют с TER, определяя коровую часть фермента, необходимую для биогенеза и катализа. Теломераза *Tetrahymena* состоит из каталитической части, включающей TERT, TER и p65; паралога репликативного белка A (Replication Protein A (RPA)) – TEB комплекса, в состав которого входят белки

Teb1, Teb2 и Teb3; и второго аналога RPA - белки теломер человека CTC1-STN1-TEN1 (CST комплекс), состоящий из p75, p45, p19. Все три комплекса взаимодействуют с белком p50 (Рисунок 2.23).

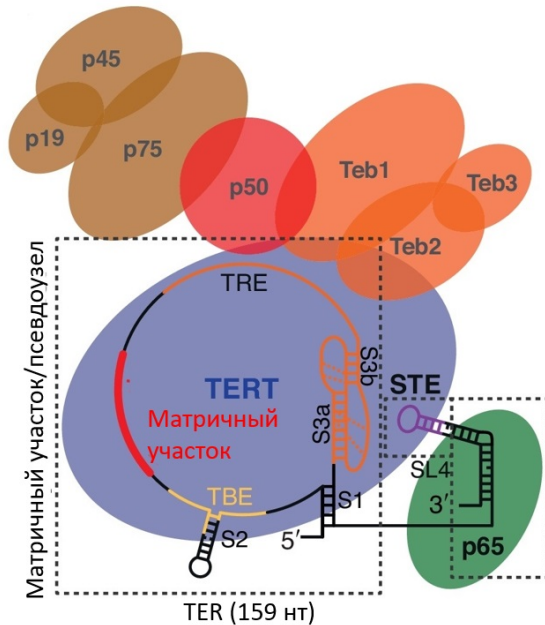


Рисунок 2.23. Схема теломерного комплекса *Tetrahymena Thermophila*.

Дополнительные белки p75-p45-p19, которые ранее считались специфичными только для *Tetrahymena*, оказались структурными и функциональными гомологами белков теломер человека TPP1 и CTC1-STN1-TEN1 (CST комплекс) (Рисунок 2.23). Белок Teb1, паралог большой субъединицы репликативного белка А (Replication Protein A (RPA70)) образует тройной комплекс с двумя ранее неизвестными белками, Teb2 и Teb3. При этом роль Teb2-Teb3 в TEB комплексе пока не до конца ясна, однако предполагается, что они усиливают активность TEB комплекса.

Комплекс p50-Teb1 обеспечивает RAP (repeat addition processivity) теломеразы аналогично теломерным белкам TPP1-POT1 и активируют теломеразную активность [98]. Прямое взаимодействие Teb1 с одноцепочечной ДНК необходимо для привлечения теломеразы на теломеры [99]. Teb1 содержит три OB-fold домена, А, В и С, которые необходимы для активности теломеразы (укладка OB-fold – Oligonucleotide/Oligosaccharide-Binding Fold, характерная для олигонуклеотид-/олигосахаридсвязывающих белков). Для Teb1A и Teb1B было показано специфическое связывание с одноцепочечной теломерной ДНК, аналогично POT1 в человеке [100]. С-концевой OB-fold, Teb1C, не связывает ДНК, а участвует во взаимодействии Teb1 с TEN доменом аналогично OB-fold TPP1 человека. Кроме того, p50 стабилизирует взаимодействие Teb1 с теломеразой и также участвует во взаимодействии комплекса белков p75, p45 и p19 с теломеразой. N-концевой домен TERT

(TEN), который предположительно взаимодействует с TER и одноцепочечной ДНК и стабилизирует РНК-ДНК дуплекс, оказался вовлечён во множество взаимодействий – с p50, Teb1, IFD доменом TERT (IFD – insertion-in-fingers domain) и, вероятно, с TER и дуплексом, образованным между теломерной ДНК и матричным участком TER (Рисунок 2.24).

В построении структурной модели теломеразы *Tetrahymena* были использованы структуры белков p19 и p45C, а также комплекса p19-p45N [101] и структура TRBD в комплексе с TBE элементом [65] (Рисунок 2.24). Матричный участок и псевдоузел располагаются перпендикулярно плоскости TERT ring, матрица с одной стороны активного сайта, около RT, а псевдоузел с другой стороны, возле соединения TRBD и CTE. TEN домен расположен около CTE с одноцепочечным TRE элементом (TRE- Template Recognition Element, элемент, узнающий матрицу) между ними. В STE элементе, спираль IV расположена в соединении TRBD и CTE с другой стороны от псевдоузла, позиционируясь благодаря взаимодействию спирали IV с белком p65 (Рисунок 2.24).

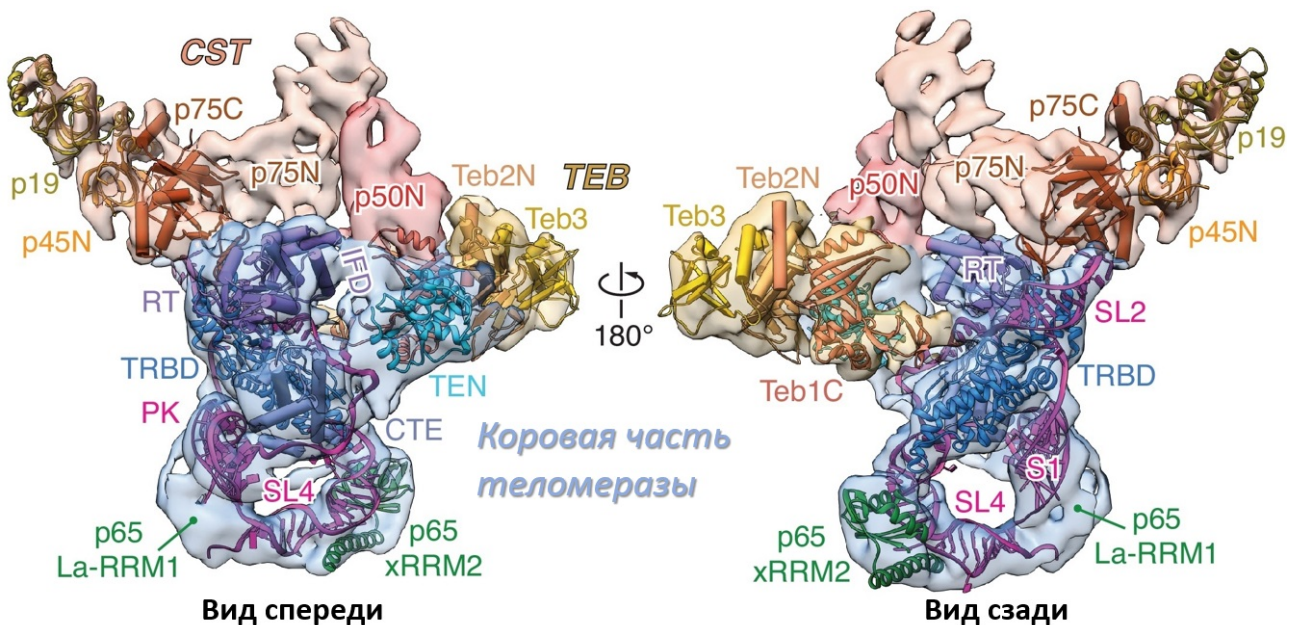


Рисунок 2.24. Структура теломеразы *Tetrahymena Thermophila*, полученная методом криоэлектронной микроскопии с разрешением  $\approx 9 \text{ \AA}$ . Вид спереди (слева) и вид сзади (справа), коровая часть фермента выделена голубым, CST комплекс (включает белки p75-p45-p19) выделен бежевым, TEB

комплекс выделен желтым, белок p50 выделен красным. Псевдоатомные модели структур коровой части, TEB и CST тримеров из трёх OB-fold (Oligonucleotide/Oligosaccharide-Binding (OB) Fold). Теломеразные белки, структура для которых была определена, изображены в виде лент и оснований, а структуры, полученные с помощью гомологического моделирования изображены в виде лент и цилиндров. Одноцепочечные участки TER изображены лентами [97].

Привлечение теломеразы на теломеры регулируется по клеточному циклу и требует регуляции привлечения теломеразы и ДНК полимеразы для синтеза G- и C- цепей соответственно. На теломерах *Tetrahymena* связаны белки Pot1a, ортолог POT1 человека, который связан с белком Tpt1, ортологом TPP1 человека, которые закрывают теломеры и негативно регулируют доступ теломеразы к теломерам. Два дополнительных белка, Pat1 и Pat2, взаимодействуют с Pot1a-Tpt1, они необходимы для удлинения теломер теломеразой, но их функция пока не до конца ясна. Все компоненты теломеразы *Tetrahymena* (TERT, TER и p65 (составляющие коровую часть фермента) и Teb1, p75, p50, p45 и p19 (необходимые для работы фермента на теломерах)) собраны в комплекс как делящихся, так и в неделящихся клетках.

### 2.2.2 Структура дополнительных компонентов теломеразного комплекса человека

Теломеразный комплекс человека состоит из TERT, TER и дополнительных белков: дискерина, NOP10, NHP2 и GAR1 (Рисунок 2.25). Сборка комплекса представляет собой многоступенчатый процесс, требующий дополнительных ко-факторов.

hTERT взаимодействует с двумя элементами TER, TRBD связан с элементом CR4/5, кроме того было показано связывание TERT и псевдоузла. О теломеразном комплексе человека даёт некоторое представление структура, полученная методом электронной микроскопии с разрешением  $\approx 23\text{\AA}$  [5]. В данной работе было сделано предположение, что теломераза человека работает



в виде димера, а димеризация происходит при участии 3' конца TER и, возможно, белков, ассоциированных с H/ACA (дискерин, NOP10, NHP2 и GAR1). Также было сделано предположение, что каталитически неактивный hTERT может ингибировать активность второй молекулы hTERT в димере [5]. Однако, факт функционирования теломеразы в виде димера не до конца подтверждена.

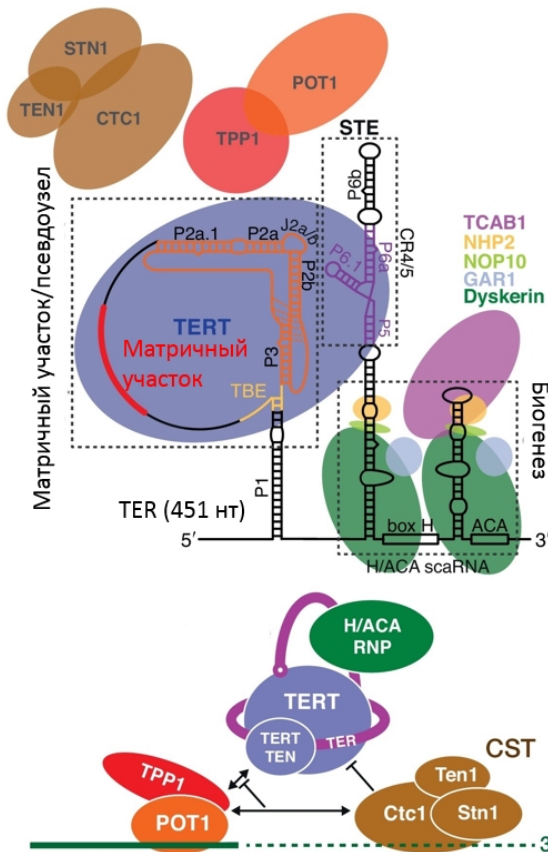


Рисунок 2.25. Схема вторичной структуры hTER и ассоциированных с теломеразой человека белков. Внизу: схема удлинения 3' конца теломерной ДНК теломеразой. Зелёной пунктирной линией показано удлинение теломеры. Стрелками показано взаимодействие, а линиями с поперечной линией указывают ингибирование.

С двуцепочечным участком теломер человека специфически связаны белки TRF1 и TRF2, которые участвуют в подавлении узнавания теломер системами репарации (Рисунок 2.26). С этими белками взаимодействует белок TIN2, который связывает белковые комплексы на двух- и одноцепочечном участках теломеры. Компонент шелтеринового комплекса POT1 специфически связывает 3' конец теломерной ДНК и взаимодействует с белком TPP1, который связан с TIN2. TPP1 необходим для привлечения теломеразы на теломеры [102]. CST комплекс, состоящий из белков Ctc1-Stn1-Ten1 в человеке, Cdc13-Stn1-Ten1 в растениях и дрожжах, аналогичен комплексу репликативного белка А (Replication Protein A (RPA)), в человеке связывает G-цепь теломерной ДНК, транзитно взаимодействует с теломеразой, привлекает ДНК-полимеразу  $\alpha$  для

синтеза С-цепи и предположительно выполняет ещё много функций в регуляции теломеразы и репарации ДНК [103]

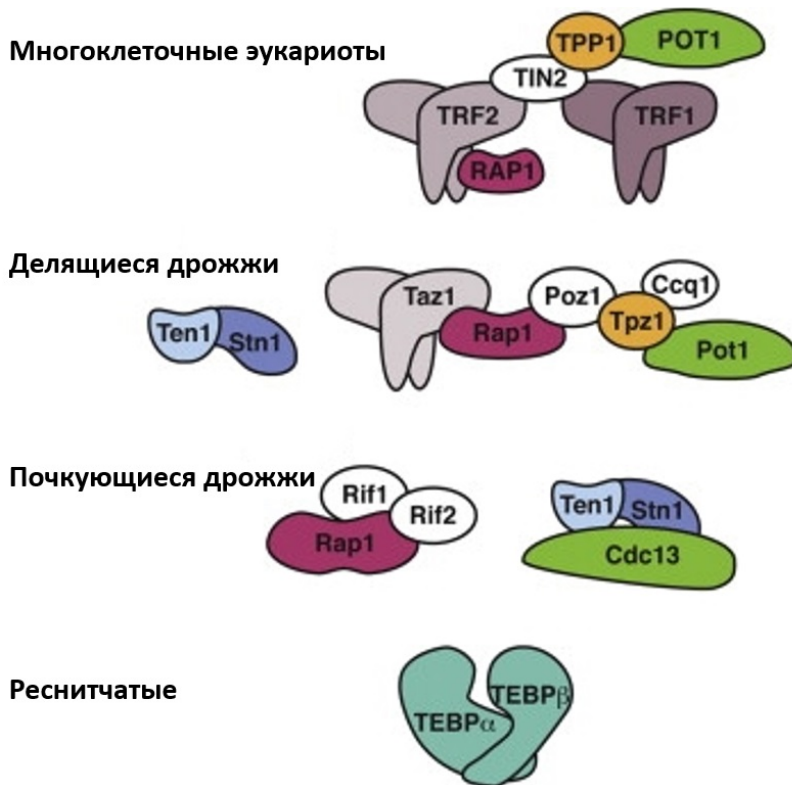


Рисунок 2.26. Схема белкового состава теломерного комплекса многоклеточных эукариот, делящихся и почкующихся дрожжей и реснитчатых. Для белков, отмеченных цветом, существуют структуры высокого разрешения (либо для их близких гомологов).

Многоклеточные: шелтеринный комплекс

состоит из TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, hTPP1 и hPOT1, а также CST комплекс, состоящий из белков Ctc1-Stn1-Ten1; делящиеся дрожжи: Taz1, Rap1, Poz1, Trpz1, Ccq1 и Pot1, также Stn1 и Ten1; почкующиеся дрожжи: комплекс, связывающий двуцепочечный участок теломерной ДНК – Rap1, Rif1, и Rif2; комплекс, связывающий одноцепочечный участок теломерной ДНК – Cdc13, Stn1 и Ten1. Реснитчатые: гетеродимер TEBP $\alpha/\beta$ , связывающий одноцепочечный участок теломерной ДНК [104].

Структура теломерного белка человека TPP1 (аминокислотные остатки 90–250) была получена методом кристаллографии и решена с разрешением 2.7 Å (Рисунок 2.27, А) [46]. Структура hTPP1 (90–250) состоит из укладки OB-fold, представляющей собой  $\beta$ -бочку из пяти  $\beta$ -тяжей. К OB-fold hTPP1 (90-250) наиболее близка по пространственной организации структура OB-fold теломерного белка TEBP $\beta$  реснитчатых *Oxytricha nova* (onTEBP $\beta$ ) [105]. Эти две структуры могут быть наложены с величиной среднеквадратичного



отклонения - RMSD 2.0 Å (Рисунок 2.27, Б). Важно отметить, что структурно консервативная область включает в себя не только центральную  $\beta$ -бочку, но и три  $\alpha$ -спирали, что позволяет предположить, что эти два белка являются гомологами. При этом, OB-fold белка ТЕВР $\alpha$ , значительно сильнее отличается от hTPP1 (Рисунок 2.27, В).

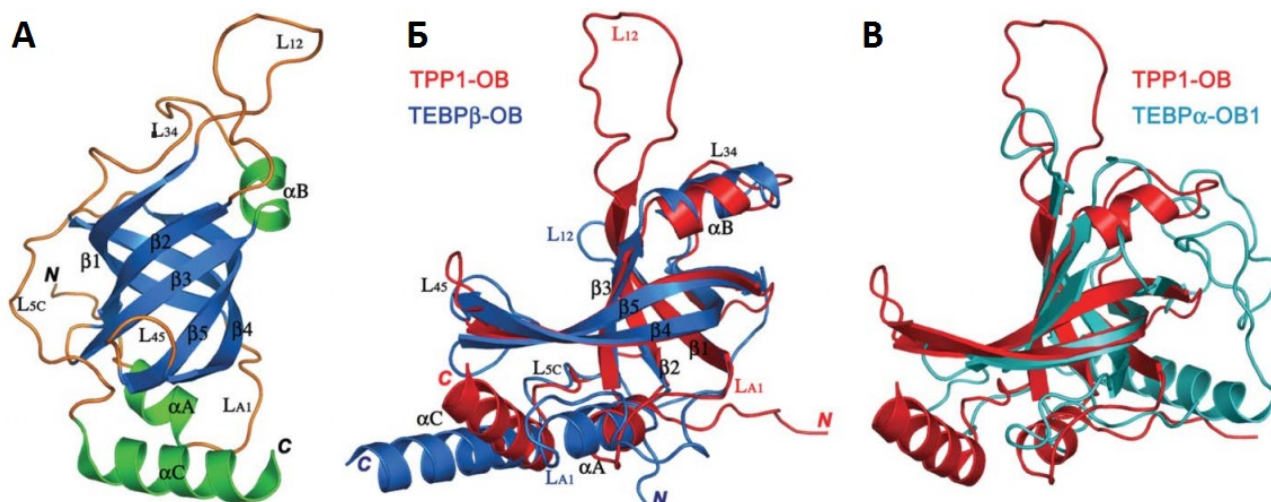


Рисунок 2.27. Структурная гомология между hTPP1 и ТЕВР $\beta$ . А. Кристаллическая структура OB-fold hTPP1 (90-250),  $\beta$ -тяжи окрашены синим,  $\alpha$ -спирали зелёным, петли оранжевым. Б. Наложение кристаллической структуры OB-fold hTPP1 (90-250) на кристаллическую структуру ТЕВР $\beta$  [105]. TPP1 окрашен красным, ТЕВР $\beta$  синим. В. кристаллической структуры OB-fold hTPP1 (90-250) на кристаллическую структуру ТЕВР $\alpha$  [105]. TPP1 окрашен красным, ТЕВР $\alpha$  голубым.

Кроме общего структурного сходства, hTPP1 и ТЕВР $\beta$  обладают некоторыми сходными специфическими особенностями. Во-первых, петля, соединяющая  $\beta$ 5 и  $\alpha$ C (L<sub>5C</sub>), в отличие от OB-fold POT1 и ТЕВР $\alpha$ , имеет вытянутую конформацию и располагается вдоль одной стороны  $\beta$ -бочки, что приводит к тому, что спираль  $\alpha$ C закрывает нижнюю часть  $\beta$ -бочки (Рисунок 2.27, Б). Второй особенностью является позиция спирали  $\alpha$ B, которая повернута почти на 90°, относительно положения в других OB-fold укладках. Таким образом было сделано предположение, что hTPP1 является гомологом ТЕВР $\beta$  реснитчатых *O. nova* [46]. При этом, несмотря на высокий уровень структурной

гомологии, аминокислотная последовательность OB-fold hTRP1 и ТЕВРβ сильно различаются (11% идентичности). Различия в основном проявляются в петлях, например, в TRP1 между β1 и β2 расположена длинная петля L12 (20 аминокислотных остатков), в то время как в ТЕВРβ тяжи β1 и β2 соединены короткой петлёй из двух аминокислотных остатков.

На данный момент существует две кристаллические структуры С-концевого домена POT1 в комплексе с POT1-связывающим мотивом белка TRP1 [106, 107].

Одна из них представляет собой кристаллическую структуру комплекса С-концевого домена белка POT1 (POT1C) человека с пептидом, представляющим собой мотив белка TRP1, связывающим POT1 (POT1 binding motif – PBM, аминокислотные остатки 266-320 в TRP1) (Рисунок 2.28).

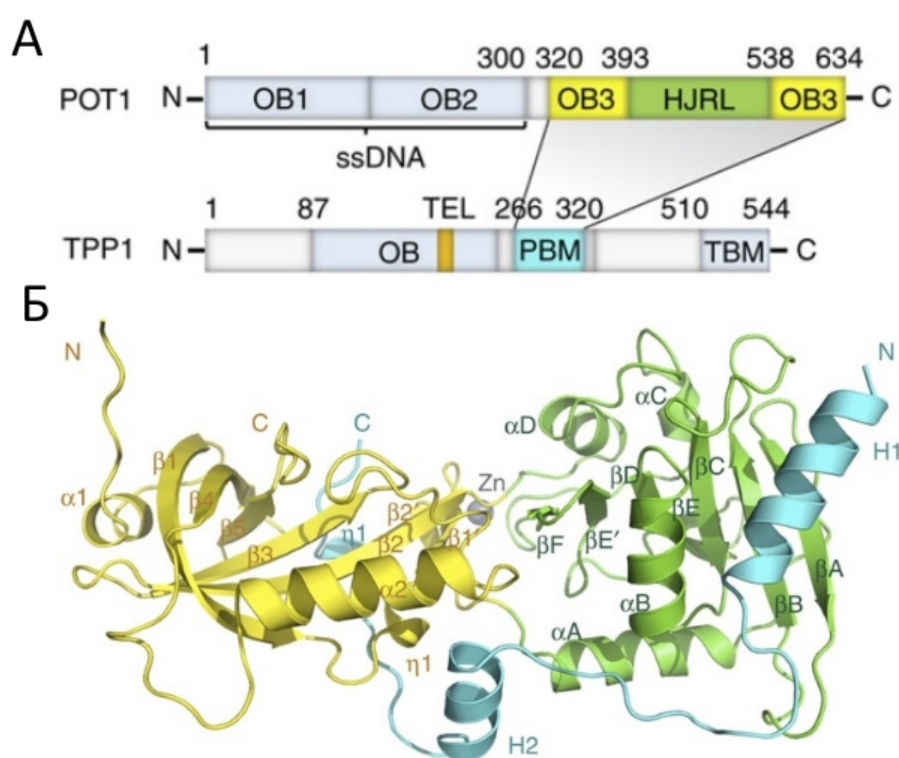


Рисунок 2.28.

Структура комплекса POT1C–TRP1<sub>PBM</sub>. А. Схема доменной организации комплекса POT1–TRP1. OB-fold1 (OB1), OB-fold2 (OB2) POT1, а также OB-fold и TBM (TIN2-связывающий

мотив, TIN2-binding motif) TRP1 окрашены светло-голубым. С-концевой OB-fold3 (OB3) POT1, домен, разрешающий структуру Холидея, Holliday junction resolvase (HJRL) окрашены желтым и зелёным соответственно. PBM (POT1-связывающий мотив, POT1 binding motif) TRP1 окрашен ярко-голубым. TEL-участок TRP1 окрашен оранжевым. Б. Структура комплекса POT1C–TRP1<sub>PBM</sub>. POT1<sub>OB3</sub> окрашен желтым, POT1<sub>HJRL</sub> зелёным, TRP1<sub>PBM</sub> голубым [106].

Для POT1С была показана необычная структура, состоящая из OB-fold, включающая  $Zn^{2+}$  связывающий мотив и домен, похожий на домен, разрешающий структуру Холидея (Holliday junction resolvase (HJR)). POT1-связывающий мотив TPP1 (аминокислотные остатки 255-337), состоящий из четырёх спиралей, связанных линкерами, взаимодействует с обоими доменами POT1 [106]. Кроме того, был показан высокий уровень структурной гомологии между OB-fold3 POT1 и С-концевым OB-fold ТЕВР $\alpha$ , теломерного белка реснитчатых *O.nova*.

Вторая структура - структура С-концевого домена POT1 человека с POT1-связывающим доменом TPP1 (POT1 binding domain – PBD, аминокислотные остатки 255-337 в TPP1) (Рисунок 2.29).

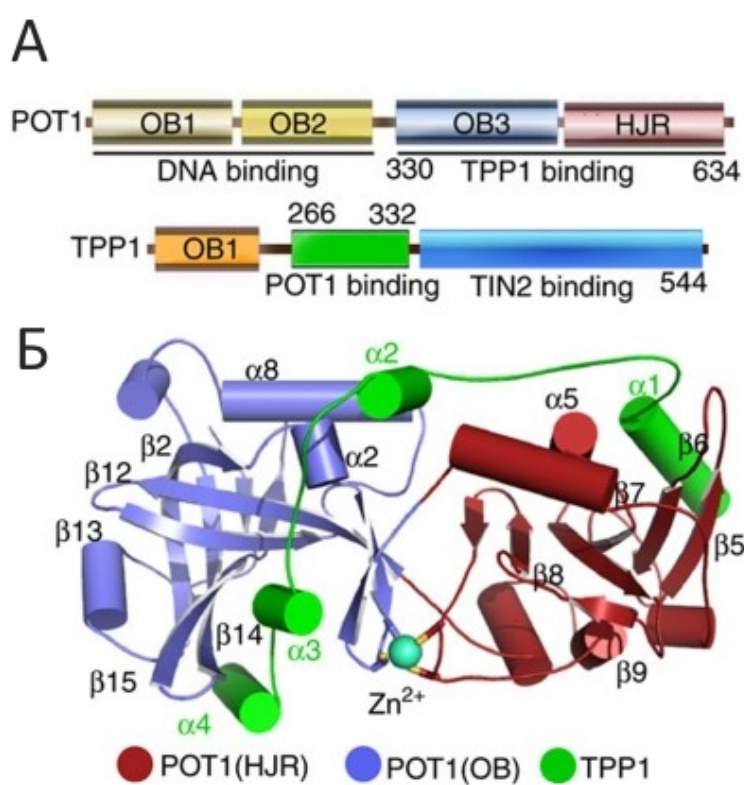


Рисунок 2.29. Структура комплекса POT1С–TPP1<sub>PBM</sub>. А. Схема доменной организации белков POT1 и TPP1. Б. Кристаллическая структура комплекса POT1С—TPP1(PBD); OB-fold и HJR POT1С окрашены синим и красным соответственно; TPP1(PBD) окрашен зелёным. Ион  $Zn^{2+}$ , координированный 4

цистеинами (С382, С385, С503 и С506), изображен как голубая сфера.

Эта работа подтверждает наличие OB-fold и HJR-домена в POT1С и их взаимодействие с PBD TPP1. Однако, более длинный фрагмент PBD содержит дополнительную шпильку, которая отсутствует в первой работе [107]. TPP1-POT1 переключается с ингибирования теломеразы на активацию при

взаимодействии с коровой частью теломеразы. Так называемый TEL-участок в консервативном OB-fold домене TPP1 (и *S.cerevisiae* Est3) напрямую взаимодействует с TEN доменом TERT для привлечения теломеразы на теломеры и стабилизации связывания одноцепочечной ДНК теломеразой. Кристаллическая структура TPP1, содержащей мутацию K170Δ, нарушает структуру TEL-участка, что приводит к укорочению теломер *in vivo* [108].

### 2.2.3 Структура дополнительных компонентов теломеразного комплекса дрожжей

В почкующихся дрожжах *S.cerevisiae* было идентифицировано пять генов: TeLomerase Component 1 TLC1, Ever Shorter Telomere 1-4: EST1, EST2, EST3, EST4(CDC13), нокаут каждого из них приводит к est-фенотипу, который характеризуется постепенным укорочением теломер и сенесценсу (гибели большинства клеток через ~ 50-100 поколений) [22, 109]. Теломеразная обратная транскриптаза Est2 и теломеразная РНК TLC1 являются основными компонентами теломеразы дрожжей. Мутации аминокислотных остатков, участвующих в катализе, приводят к сенесценс-фенотипу *in vivo* и отсутствию активности теломеразы *in vitro*. При этом активность теломеразы детектируется в экстрактах, полученных из мутантных штаммов ΔEST1, ΔEST3 и CDC13-2<sup>est</sup>. Таким образом, хотя эти три гена необходимы для поддержания длины теломер *in vivo*, считается, что они не важны для катализа [12]. EST1 и EST3 кодируют два регуляторных белка, напрямую связанных с Est2 и TLC1, образуя единый теломеразный комплекс.

#### 2.2.3.1 Cdc13

Ген EST4 соответствует гену CDC13, который был открыт ранее в ходе скрининга температурочувствительных мутантов для идентификации генов, регулирующих различные процессы клеточного цикла. Cdc13 связывает одноцепочечный 3'-конец теломерной ДНК и играет важную роль в защите и элонгации теломер. Cdc13 в комплексе с Stn1 и Ten1 образует аналогичный RPA комплекс (CST комплекс) [110]. CST комплекс препятствует узнаванию

теломер системами репарации и защищает С-цепь от деградации нуклеазами. Кроме того, Cdc13 регулирует синтез G- и С-цепей, участвуя в привлечении и теломеразы, и репликативной полимеразы [111].

### 2.2.3.2 Est1

Est1 обладает наибольшей консервативностью среди всех теломеразных белков. В почкующихся и делящихся дрожжах Est1 необходим для поддержания длины теломер теломеразой, причем участвует как в привлечении теломеразы на теломеры, так и в активации теломеразы. Est1 образует контакт с теломеразной РНК TLC1 вблизи матричного участка, что указывает на его вовлеченность в образование активного сайта фермента. Коровая часть теломеразы – Est2–TLC1 – ассоциирована с Est1 практически во всём клеточном цикле [112]. Кроме того, Est1 взаимодействует с белком Cdc13 комплекса CST (Cdc13p/Stn1p/Ten1p), таким образом осуществляя посадку теломеразы на теломеры в поздней S/G2 фазе клеточного цикла и обеспечивая активность теломеразы *in vivo* [113, 114, 115]. Теломеры сохраняются в клетках, экспрессирующих в отсутствие Est1 ДНК-связывающий домен Cdc13, слитый с Est2 (<sup>DBD</sup>Cdc13-Est2). Однако роль Est1 как посредника между теломеразой и Cdc13 – вероятно не единственная его роль. Одновременная экспрессия <sup>DBD</sup>Cdc13-Est2 и Est1 приводит к удлинению теломер, и это дает основание полагать, что Est1 может активировать комплекс Est2-TLC1, связанный с теломерами [116]. Est1 связывает одноцепочечную теломерную ДНК-последовательность и формирует из нее квадруплекс *in vitro*, и это свойство предполагается важным *in vivo* [117]. В почкующихся дрожжах Est1 и TERT напрямую взаимодействуют с другим теломеразным белком – Est3, причём именно связывание Est3 с Est1 необходимо для привлечения теломеразы на теломеры *in vivo* [118, 119, 120].

### 2.2.3.3 Est3

На дрожжах *S. cerevisiae* было показано, что активация теломеразы происходит при присоединении белка Est3 к уже собранному комплексу Est1–



TER–Est2 в S/G2 фазе [116, 118, 120, 121]. Est3 напрямую взаимодействует с Est1 и Est2 [51, 119, 120] и стимулирует каталитическую активность Est2 [120]. Сложный характер сборки и разборки теломеразного комплекса в дрожжах показывает важность белка Est3 как регуляторного фактора.

Единственная на данный момент структура была получена для укороченного с N-конца на 12 аминокислотных остатков Est3 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (scEst3<sup>ΔN</sup>) с заменой цистеина 142 на серин для уменьшения агрегации (Cys142Ser) (Рисунок 2.30).

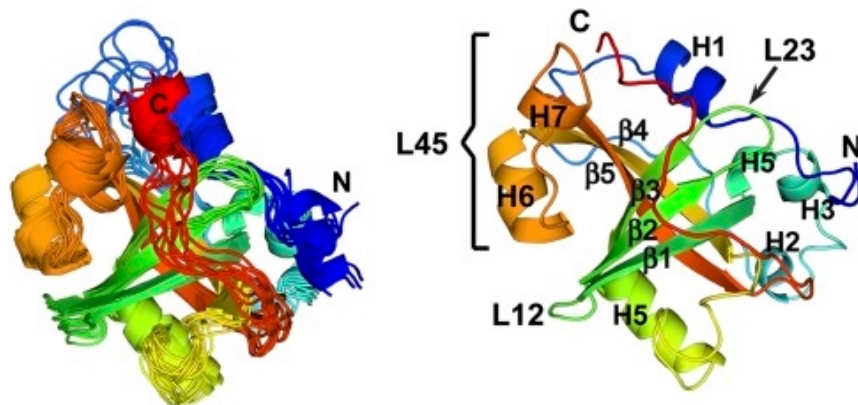


Рисунок 2.30.

Слева: семейство 10 структур scEst3<sup>ΔN</sup>.

Справа: структура scEst3<sup>ΔN</sup> с минимальной энергией, представленная в виде

ленты. Последовательность белка окрашена по радуге от С-конца (красный) к N-концу (синий). PDB Code ID 2M9V.

Структура была получена с использованием стратегии, комбинирующей экспериментальные данные ЯМР с предсказанием структур *de novo* алгоритмом Rosetta [122].

Структура scEst3<sup>ΔN</sup> представляет собой β-бочку из пяти β-слоёв (два антипараллельных трехслойных β-листа β1-β4-β5 и β1-β2-β3), которая кэпирована двумя спиралями (H1 и H5). L12 – короткая петля, а L45 – длинный элемент, содержащий спираль (Рисунок 2.30). OB-fold scEst3<sup>ΔN</sup> обладает высокой структурной гомологией с OB-fold теломерного белка TPP1 млекопитающих и ТЕВРβ реснитчатых *Oxytricha nova* [48, 123, 124]. Структуры scEst3<sup>ΔN</sup> и TPP1 человека (hTPP1) накладываются с величиной среднеквадратичного отклонения - RMSD 0.83 Å для всех атомов основной цепи OB-fold домена [48, 122, 125]. Можно выделить следующие общие

структурные элементы данных белков: N- и C-концевые области сближены в пространстве и антипараллельны, C-конец пересекает  $\beta$ -лист  $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\beta 3$ , H1 и L23 сближены. Спираль H5 в scEst3<sup>ΔN</sup>, hTRP1 и onTEBP $\beta$  располагается под углом  $\sim 40^\circ$  к вертикальной оси  $\beta$ -бочки. Кроме того, взаимодействие между консервативными аминокислотными остатками Trp21 (в спирали H1) и Asp86 (в петле L23) в scEst3<sup>ΔN</sup> аналогично парам Trp98 и Asp148 в hTRP1 и Phe14 и Asp54 в onTEBP $\beta$ .

Мутагенезом scEst3 было идентифицировано две функционально важные поверхности белка [122, 123]. Одна из этих поверхностей отвечает за взаимодействие Est3 с каталитической субъединицей теломеразы; в клетках с теломеразой, содержащей scEst3 с мутациями в этой области наблюдалось укорочение теломер. Эта поверхность совпадает с так называемой TEL областью в hTRP1, вовлеченной во взаимодействие с N-концевым доменом TERT [125, 126]. Мутации, возникающие в TEL области hTRP1, связаны с возникновением синдрома Hoeyraal-Hreidarsson, клинический фенотип с чрезвычайно короткими теломерами у людей [127]. Прямое взаимодействие дрожжевого Est3 с TEN доменом каталитической субъединицы теломеразы (Est2) было показано на двух видах, *Candida parapsilosis* и *Lodderomyces elongisporus* [51]. В состав TEL участка scEst3 входят аминокислотные остатки V75, Y78, T112, E114, N117, D166 и V168, расположенные в основании  $\beta$ -бочки. Анализ сборки теломеразного комплекса в дрожжах *S. cerevisiae* [121] показал, что в белке scEst3 кроме аминокислотных остатков, участвующих во взаимодействии с Est2, есть остаток серин 113 (S113), ингибирующий это взаимодействие. Таким образом, TEL область в scEst3 служит своеобразным тумблером, который регулирует сборку/диссоциацию теломеразного комплекса по клеточному циклу.

Рядом с TEL областью в scEst3 расположена вторая функционально важная поверхность, необходимая для удлинения теломер *in vivo* [122]. В состав этой области входят аминокислотные остатки K71 и L171. Мутации в этой области приводят к укорочению теломер *in vivo*, однако не влияют на

связывание scEst3 с теломеразой. Эта область обладает отдельной, ещё не до конца известной, функцией. Мутационный анализ показал, что для Est3 в *Candida albicans* (caEst3), аминокислотные остатки в области, важной для ассоциации caEst3 с теломеразой также необходимы для активности теломеразы *in vitro* и *in vivo*; однако, были также обнаружены аминокислотные остатки, влияющие на активность теломеразы *in vivo*, но не влияющие на взаимодействие caEst3 с теломеразой [124].



### 2.3 Заключение обзора литературы

В данном обзоре мы рассмотрели структурные особенности компонентов теломеразного комплекса в разных организмах. Основными компонентами являются каталитическая субъединица, теломеразная обратная транскриптаза TERT и теломеразная РНК TER. TERT обладают достаточно высокой консервативностью от реснитчатых, грибов и дрожжей до позвоночных, в том числе человека. Этот белок состоит из нескольких консервативных доменов, каждый из которых обладает своей функцией.

N-концевой домен, TEN, необходим для работы теломеразы, связывает TER и теломерную ДНК с низкой аффинностью. Хотя решена его структура для реснитчатых, однако точная функция этого домена не до конца ясна. Кроме того, остаётся открытым вопрос, является ли полученная структура универсальной для всех организмов. Сильные различия в эффектах от удаления и введения точечных мутаций в консервативных участках TEN-домена в реснитчатых и человеке позволяют сделать предположение, что моделирование структуры hTEN по структуре ttTEN не совсем корректно и необходимо получение структурных данных об этом домене из других организмов.

РНК-связывающий домен, TRBD, специфически связывает теломеразную РНК, TBE (5' граничный элемент) и STE (элемент на терминальной ветви). TRBD, образуя контакты с C-концевым доменом TERT, приводит к формированию кольцевой структуры TERT ring. Наиболее хорошо изученный домен TERT, для него решены структуры как реснитчатых, так и позвоночных, в том числе в комплексе с РНК.

Обратнотранскриптазный домен, RT-домен (включающий субдомены пальцы и ладонь), обладает наибольшей консервативностью. Участвует в связывании матричного участка TER, теломерного ДНК субстрата и нуклеотидов, осуществляет катализ. Структурные данные об этом домене есть только из структуры TERT ring жука *T.castaneum*. Однако, структуры RT-доменов других обратных транскриптаз обладают высокой степенью структурной гомологии с tcRT-доменом.

C-концевой домен, STE, выполняет функцию субдомена большой палец, участвует в связывании ДНК-РНК гибрида и стабилизируют теломеразный комплекс. Имеет довольно низкую консервативность среди различных организмов, структурные данные о нём также ограничиваются STE *T.castaneum*.

*in vivo* для активности теломеразы необходимы дополнительные белковые компоненты. В реснитчатых теломеразный комплекс является наиболее хорошо изученным. Теломераза *T.termophila* состоит из комплекса TERT, TER и p65; ТЕВ комплекса, в состав которого входят белки Teb1, Teb2 и Teb3; и комплекса, состоящего из p75, p45, p19. Все три комплекса связаны с белком p50. Структурные данные для многих компонентов получены, в том числе методами ЯМР и кристаллографии, затем эти структуры были вписаны в карту всего теломеразного комплекса, полученную криоэлектронной микроскопией.

Состав теломеразного комплекса сильно отличается для реснитчатых, дрожжей и человека (обзор литературы, 2.2), при этом соответствие белковых компонентов комплекса не до конца известно и должно быть установлено.

На данный момент структура высокого разрешения теломеразы человека отсутствует, а для других организмов данные ограничены весьма небольшим набором структур. В наиболее полной структуре каталитической субъединицы – TERT *T.castaneum* – отсутствует характерный для теломеразных обратных транскриптаз N-концевой домен, который является независимым и обладает отдельными функциями в работе фермента. Кроме того, для этого организма не идентифицирована теломеразная РНК. Таким образом, отсутствует полное доказательство того, что имеющаяся структура представляет собой именно компонент теломеразы. В связи с этим использование новых модельных организмов является актуальной и важной задачей для структурного изучения теломеразы.

### 3. Результаты и их обсуждение

#### 3.1 Постановка задачи

Несмотря на то, что исторически онкологические заболевания и старение изучались независимо, появляется всё больше данных, указывающих на связь рака со старением, в связи с тем, что рак и старение объединяет нарушение во многих общих молекулярных путях. В частности, активация теломеразы может быть потенциальной терапией болезней, связанных со старением, при этом повышение экспрессии теломеразы, а также появление некоторых мутаций в ней, приводит к появлению раковых опухолей [128]. Таким образом понимание регуляции теломеразы является чрезвычайно важной и актуальной задачей. Структурные исследования теломеразы различных модельных организмов позволяют расширить знания о пространственной организации и функционировании фермента, а также выявить консервативные, то есть наиболее значимые аспекты механизма его работы. Однако, изучение теломеразы сильно ограничено ввиду её низкого содержания в клетках, сложного механизма сборки и очень низкой стабильности её компонентов. На данный момент опубликовано только несколько структур доменов TERT из различных организмов. В кристаллической структуре TERT *Tribolium castaneum* отсутствует TEN домен, характерный для всех остальных теломеразных обратных транскриптаз. TcTERT состоит только из кольцевой структуры, названной «TERT ring» [6, 38]. Другие опубликованные структуры: TEN домен *Tetrahymena thermophila* [7], TRBD домен *T. thermophila*, *Oryzias latipes* и *Takifugu rubripes* [64, 61, 59] и С-концевой домен TERT человека [79]. Недостаток структурных данных об организации каталитического кора теломеразы препятствуют пониманию механизмов работы теломеразы [129].

В нашей лаборатории для изучения теломер и теломеразы была разработана система, созданная на основе почкующихся дрожжей *Ogataea polymorpha* (*Hansenula polymorpha*).

*Hansenula polymorpha* – это метилотрофные почкующиеся дрожжи, широко используемые в исследованиях метаболизма метанола, функций и

биогеनेза пероксисом, а также для суперэкспрессии рекомбинантных белков [130]. Теломеры *H. polymorpha* гомогенны и состоят из 18-23 повторов 5' – GGG TGG CG – 3' [131]. На данный момент опубликован как ядерный, так и митохондриальный геном разных штаммов дрожжей *H. polymorpha* [130, 132, 133]. *H. polymorpha* эволюционно удалены от дрожжей, используемых для изучения теломеразы (Рисунок 3.1).

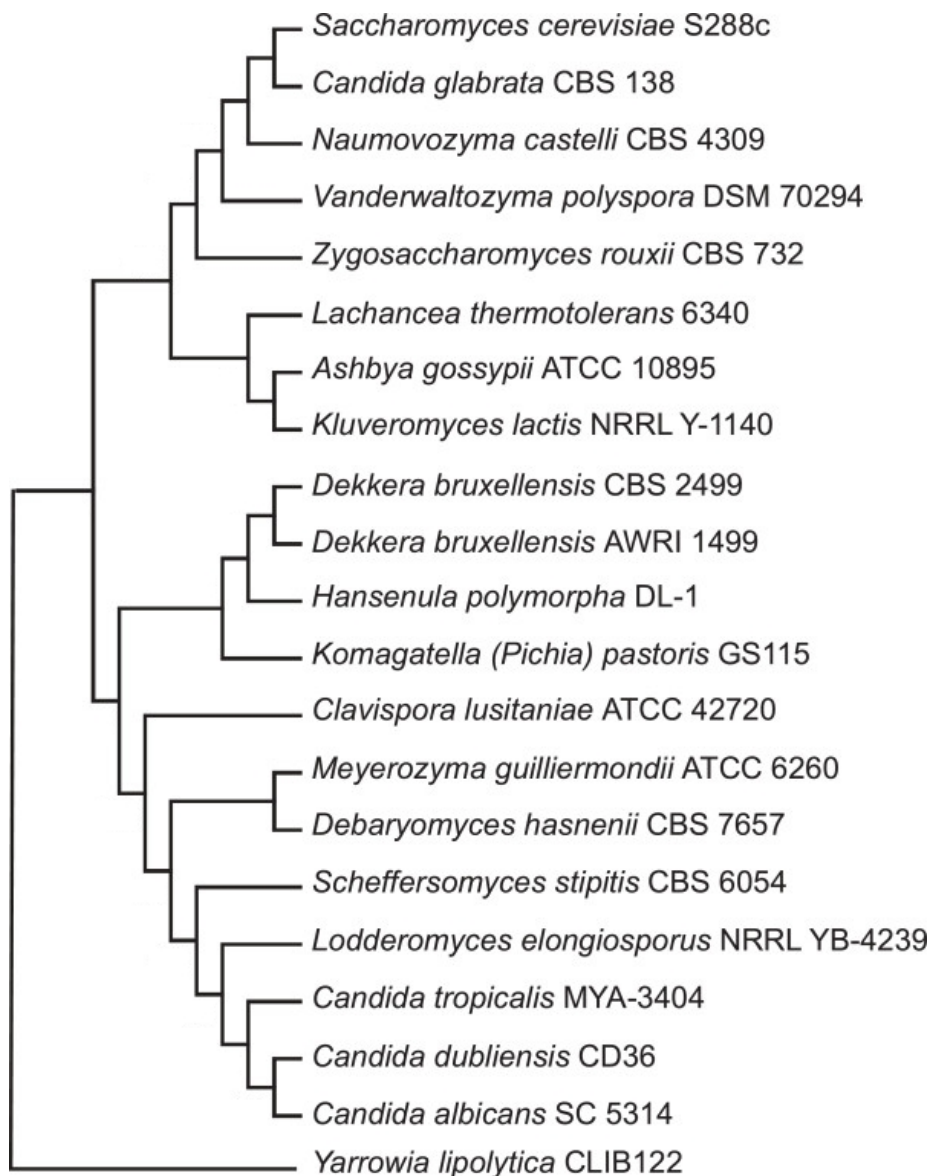


Рисунок 3.1. Схема эволюционного положения *H. polymorpha* относительно сахаромецетов. Дерево основано на анализе выравнивания 153 универсально распределенных ортологов, ранее идентифицированных в 42 секвенированных геномах [130].

Помимо преимуществ работы с простейшими эукариотами, таких как простота культивирования и генно-инженерных манипуляций, важным свойством этих дрожжей является их термотолерантность. Известно, что белки и их комплексы из термостабильных организмов обычно более стабильны, что облегчает их получение и работу с ними *in vitro*. Некоторые штаммы почкующихся дрожжей

*H.polymorpha* способны выживать при температурах до 50°C и даже выше. Всё это делает дрожжи *H.polymorpha* прекрасным модельным организмом для изучения структурных особенностей компонентов теломеразного комплекса. В нашей лаборатории были идентифицированы основные компоненты теломеразного комплекса дрожжей *H.polymorpha*: теломеразная РНК (hpTER) и каталитическая субъединица hpTERT [86, 134, 135, 136]. Как и TERT других организмов, TERT дрожжей *H.polymorpha* также обладает доменной структурой. Однако, низкая стабильность полноразмерной каталитической субъединицы, её склонность к агрегации в растворе и низкий уровень экспрессии в клетках затрудняют изучение структуры hpTERT. В связи с этим было принято решение использовать альтернативный подход к определению её структуры, а именно определить границы доменов hpTERT, экспрессировать и очистить полученные домены для дальнейших структурных исследований.

Кроме того, в нашей лаборатории были получены некоторые данные о дополнительных компонентах теломеразы, белке hpEst3 [137], сведения о структуре Est3 ограничены лишь одной моделью, полученной для белка дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (обзор литературы, раздел 2.2.2.3). Для scEst3 была показана структурная гомология с белками теломер TPP1 человека и ТЕВРβ реснитчатых *Oxytricha nova*. Таким образом, структура белка Est3 из другого модельного организма поможет выявить консервативные именно для дрожжей структурные элементы и элементы, консервативные для всех видов, включая человека, и позволит понять эволюцию этих белков.

Таким образом, целью данной работы было получение структурных данных о компонентах теломеразного комплекса дрожжей *H.polymorpha*.

## 3.2 Идентификация генов дополнительных белковых компонентов теломеразы дрожжей *H. polymorpha*

### 3.2.1 Биоинформатическая идентификация гена белка *hpEst1*

Для идентификации гена белка Est1 теломеразного комплекса дрожжей *H. polymorpha* (*hpEst1*) был проведен сравнительный анализ генома данного организма с известными гомологами Est1. При помощи программы BLAST, ген белка Est1 *S.cerevisiae* сравнили с геномом *H. polymorpha* (база данных Pubmed, Genbank AEOI01000001.1 - AEOI01000013.1). Длина открытой рамки считывания полученного белка-кандидата составляет 764 аминокислотных остатка, предсказанная масса - 88,2 кДа. Полученный белок-кандидат обладает доменным составом, характерным для Est1 белков. Он содержит Est1 домен, ДНК/РНК связывающий домен (DNA Binding Domain – DBD), а также тетратрикопептидные повторы (TetraTricopeptide Repeat – TPR) (Рисунок 3.2).

TPR – это белковый структурный мотив, он состоит из вырожденного фрагмента последовательности из 34 аминокислотных остатков, идентифицированного в широком спектре белков и, как правило, отвечает за белок-белковые взаимодействия (аминокислотные остатки 190–254 в *scEst1p*). TPR встречаются в тандеме из 3-16 мотивов, состоят из двух антипараллельных  $\alpha$ -спиралей, которые вместе с остальными повторами TPR создают право-спиральную структуру с амфипатическим каналом, который может вмещать комплементарную область белка-мишени [138]. TPR мотив *scEst1* необходим для работы теломеразы, однако его функция отдельна от функции Est1 по привлечению теломеразы на теломеры. Аминокислотные остатки, входящие в TPR или находящиеся рядом, также регулируют гомеостаз длины теломер [139]. Наличие DBD домена в белке Est1 *H. polymorpha* хорошо согласуется со способностью *scEst1* специфично связывать одноцепочечную G-богатую цепь теломерной ДНК *in vitro* [140].





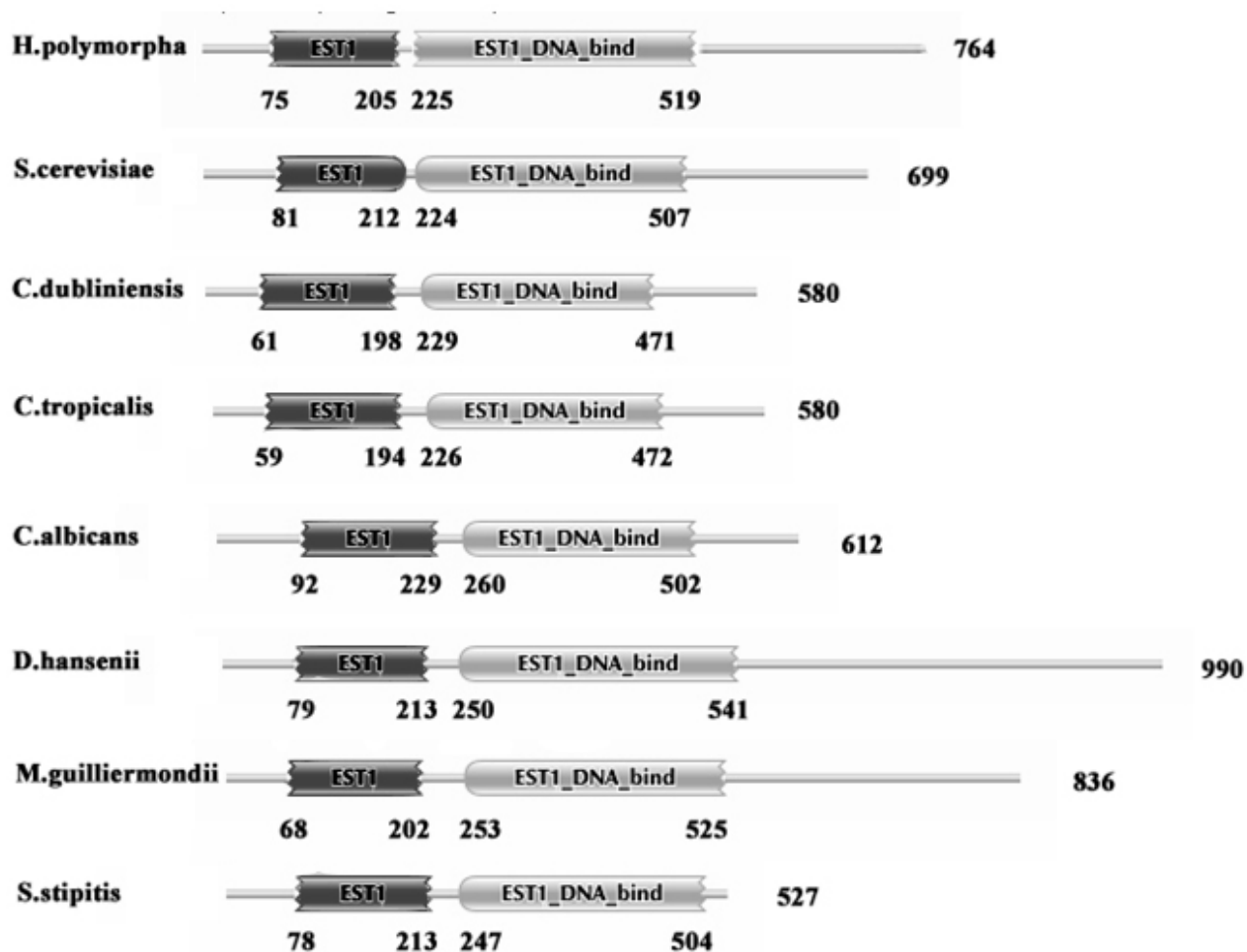


Рисунок 3.3. Схема доменного состава белков Est1 из различных организмов, полученная с помощью сервиса pfam.org [141]. Представлен доменный состав белков Est1 дрожжей *H. polymorpha*, *S. cerevisiae*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. albicans*, *D. hansenii*, *M. guilliermondii*, *S. stipitis*. Цифрами обозначена общая длина белка (справа) и координаты расположения доменов в аминокислотных остатках [142].

При этом наибольшие отличия в последовательности белков Est1 сосредоточены в DBD домене, что можно объяснить различиями в последовательностях ДНК-повторов теломер. Можно отметить большее содержание положительно заряженных аминокислотных остатков для hpEst1 по сравнению с Est1 из других дрожжей (Рисунок 3.2). Такое обогащение согласуется с тем, что дрожжи *H. polymorpha* являются термотолерантными. Таким образом, большой положительный заряд обеспечивает более прочное взаимодействие белка Est1 с теломерной ДНК. TPR домен hpEst1 наиболее



короткий по сравнению с TPR доменами Est1 из других дрожжей. Это предполагает более компактную структуру белка и, возможно, большую стабильность.

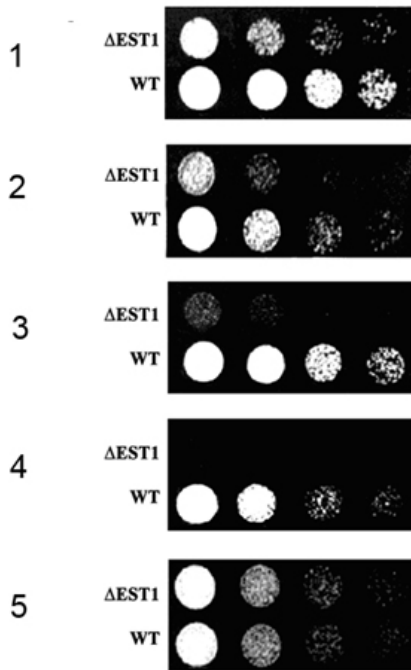
### *3.2.2 Экспериментальное подтверждение взаимосвязи гена-кандидата белка hpEst1 и системы поддержания длины теломер.*

Для подтверждения того, что идентифицированный биоинформатически ген действительно является геном белка теломеразного комплекса Est1, необходимо показать, во-первых, наличие сенесценс фенотипа в дрожжах с удалённым геном Est1. Во-вторых, укорочение теломер в ряду поколений в дрожжах с удалённым геном Est1. Для этого нами был создан штамм дрожжей *H.polyomorpha* с нокаутом гена-кандидата, в котором проверяли длину теломер методом анализа длины рестрикционных фрагментов теломер с помощью Саузерн-блот анализа и наличие сенесценс фенотипа методом разведения на чашках Петри.

Мы характеризовали жизнеспособность полученного штамма методом высевания аликвот клеточной культуры с последующими разбавлениями на твердую среду на каждой стадии пересева клеток (Рисунок 3.4). Отсутствие активности теломеразы, связанное с отсутствием необходимого белкового компонента Est1, должно приводить к укорочению теломер с каждым делением клетки, поэтому такая клеточная культура будет производить меньше колоний по сравнению с клетками дикого типа с гибелью большинства клеток через ~50-100 поколений (сенесценс-фенотип). Мы наблюдали сниженную жизнеспособность клеток в трансформированном штамме уже на первой стадии эксперимента (Рисунок 3.4 А, 1-й пересев). К четвертому пересеву клетки штамма с удаленным геном-кандидатом теряли способность образовывать колонии. В соответствии с литературными данными, восстановление жизнеспособности клеточной культуры по истечении времени (в нашем случае, на 5-м пересеве) связано с иницированием альтернативных механизмов удлинения теломер, скорее всего, рекомбинации.

А

№ пересева



Б

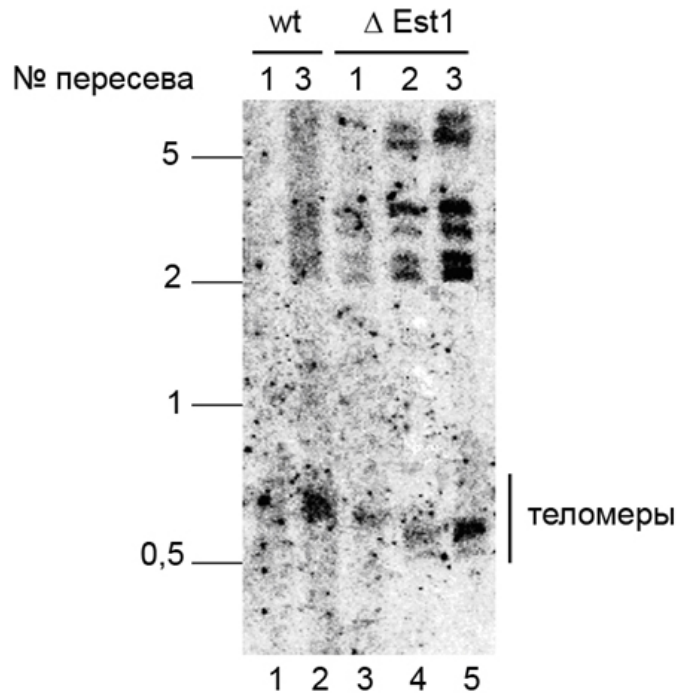


Рисунок 3.4 Подтверждение взаимосвязи идентифицированного гена-кандидата Est1 *H. polymorpha* с биогенезом теломер. Удаление идентифицированного гена приводит к сенесценс-фенотипу и укорочению теломер в дрожжах. А – нокаут гена приводит к потере жизнеспособности штамма дрожжей при делении клеток.  $\Delta EST1$  - нокаут гена белка hpEst1, WT – штамм дикого типа. Четыре точки в одном пересеве соответствуют последовательным разведениям одной культуры. Б – анализ длины рестрикционных фрагментов теломер в штамме с удалённым геном-кандидатом Est1 и в штамме дикого типа методом Саузерн блот анализа.

Длина теломер в полученном штамме-нокауте по гену Est1 и штамме дикого типа была проверена методом анализа рестрикционных фрагментов концов хромосом с помощью Саузерн-блот анализа (Рисунок 3.4). Для детекции теломер мы использовали радиоактивно меченный олигонуклеотид, комплементарный к теломерной последовательности дрожжей *H. polymorpha*. В дорожке 4 и 5 рисунка 3Б можно наблюдать смещение сигнала в область,

соответствующую более коротким продуктам, что указывает на укорочение теломер при делении клеток в нокаутном штамме.

Анализ аминокислотной последовательности белка hpEst1 в дрожжах *H. polymorpha* позволяет заключить, что белок содержит все характерные для белка Est1 домены, Est1-домен, TPR и DBD. Данные по жизнеспособности клеток и анализ длины теломер позволяют утверждать, что полученный нокаутный штамм характеризуется фенотипом укорачивающихся теломер, а наличие гомологии белка-кандидата с Est1 семейством не оставляет сомнения в идентификации Est1 белка в термотолерантных дрожжах *H. polymorpha*. [142].

### 3.2.3 Биоинформатическая идентификация гена белка hpEst3

Впервые биоинформатический анализ был проведён в нашей лаборатории ранее [137]. При помощи программы BLAST ген белка Est3 *S. cerevisiae* сравнили с геномом *H. polymorpha*. Затем нами был проведён дополнительный расширенный анализ последовательностей генов белков Est3. Длина открытой рамки считывания белка-кандидата Est3 *H. polymorpha* составляет 175 аминокислотных остатков, предсказанная масса - 20,27 кДа. Сравнение аминокислотного состава белка-кандидата Est3 из дрожжей *H. polymorpha* с известными белками Est3 других организмов показало высокую степень гомологии (процент идентичных аминокислотных остатков составил от 22 до 33%, значение E-value составило от  $e^{-5}$  до  $e^{-10}$ ) (Рисунок 3.5).



Рисунок 3.5 Выравнивание аминокислотных последовательностей гена кандидата Est3 *H. polymorpha* и белков Est3 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida dubliniensis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *Kluyveromyces lactis*, *Scheffersomyces stipitis*, *Debaryomyces hansenii*. Выравнивание выполнено с помощью сервиса T-Coffee [143]. Степень консервативности окрашена от синего (низкая) к красному (высокая).

Полученный белок-кандидат обладает характерным для всех Est3 белков доменом, названным TPP1 домен (Рисунок 3.6). Белок TPP1 – компонент шелтеринового комплекса, расположенного на теломерах человека, состоящий из белков: Telomere Repeat binding Factor 1 (TRF1), Telomere Repeat binding

Factor 2 (TRF2), Repressor/Activator Protein 1 (RAP1), TRF1-interacting nuclear protein 2 (TIN2), TIN2-interacting protein 1 (TPP1) и Protection Of Telomeres 1 (POT1) TPP1 участвует в репликации теломер [102] (обзор литературы, раздел 2.2.3).

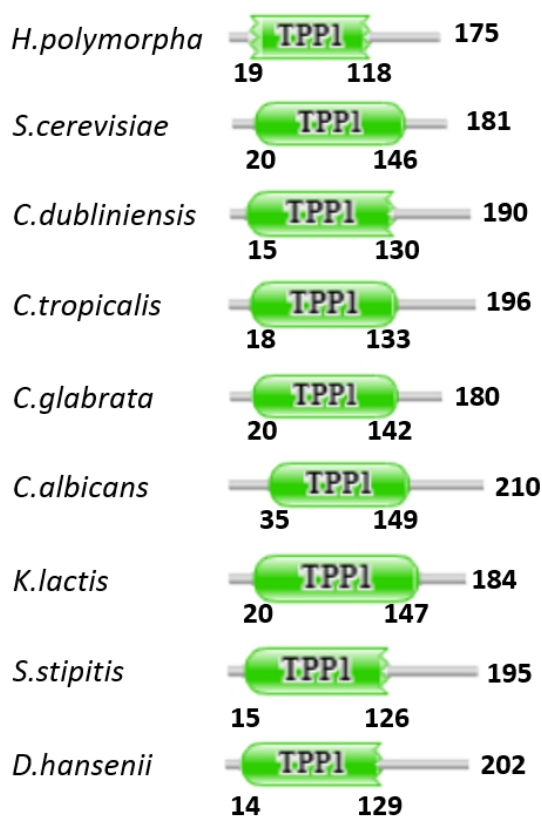


Рисунок 3.6. Схема доменного состава белков Est3 из различных организмов, полученная с помощью сервиса pfam.org [141]. Представлен доменный состав белков Est3 дрожжей *H. polymorpha*, *S. cerevisiae*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. albicans*, *K. lactis*, *S. stipitis*, *D. hansenii*. Цифрами обозначена общая длина белка и координаты расположения домена в аминокислотных остатках.

### 3.2.4 Экспериментальное подтверждение взаимосвязи гена-кандидата белка *hpEst3* и системы поддержания длины теломер

Аналогично белку Est1, было необходимо подтвердить, что идентифицированный нами ген действительно является геном белка теломеразного комплекса Est3. Для этого были созданы штаммы дрожжей *H. polymorpha* с нокаутом гена-кандидата Est3, в которых проверяли длину теломер методом анализа рестрикционных фрагментов концов хромосом с помощью Саузерн-блот анализа, а также наличие сенесценс фенотипа методом разведения на чашках Петри (Рисунок 3.7).



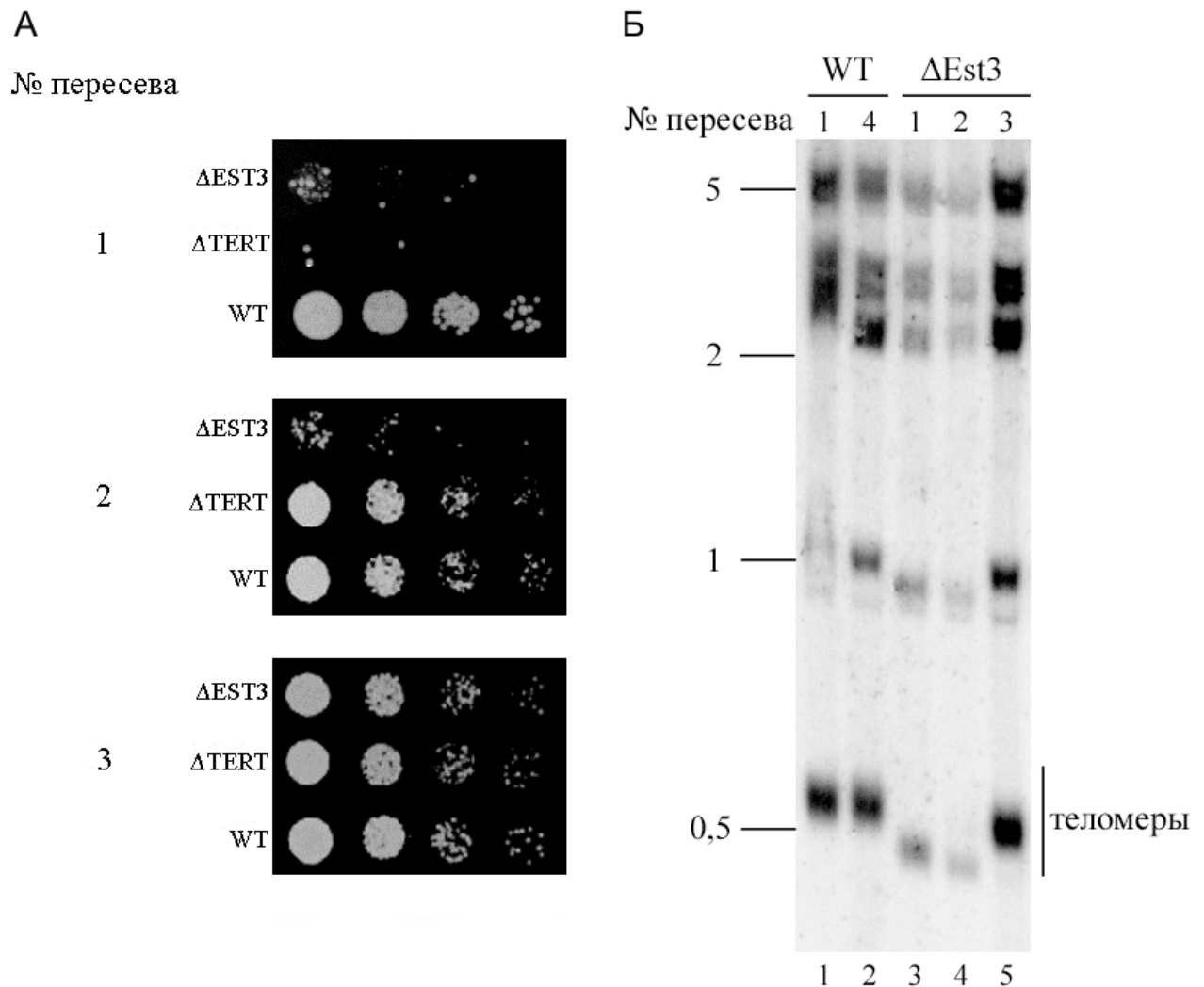


Рисунок 3.7. Подтверждение взаимосвязи идентифицированного гена-кандидата *Est3 H.polymorpha* с биогенезом теломер. Нокаут гена *Est3* приводит к сенесценс-фенотипу и укорочению теломер в дрожжах. А – нокаут гена приводит к потере жизнеспособности штамма дрожжей при делении клеток.  $\Delta$ EST3 - нокаут гена белка *hpEst3*, WT – штамм дикого типа,  $\Delta$ TERT – штамм с удалённым геном каталитической субъединицы теломеразы. Четыре точки в одном пересеве соответствуют последовательным разведениям одной культуры. Б – анализ длины теломер в штамме с удалённым геном-кандидатом *Est3* и в штамме дикого типа методом анализа рестриционных фрагментов концов хромосом с помощью Саузерн блот анализа.

Мы наблюдали сниженную жизнеспособность клеток в трансформированном штамме уже на первой стадии эксперимента (Рисунок 3.7, А, «1-й пересев»). В соответствии с литературными данными, восстановление жизнеспособности клеточной культуры по истечении времени (в нашем случае, на 3-м пересеве) связано с иницированием альтернативных механизмов удлинения теломер, скорее всего, рекомбинации.

### **3.3 Разработка метода выделения белков hpEst1 и hpEst3, пригодных для структурных и функциональных исследований**

Гены белков hpEst1 и hpEst3 были клонированы под индуцируемый T7 промотор в экспрессионный вектор pET30aTEV (получены конструкции pET30aTEV\_hpEst1 и pET30aTEV\_hpEst3) для последующего выделения рекомбинантных белков Est1 и Est3 из *E.coli*. Этот вектор содержит последовательность, кодирующую 6 гистидинов (6His) и S- таг с N- конца белка, а также сайт узнавания TEV-протеазы для возможности удаления аффинного тага. S-таг представляет собой пептидную последовательность из 15 аминокислотных остатков размером 4 кДа, входящую в состав РНКазыА которая может использоваться для стабилизации белков в растворе. Считается, что этот пептид с его обилием заряженных и полярных остатков может улучшить растворимость слитых с ним белков. Экспрессия белков индуцировалась ИПТГ, очистка проводилась с помощью металл-хелатной хроматографии на Ni-NTA сефарозе в нативных условиях. Результаты выделения белков представлены на рисунке 3.7. hpEst1 не детектируется во фракции элюция в денатурирующем ПААГ (Рисунок 3.8, А.), детекция возможна только методом вестерн-блот анализа с антителами на 6 гистидинов (Рисунок 3.8, Б.). Такого количества белка явно недостаточно для структурных и функциональных исследований. Неудача экспрессии hpEst1 в *E.coli* может быть обусловлена тем, что этот белок обладает достаточно большой молекулярной массой, возможно, не структурирован, так как в клетках дрожжей могут быть недостающие в *E.coli* условия и компоненты,

необходимые для правильного сворачивания белка. Кроме того, возможно наличие пост трансляционных модификаций, отсутствие которых при экспрессии в *E.coli* привели к невозможности получения белка hpEst1 в достаточном количестве.

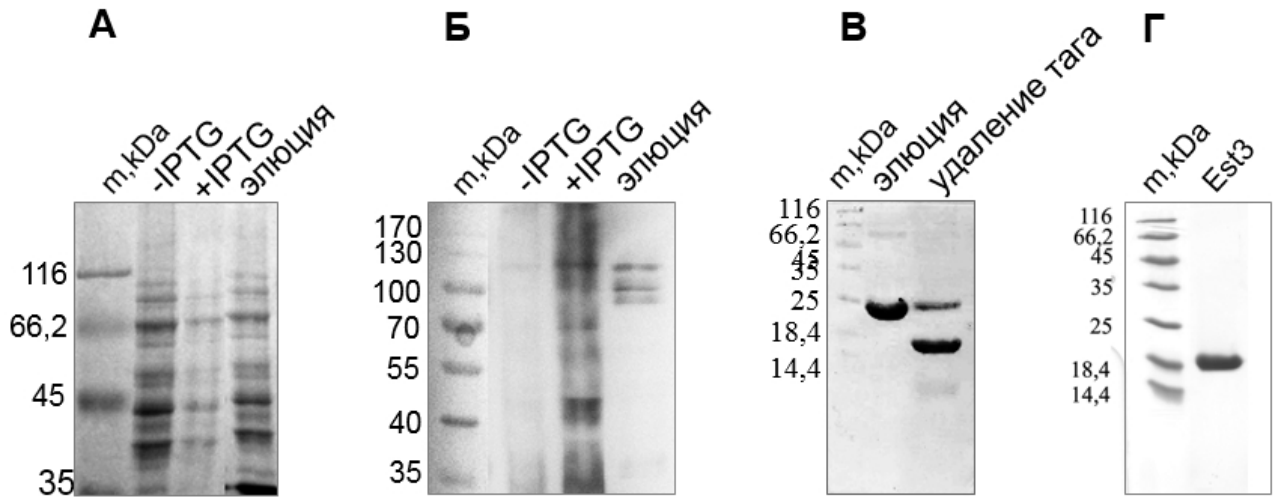


Рисунок 3.8. Результаты экспрессии, выделения и очистки рекомбинантных hpEst1 (А, Б) и hpEst3 (В, Г), полученных из клеток *E. coli*, трансформированных вектором pET30aTEV\_hpEst1 и pET30aTEV\_hpEst3. А. В дорожках «-IPTG» и «+IPTG» проанализированы белки тотальных клеточных лизатов *E.coli* до и после индукции экспрессии ИПТГ (IPTG). Образец в дорожке «элюция» соответствует фракции белка, очищенного с помощью металл-хелатной хроматографии на Ni-NTA сефарозе. Анализ проводили методом электрофореза в 10% ПААГ в денатурирующих условиях. Предсказанная масса hpEst1 составляет 93,5кДа. В указанной дорожке отсутствует зонка, соответствующая hpEst1. Б. Вестерн-блот анализ с антителами на 6 гистидинов. Детектируется очень маленькое количество белка во фракции «элюция». Такого количества белка недостаточно для структурных исследований. В. Образец в дорожке «элюция» соответствует фракции белка hpEst3, очищенного с помощью металл-хелатной хроматографии на Ni-NTA сефарозе. Предсказанная масса hpEst3 составляет 25,5кДа. Образец в дорожке «удаление тага» соответствует фракции белка hpEst3 из элюции, инкубированной с TEV-протеазой для удаления аффинного тага с N-конца белка. Предсказанная масса hpEst3 составляет 20,5кДа. Г. Образец в дорожке



«Est3» соответствует белковому препарату hpEst3, полученному с помощью дополнительной очистки посредством гель-фильтрации на колонке Superdex 75. Анализ проводили методом электрофореза в 15% ПААГ в денатурирующих условиях.

Белок hpEst3 детектируется в образце элюции с Ni-NTA сефарозы (Рисунок 3.8, В.). Затем полученный образец белка подвергся протеолитическому удалению аффинного тага с использованием TEV-протеазы. В результате удаления тага удалось получить белок, аминокислотная последовательность которого максимально близка к последовательности нативного дрожжевого hpEst3. Отличие составляют только два маленьких аминокислотных остатка, глицин и аланин на N-конце белка, влияние которых на структуру можно считать незначительным. hpEst3 был дополнительно очищен методом гель-фильтрации.

Выход чистого белка hpEst3 с литра культуры клеток *E.coli* составил 31,4 мг, чистота полученного препарата составила  $\approx 99,8\%$ . Полученный белковый препарат был охарактеризован методами динамического светорассеяния (DLS), термофлюориметрии (ТФ, TF) и кругового дихроизма (КД, CD) (Приложение 1). Степень гомогенности полученного препарата белка hpEst3 по результатам DLS составила 100%, %полидисперсности составил 11%, менее 15% - монодисперсный образец. %массы – процент частиц данного размера по массе - 100%, что означает наличие популяции частиц одного размера или 1 пика на графике, %интенсивности – процент частиц данного размера по интенсивности - 100%, что также означает наличие популяции частиц одного размера или 1 пика на графике.

По результатам спектров КД, полученный белковый препарат являлся структурированным, состоящим из смеси  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -листов. Полученный препарат белка полностью удовлетворял всем требованиям, предъявляемым к образцам для структурных исследований.

### 3.4 Структурные исследования белка hpEst3

Для определения структуры белка hpEst3 был выбран метод спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Для решения структуры этим методом были получены образцы белка, содержащего метки  $^{15}\text{N}$  и  $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ . Выход чистого препарата белка  $^{15}\text{N}$ -hpEst3 составил 15,3 мг с литра культуры клеток *E.coli*, чистота полученного препарата составила  $\approx 99,8\%$ . Выход чистого препарата белка  $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ -hpEst3 составил 5 мг с литра культуры клеток *E.coli*, чистота полученного препарата составила  $\approx 99,8\%$ .

Работа выполнена совместно с Лабораторией магнитной томографии и спектроскопии, Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В.Ломоносова (Польшаков В.И.). Для отнесения сигналов ядер  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$  основной цепи были сняты 3Д спектры (работа выполнена Марьясиной С.): HNCO, HN(CA)CO, HN(CO)CA, HNCA, CBCA(CO)NH, HNCACB, HВНА(CO)NH, HNHANВ и HNHA. Отнесение сигналов от боковых цепей были получены из 3Д спектров (работа выполнена Марьясиной С.): HCCH-TOCSY, HNHВ,  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC-NOESY,  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  HSQC-NOESY,  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  HSQC-TOCSY и 2D HBCB(CGCD)HD и HBCB(CGCDCE)HE [144]. Все спектры были обработаны и проанализированы. Удалось отнести сигналы 177 из 178 аминокислотных остатков (99.4%). С использованием полученных данных была решена структура белка hpEst3 (Рисунок 3.9).



Рисунок 3.9. Семейство 7 структур hpEst3. Красным выделены  $\alpha$ -спирали, желтым  $\beta$ -листы, зеленым петли.

В полученной структуре hpEst3 можно увидеть характерный структурный мотив – OB-fold (Рисунок 3.9, желтый) (укладка OB-fold – Oligonucleotide/Oligosaccharide-Binding Fold). OB-fold был идентифицирован в белках бактерий и дрожжей как домен, связывающий олигонуклеотиды и олигосахариды [145]. Впоследствии было показано, что различные OB-fold

могут участвовать во взаимодействии с ДНК, РНК и белками, однако белок-ДНК взаимодействия наиболее хорошо охарактеризованы. OB-fold различных белков варьируются по длине (от 70 до 150 аминокислотных остатков) и имеют очень низкую гомологию в аминокислотной последовательности, однако обладают весьма характерной укладкой структуры. OB-fold представляют собой  $\beta$ -бочку, состоящую из 5 антипараллельных  $\beta$ -листов, сверху обычно расположена  $\alpha$ -спираль, а с другой стороны расположена полость для связывания лиганда. Петли, соединяющие  $\beta$ -листы также различаются по последовательности и конформации, влияя на специфичность OB-fold [145].

Полученная структура hpEst3 обладает высокой степенью структурной гомологии с ранее полученной структурой Est3 *S.cerevisiae* (scEst3) [122] (Рисунок 3.10). Спираль hpEst3  $\alpha 2$  и scEst3  $\alpha 5$  находятся под одним углом к OB-fold и очень хорошо накладываются. В hpEst3  $\alpha 3$  длиннее  $\alpha 6$  scEst3, однако в scEst3 сразу за  $\alpha 6$  следует короткая спираль  $\alpha 7$ , отсутствующая в hpEst3. Петля L12 в hpEst3 заметно длиннее (аминокислотные остатки 49-58), чем L12 в scEst3 (аминокислотные остатки 73-79) (Рисунок 3.10).

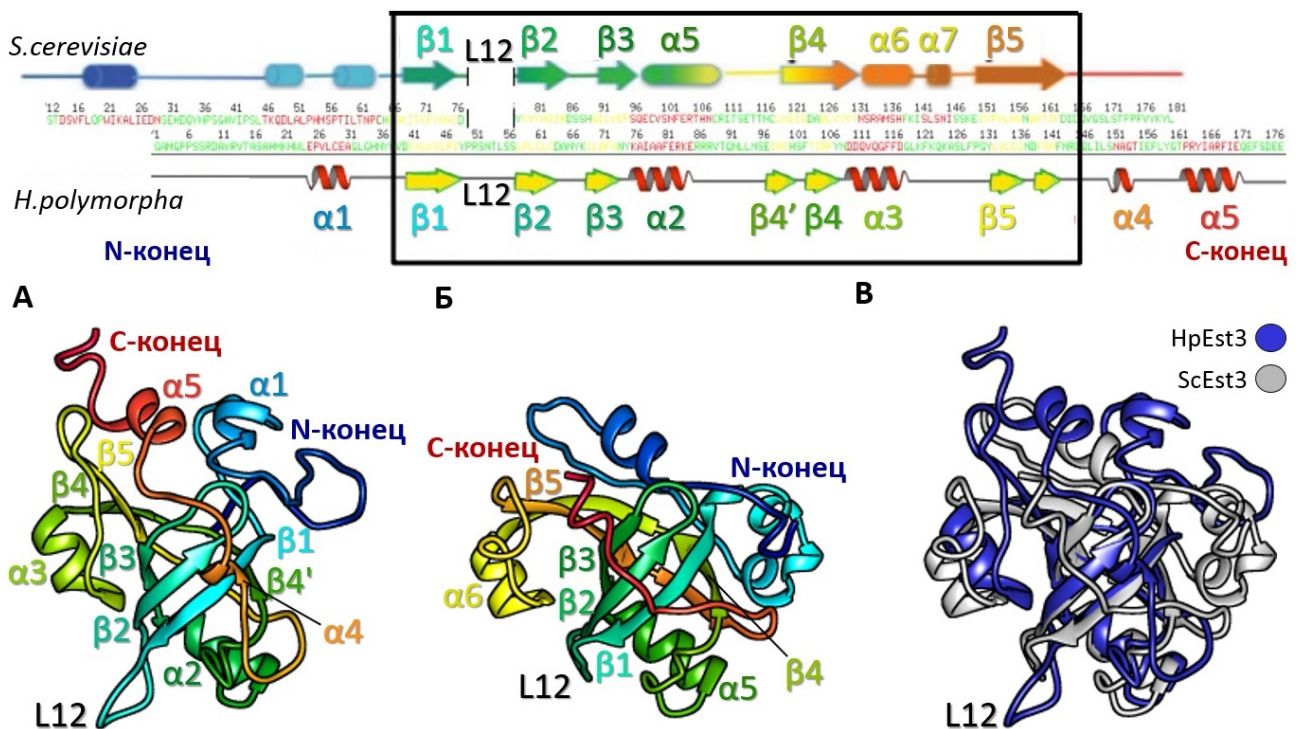


Рисунок 3.10. Сверху: схема вторичной структуры scEst3 и hpEst3, отмеченная на аминокислотной последовательности этих белков. Снизу: А. Структура белка hpEst3. Структура окрашена от С- к N-концу от красного к

синему соответственно. **Б.** Структура белка scEst3 (PDB Code ID 2M9V). Структура окрашена от С- к N-концу от красного к синему соответственно. **В.** Наложение структур hpEst3 (синий) и scEst3 (серый).

Кроме того, OB-fold полученной структуры hpEst3, как и scEst3, обладает высокой степенью структурной гомологии с OB-fold TPP1 человека (Рисунок 3.11). Спираль  $\alpha 5$  отсутствует в scEst3, однако хорошо накладывается в hTPP1. Интересным элементом является петля L12, в scEst3 её длина составляет 7 аминокислотных остатков, в hpEst3 10 аминокислотных остатков, а в hTPP1 21 аминокислотный остаток (121-141). Спираль  $\alpha 2$  в hpEst3 и  $\alpha 5$  в scEst3, также, как и в hTPP1, кэпирует  $\beta$ -бочку и располагается к её вертикальной оси под углом  $\sim 40^\circ$ . Также следует обратить внимание на высоко консервативную спираль  $\alpha 3$  в hpEst3 и  $\alpha 6$  в scEst3. Этот структурный элемент отсутствует в hTPP1, из чего можно сделать предположение, что эта спираль характерна именно для дрожжей и несет некую специфическую для этих организмов функцию. Спираль  $\alpha 4$  в hpEst3 отсутствует как в scEst3, так и в hTPP1.

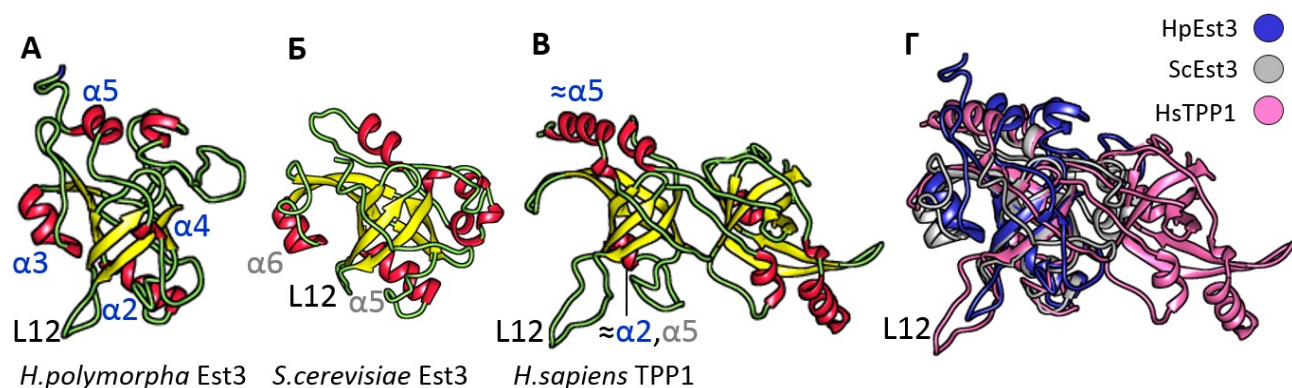


Рисунок 3.11. **А.** Структура белка hpEst3. Окрашены элементы вторичной структуры:  $\alpha$ -спирали (красный),  $\beta$ -листы (желтый) и петли (зелёный). Некоторые элементы вторичной структуры подписаны синим. **Б.** Структура белка scEst3 (PDB Code ID 2M9V). Окрашены элементы вторичной структуры:  $\alpha$ -спирали (красный),  $\beta$ -листы (желтый) и петли (зелёный). Некоторые элементы вторичной структуры подписаны серым. **В.** Структура белка hTPP1 (PDB Code ID 2I46). Окрашены элементы вторичной структуры:  $\alpha$ -спирали

(красный),  $\beta$ -листы (желтый) и петли (зелёный). Г. Наложение структур hpEst3 (синий) и scEst3 (серый) и hTRP1 (розовый).

Таким образом, полученная структура hpEst3 дала новую информацию об особенностях структуры в дрожжах, позволила выявить элементы, консервативные именно для дрожжей, а также элементы, консервативные для всех видов, включая человека. Эти данные будут использованы для направленного мутагенеза с целью уточнения функций и механизма работы белка Est3 в теломеразном комплексе дрожжей *H.polyomorpha*, что в дальнейшем сможет помочь пролить свет на механизм работы теломеразного комплекса человека и приблизит нас к решению задач по направленному воздействию на теломеразу и лечению связанных с её нарушением болезней.

### **3.5 Поиск границ доменов каталитической субъединицы дрожжей *H.polyomorpha* (hpTERT)**

Ранее в нашей лаборатории была идентифицирована и получена экспрессией в *E. coli* рекомбинантная полноразмерная теломеразная обратная транскриптаза дрожжей *H.polyomorpha* (hpTERT) [135, 136]. Однако белок оказался недостаточно стабильным в растворе: агрегировал при комнатной температуре уже при низкой концентрации (2 мг/мл). Такой белок не удовлетворял требованиям, предъявляемым к образцам для структурных исследований. Возможно низкая стабильность hpTERT связана с неструктурированностью полученного рекомбинантного белка из-за его большой молекулярной массы, сложной доменной пространственной организации и недостающих в *E.coli* компонентов, необходимых для внесения модификаций и правильного фолдинга. Однако домены TERT, полученные отдельно, могут быть структурированы и стабильны в растворе [7, 61, 59]. Поэтому следующей задачей данной работы было получение доменов TERT *H.polyomorpha* для структурных исследований, которые бы удовлетворяли следующим требованиям: возможность экспрессии и очистки в достаточном

количестве (выход белкового препарата не менее 5 мг с литра культуры клеток), растворимость в стандартных буферах, устойчивость к агрегации при комнатной температуре, структурированность, возможность концентрирования до 5-10 мг/мл.

### *3.5.1 Биоинформатический анализ последовательности hpTERT*

На первом этапе работы были определены участки, соответствующие функциональным доменам TERT *H.polymorpha*. Был проведён сравнительный анализ последовательностей hpTERT только с теми TERT, для доменов которых известна кристаллическая структура (*T.castaneum*, *T.thermophila*, *O.latipes*, *T.rubripes*). В качестве примера представлено выравнивание фрагментов TERT, соответствующих РНК связывающим доменам (Рисунок 3.12).



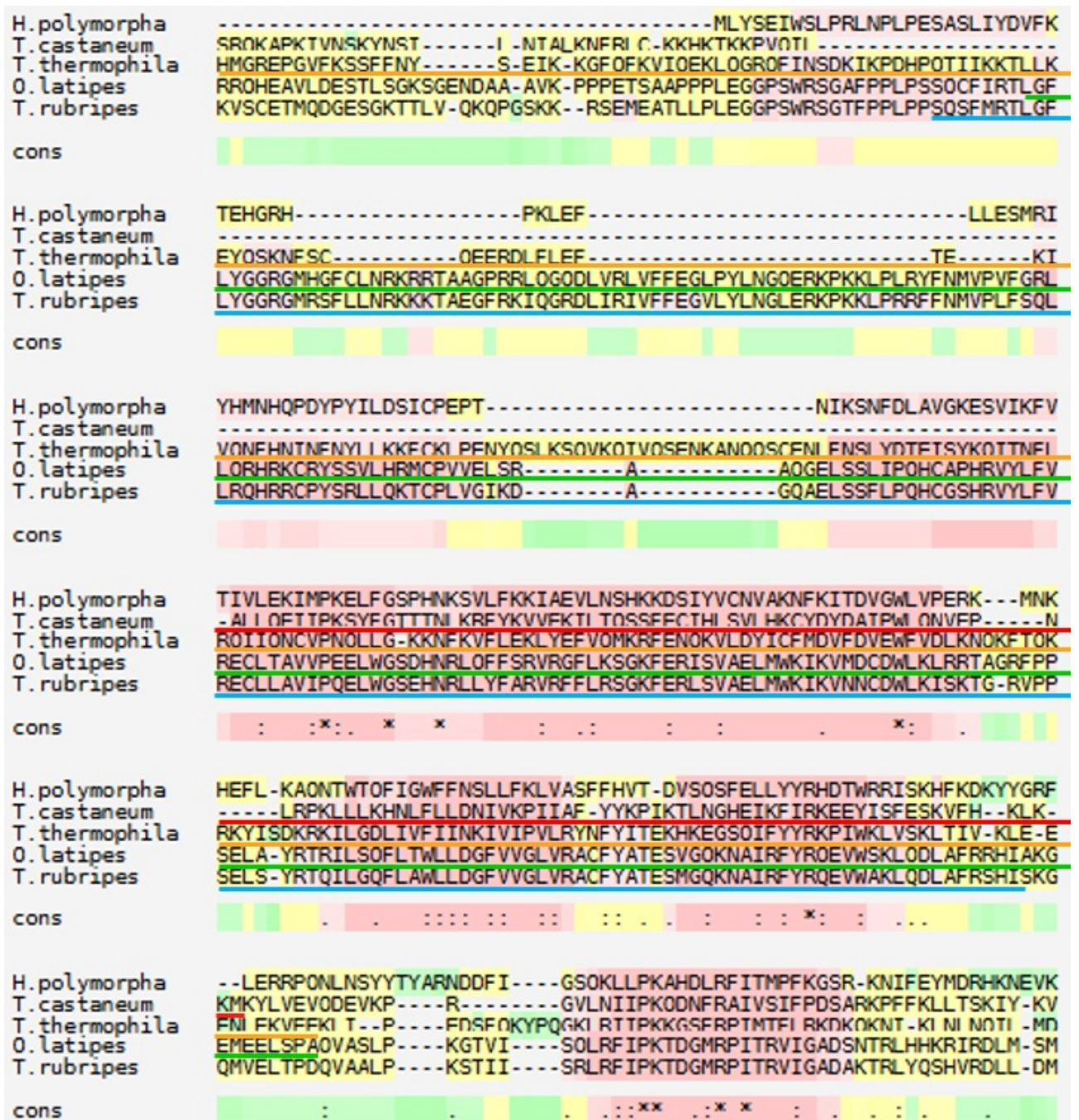


Рисунок 3.12. Фрагмент выравнивания аминокислотной последовательности hpTERT и tcTERT. Идентичные аминокислотные остатки отмечены знаком «\*», аминокислотные остатки, аналогичные по свойствам, отмечены «:». Выравнивание выполнено с помощью сервиса T-Coffee [143]. Степень консервативности (cons) окрашена от синего (низкая) к красному (высокая). Последовательности, соответствующие структурным доменам TRBD выделены красным в TERT *T. castaneum*, оранжевым в TERT *T. thermophila*, зелёным в TERT *O. latipes*, голубым в TERT *T. rubripes*



Для уточнения границ структурных доменов в hpTERT, в области каждого из них далее генерировали около десяти вариантов последовательности, отличающихся на несколько аминокислотных остатков с N- и С-конца каждого домена. Например, для С-концевого домена это были варианты 557-776, 555-776, 550-776, 548-776, 545-776, 541-776 и 539-776, отличающиеся положением N-конца. Аналогично были сгенерированы варианты С-концевого домена, укороченные с С-конца, а также с N- и С-концов одновременно. Поскольку известно, что N-концевой домен отделён от остальной части TERT ring неструктурированным линкером, также было принято решение создать конструкции на основе TERT ring с удалённым TEN доменом. Для этого были сгенерированы несколько вариантов последовательности hpTERT, укороченные с N-конца: N-1(154-783), N-2(155-783) и так далее.

Для нескольких сотен сгенерированных вариантов последовательностей доменов hpTERT проводили биоинформатический анализ с помощью серверов XtalPred, ProtParamTool и PPCpred для поиска таких фрагментов, которые имели бы наибольшую вероятность экспрессии в *E.coli*, растворимости, успешной очистки и кристаллизуемости. В результате были выбраны 14 доменов, которые имели наилучшие параметры для дальнейшей экспериментальной проверки.

### *3.5.2 Разработка метода выделения доменов hpTERT, пригодных для структурных исследований*

Из 14 отобранных вариантов укороченной последовательности hpTERT, один вариант соответствовал каталитическому домену (RT); три варианта РНК-связывающему домену (TRBD, TRBD2, TRBD3); два варианта С-коцевому домену (C-terminal, C-terminal 1); четыре варианта TEN домену, укороченному с N- и/или с С-конца; и еще пять последовательностей, соответствующих полноразмерному белку без N-домена и с укорочением с N-конца на 2, 6, 24 и 25 аминокислотных остатков соответственно (N-, N-2, N-6, N-24, N-25).

Выбранные фрагменты были клонированы под индуцируемый T7 промотор в экспрессионный вектор pET30aTEV, в котором последовательность белка слита с последовательностью, кодирующей 6 гистидинов (6His) и S- таг с N- конца белка, а также сайт узнавания TEV-протеазы для возможности удаления аффинного тага. Экспрессия белков в *E.coli* индуцировалась ИПТГ, очистка проводилась с помощью металл-хелатной хроматографии на Ni-NTA сефарозе в нативных условиях. Результаты тестовой экспрессии и выделения белков представлены в таблице 3.1 [146].

Таблица 3.1. Результаты тестовой экспрессии фрагментов hpTERT. В графе белок указаны условные названия выбранных конструкций. Анализ всех фракций проводился в денатурирующем ПААГ. Графе «лизат» соответствует растворимая фракция белков после лизиса клеток. Графе «дебрис» соответствует нерастворимая фракция белков после лизиса клеток. Графе «элюция» соответствует фракция белка, очищенного с помощью металл-хелатной хроматографии на Ni-NTA сефарозе. Знаками «-» и «+» обозначено отсутствие и наличие белка нужной массы в указанной фракции соответственно. Проверка экспрессии проводилась в штамме *E.coli* BL21(DE3).

Белок	Экспрессия в <i>E. coli</i> BL21(DE3)	Лизат	Дебрис	Элюция
TRBD3	-			
C-terminal	-			
N-	-			
TEN-N,C-cut	-			
TRBD	+	-	+	-
TRBD2	+	-	+	-
RT	+	-	+	-
C-terminal 1	+	-	+	-
N-6	+	-	+	-
TEN-N-cut	+	-	+	-
TEN-C-cut	+	-	+	-
N-2	+	+	+	+
N-25	+	+	+	+
TEN long	+	+	-	+

Для белков, оказавшихся в нерастворимой фракции, была проведена оптимизация условий экспрессии и выделения. Варьировались концентрация индуктора (ИПТГ) (0,1мМ; 0,5мМ; 1мМ), температура (18°C; 25°C; 37°C) и время индукции (2ч.; 4ч.; 8ч.; 16ч.). Были проверены различные способы лизиса клеток, такие как: дисмембратор, ультразвук и лизоцим. Также было проверено выделение в денатурирующих условиях (7М мочевины) с последующим рефолдингом. Однако проведенная оптимизация не привела к увеличению выхода белков (C-terminal, TRBD, TRBD2, RT, N-6 и N-24) в растворимой фракции. Таким образом, в растворимой форме из 14 белков удалось получить 3 фрагмента: TEN long (далее hpTEN) (аминокислотные остатки 1-153 hpTERT, предсказанная молярная масса 18,6кДа), N-2 (далее hpN-2) (аминокислотные остатки 155-783 hpTERT, предсказанная молярная масса 78кДа) и N-25 (далее hpN-25) (аминокислотные остатки 178-783 hpTERT, предсказанная молярная масса 75кДа). Результаты экспрессии и очистки белков представлены на рисунке 3.13.

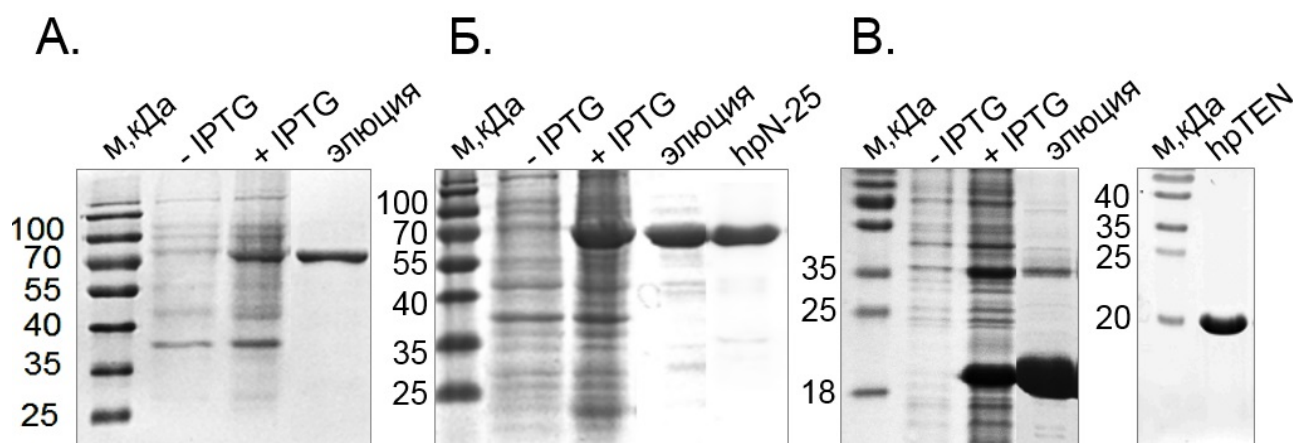


Рисунок 3.13. Результаты экспрессии, выделения и очистки рекомбинантных фрагментов hpTERT, полученных из клеток *E. coli*, трансформированных вектором pET30aTEV\_hpN-2 (А.), pET30aTEV\_hpN-25 (Б.) и pET30aTEV\_hpTEN (В.). Анализ проводили методом электрофореза в 10% (А, Б) и 15% (В) ПААГ в денатурирующих условиях. В дорожках «-IPTG» и «+IPTG» проанализированы белки тотальных клеточных лизатов *E.coli* до и после индукции экспрессии ИПТГ. Образец в дорожке «элюция» соответствует фракции белка, очищенного с помощью металл-хелатной хроматографии на Ni-

NTA сефарозе. Результаты экспрессии и очистки А. hpN-2 (78кДа). Б. hpN-25 (75кДа). Образец в дорожке «hpN-25» соответствует фракции белка после дополнительной очистки на ионообменной смоле гепарин-сефарозе и с помощью гель-фильтрации на хроматографической колонке Superdex 200. В. hpTEN (18,6кДа). Образец в дорожке «hpTEN» соответствует фракции белка после дополнительной очистки с помощью гель-фильтрации на хроматографической колонке Superdex 75.

Полученные белковые препараты были охарактеризованы методами динамического светорассеяния, термофлюориметрии и кругового дихроизма (Приложение 2).

Конечные характеристики полученных белковых препаратов:

- hpN-2 – выход составил 2 мг белкового препарата с литра культуры клеток, степень чистоты полученного препарата составляла 98-99%, по результатам DLS препарат содержал две популяции частиц, что давало два пика на графике. Процент полидисперсности первого пика, расчетная молекулярная масса которого совпадала с расчетной молекулярной массой белка hpN-2, составил 31,6%, что говорит о полидисперсности полученного образца (менее 15% - монодисперсный образец). %массы – процент частиц данного размера по массе – составил 98% (100% означает наличие популяции частиц одного размера или 1 пика на графике), оставшиеся 2% составляли компоненты расчётной массы, значительно превышающей теоретически рассчитанную для данного белка. %интенсивности для первого пика – процент частиц данного размера по интенсивности – составил 85,7 (100% означает наличие популяции частиц одного размера или 1 пика на графике). (Приложение 2). Таким образом, полученный белковый препарат не удовлетворял требованиям, предъявляемым к образцам для структурных исследований.
- hpN-25 – выход составил 8 мг чистого белкового препарата с литра культуры клеток, степень чистоты полученного препарата составляла 99%, по

результатам DLS препарат содержал две популяции частиц, что давало два пика на графике. Процент полидисперсности первого пика, расчетная молекулярная масса которого совпадала с расчетной молекулярной массой белка hpN-25, составил 14,1%, что говорит о монодисперсности полученного образца (менее 15% - монодисперсный образец). %массы составил 99,8% (100% означает наличие популяции частиц одного размера или 1 пика на графике), 0,2% составляли компоненты расчётной массы, значительно превышающей теоретически рассчитанную для данного белка. %интенсивности для первого пика составил 98,4. Таким образом, в образце присутствовали высокомолекулярные примеси, предположительно белковые агрегаты, однако их количество можно было считать незначительным (Приложение 2). По результатам спектров КД, полученный белковый препарат являлся структурированным, с преобладанием  $\alpha$ -спиральных элементов вторичной структуры. Выход и чистота полученного препарата удовлетворяли требованиям, предъявляемым к образцам для структурных исследований, однако полученный белок проявлял склонность к агрегации со временем и нестабильность в растворе при комнатной температуре, таким образом, требуется дальнейший поиск стабилизации полученного белка в растворе.

- ТЕН – выход составил 34 мг чистого белкового препарата с литра культуры клеток, степень чистоты полученного препарата составляла 99,6%, по результатам DLS препарат содержал частицы одного размера. Процент полидисперсности составил 13,8%, что говорит о монодисперсности полученного образца. %массы составил 100%, %интенсивности составил 100% (Приложение 2). Таким образом, полученный препарат удовлетворял требованиям к гомогенности образцов для структурных исследований. По результатам спектров КД, полученный белковый препарат являлся структурированным, с преобладанием  $\alpha$ -спиральных элементов вторичной структуры (Приложение 2). Полученный препарат белка полностью удовлетворял всем требованиям, предъявляемым к образцам для структурных исследований.

### 3.6 Структурные исследования N-концевого домена hpTERT (hpTEN)

#### 3.6.1 Структурные исследования hpTEN методом кристаллографии

Для кристаллизации hpTEN были получены как нативные, так и селенометионин замещенные образцы белка. Для получения селенометионин замещенных образцов белка клетки *E.coli*, трансформированные плазмидой pET33b+\_TEN, растили на бедной среде с добавлением селенометионина. Выход белка составил 21 мг с литра культуры клеток *E.coli*. Кристаллизация проводилась в условиях ограниченного протеолиза трипсином, были получены кристаллы, пригодные для определения структуры методом кристаллографии [147]. Данная работа выполнена совместно с Гамбургским подразделением Европейской Лабораторией Молекулярной Биологии (European Molecular Biology Laboratory, EMBL), группа Ламзина В. Структура белка была решена с использованием селенометионин замещенного образца с использованием метода многоволновой аномальной дифракции (Multiple-wavelength Anomalous Diffraction (MAD)) с разрешением 2.4 Å. Полученная модель состоит из трёх фрагментов: Met1-His29, Arg33-Thr82 и Arg97-Asn142 (Рисунок 3.14).

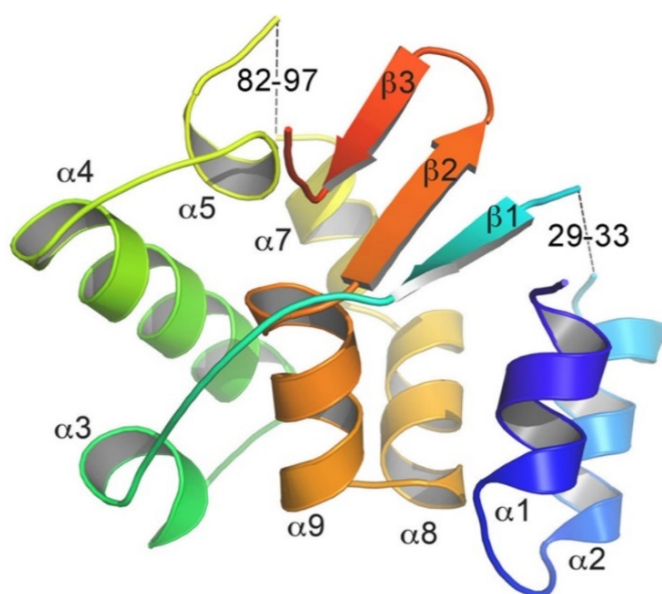


Рисунок 3.14. Кристаллическая структура hpTEN. Последовательность белка окрашена по радуге от С-конца (красный) к N-концу (синий). Недостающие фрагменты указаны цифрами. PDB Code ID 5NPT [148].

### 3.6.2 Структурные исследования hrTEN методом спектроскопии ЯМР

Для определения структуры белка hrTEN в растворе использовался метод спектроскопии ЯМР. Были получены образцы белка, содержащего радиоактивные метки  $^{15}\text{N}$  и  $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ . Выход чистого препарата белка  $^{15}\text{N}$ -hrTEN составил 25,3 мг с литра культуры клеток *E.coli*, чистота полученного препарата составила  $\approx 99,8\%$ . Выход чистого препарата белка  $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ -hrTEN составил 12 мг с литра культуры клеток *E.coli*, чистота полученного препарата составила  $\approx 99,8\%$ .

Работа выполнена совместно с Лабораторией магнитной томографии и спектроскопии, Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В.Ломоносова (лаборатория Польшакова В.И.). Спектры были сняты при температуре 303К на спектрометре Bruker Avance III HD 700 МГц. Отнесение сигналов основной цепи было выполнено с использованием следующих 3D спектров (работа выполнена Манцызовым А.): HNCO, HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, CBCA(CO)NH, HNHAHB, HBHA(CO)NH и HNHA. Отнесение сигналов от боковых цепей были получены из спектров (работа выполнена Манцызовым А.): 3D HCCH-TOCSY, HNHB,  $^{13}\text{C}$ - $^{1}\text{H}$  HSQC-NOESY,  $^{15}\text{N}$ - $^{1}\text{H}$  HSQC-NOESY и 2D DQF-COSY. Отнесение химических сдвигов было выполнено для 89% резонансов. Аминокислотные остатки, отнести сигналы от которых не удалось, расположены в центральной части белка (фрагменты Asn70–Leu76 и Lys95–Ala99). Причиной невозможности отнесения является быстрый водородный обмен, что приводит к отсутствию соответствующих амидных резонансов в спектрах  $^{15}\text{N}$ - $^{1}\text{H}$  HSQC и  $^{15}\text{N}$ - $^{1}\text{H}$ -гетероядерных 3D экспериментах. Анализ химических сдвигов сигналов основной цепи показал, что hrTEN состоит из 8  $\alpha$ -спиралей и 4  $\beta$ -листов [149]. Это немного отличается TEN *T. thermophila*, состоящего из 7  $\alpha$ -спиралей и 6  $\beta$ -листов [7].



Для полученного семейства ЯМР структур hrTEN наблюдается хорошо структурированный  $\alpha\beta$ -кор (аминокислотные остатки 1–70, 100–138), подвижная центральная петля (аминокислотные остатки 71–99) и неструктурированный С-конец (аминокислотные остатки 139–159) (Рисунок 3.15).

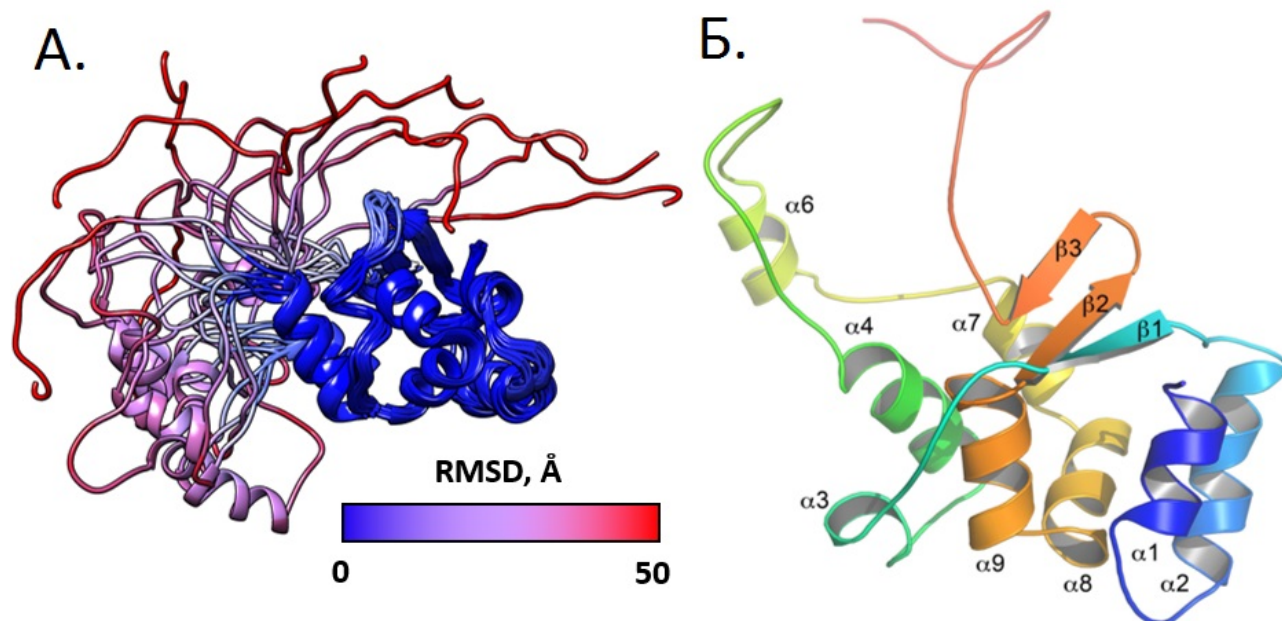


Рисунок 3.15. А. Семейство из 10 моделей hrTEN. Структуры окрашены по RMSD (упорядоченные участки – синий, неупорядоченные, подвижные участки - красный). Б. Репрезентативная модель hrTEN. PDB Code ID 5LGF [148].

### 3.6.3 Сравнение структур hrTEN, полученных методом ЯМР спектроскопии и кристаллографии

Структуры hrTEN, полученные независимо для кристалла и в растворе, оказались очень похожи (Рисунок 3.16).

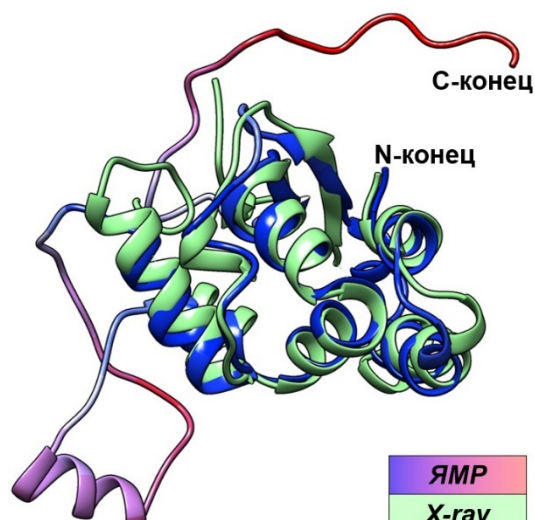


Рисунок 3.16. Наложение структур hrTEN, полученных с помощью ЯМР спектроскопии (ЯМР, окрашено по RMSD, синий-упорядоченные, красный –

неупорядоченные участки) и кристаллографии (X-гау, зелёный).

Коровая часть белка, состоящая из 6  $\alpha$ -спиралей ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_7$ ,  $\alpha_8$  и  $\alpha_9$ ) и 3  $\beta$ -листов, одинаково организована в обеих структурах (Рисунок 3.16). RMSD между атомами остатков основной цепи в коровой части белка составляет 0.80 Å. Основные отличия между кристаллической и ЯМР структурами расположены в подвижных частях белка (спираль  $\alpha_6$  и С-концевые аминокислотные остатки 143–159).

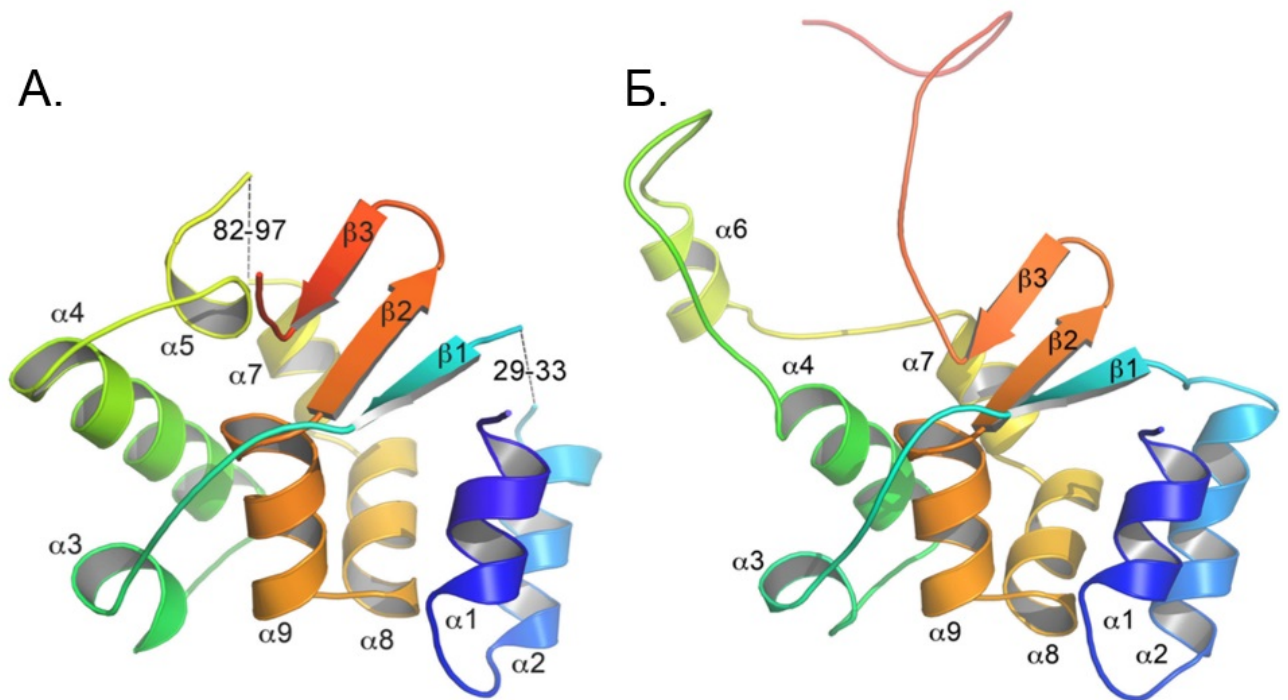


Рисунок 3.17. Структура hpTEN, полученная методом кристаллографии (А.) и спектроскопии ЯМР (Б.)

Участки 30–32 и 83–96 присутствуют только в структуре ЯМР (спираль  $\alpha_6$ ), а участок 71–82 лучше упорядочен в кристаллической структуре (спираль  $\alpha_5$ ) (Рисунок 3.17). С-концевые аминокислотные остатки 143–159 также отсутствуют в кристаллической структуре и не упорядочены в структуре ЯМР. Положение подвижной петли  $\alpha_3$  различается в кристаллической и ЯМР структуре с RMSD 1.8 Å. Спираль  $\alpha_4$  длиннее в кристаллической структуре, аминокислотные остатки из продолжения этой спирали не отнесены в спектрах ЯМР ввиду интенсивных конформационных подвижек. Спираль  $\alpha_2$  длиннее в структуре ЯМР, так как её фрагмент Gly30–Gly32 неупорядочен в кристалле.

Спираль  $\alpha_5$  присутствует только в кристаллографической структуре, а спираль  $\alpha_6$  – только в ЯМР структуре. Спираль  $\alpha_6$  подвижна по отношению к коровой части белка, при этом сама структура этой спирали достаточно стабильна.

### 3.6.4 Сравнение структур *hpTEN* и *ttTEN*

Ранее была решена структура N-концевого домена реснитчатых *T. thermophila* (*ttTEN*, PDB code ID 2B2A), обладающая уникальным фолдом, названным TERT essential N-terminal (TEN) домен [7]. Несмотря на невысокую степень гомологии в аминокислотной последовательности, структуры *hpTEN* и *ttTEN* обладают схожим структурным кором, состоящим из  $\alpha/\beta$  структур с центральным  $\alpha$ -спиральным мотивом, включающим спирали  $\alpha_7$ ,  $\alpha_8$  и  $\alpha_9$  (Рисунок 3.18).

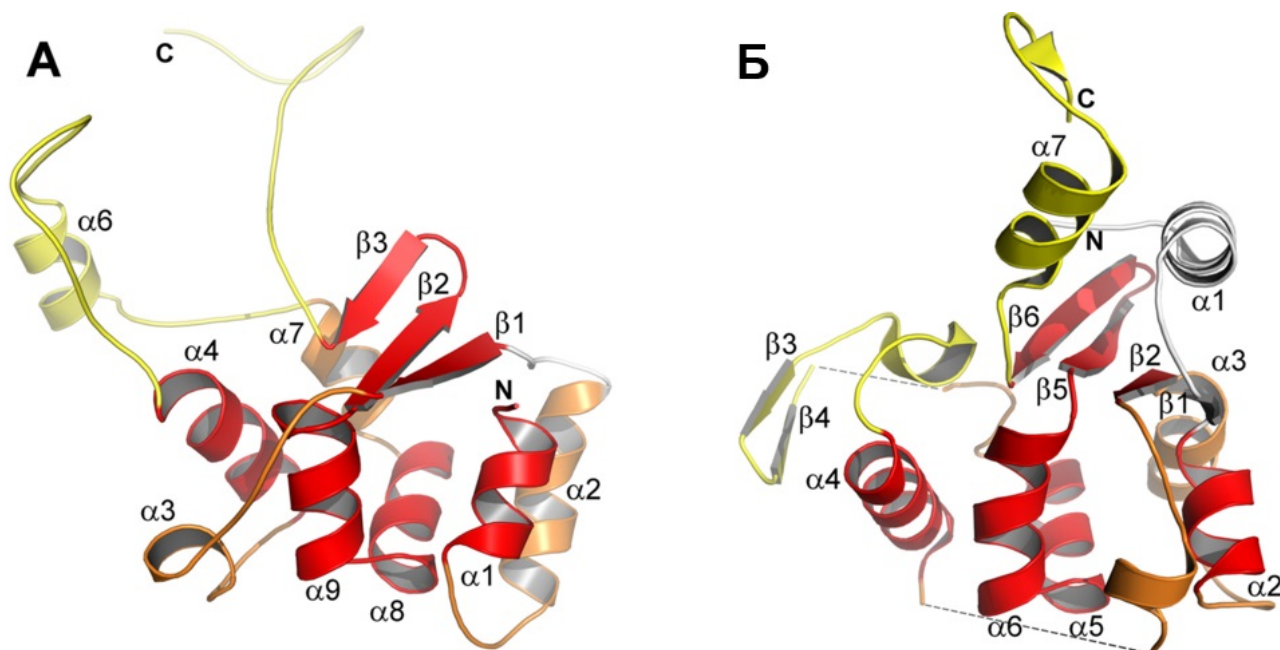


Рисунок 3.18. Сравнение структур *hpTEN* и *ttTEN*. (A) Структура *hpTEN* (красным окрашены хорошо совпадающие элементы *hpTEN* и *ttTEN* ( $\alpha_7$ – $\alpha_8$ –Gly– $\alpha_9$ ); желтым окрашены похожие, белым сильно отличающиеся или отсутствующие в одной из структур (B) Кристаллическая структура *ttTEN* (PDB code ID 2B2A) окрашена аналогичным образом.

В обеих структурах спирали  $\alpha_8$  и  $\alpha_9$  расположены под острым углом (V-мотив) благодаря высоко консервативному Gly117, обеспечивающему острый



поворот цепи. V-мотив практически идентичен для ttTEN и hpTEN (аминокислотные остатки 107–127 в hpTEN и 133–155 в ttTEN). Последовательность V-мотива содержит консервативный участок *hxxhxxxhGxxxhxxhh*, где h – большой гидрофобный аминокислотный остаток, G – высоко консервативный Gly, x – любой аминокислотный остаток (Рисунок 3.19). Этот элемент принадлежит к так называемому T2-мотиву (наиболее консервативный участок TEN домена). Он состоит из двух участков, V-мотива и второго консервативного участка из 5 аминокислотных остатков, отделённых друг от друга последовательностью из 15-25 аминокислотных остатков [56]. V-мотив расположен между спиралью  $\alpha_4$  с длинной петлёй с одной стороны и двумя спиралью ( $\alpha_1$  и  $\alpha_2$ ) с  $\beta$ -листом из трёх антипараллельных  $\beta$ -тяжей ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ) с другой стороны (Рисунок 3.19 Б-Г).

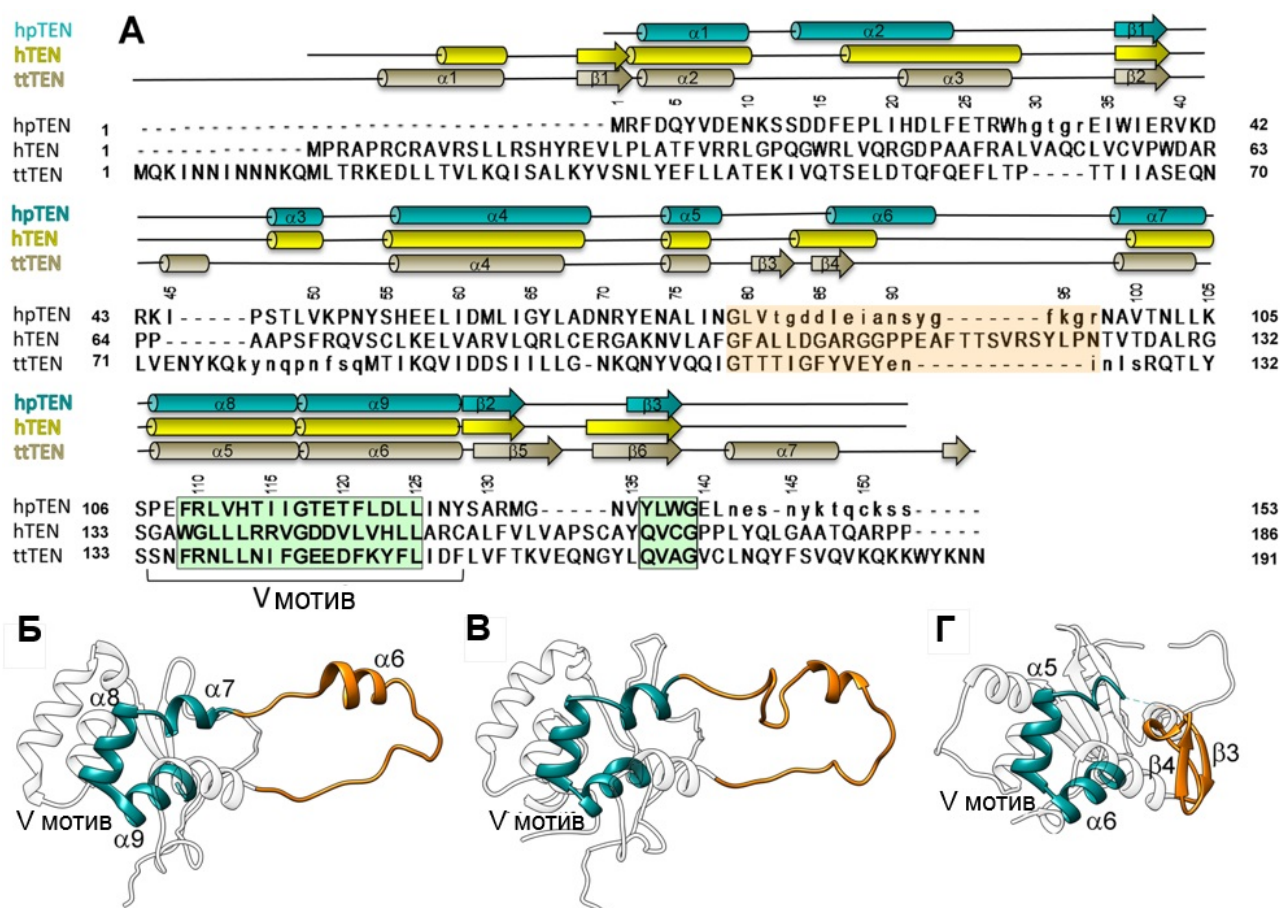


Рисунок 3.19. Выравнивание аминокислотной последовательности TEN доменов на основе структуры. А. Выравнивание аминокислотных последовательностей на основе структур hpTEN (использовалась комбинированная ЯМР и кристаллическая структура, аминокислотные остатки,

отсутствующие в кристаллической структуре, показаны строчными буквами) ttTEN (PDB Code ID 2B2A) и hTEN (предсказанная структура). Два консервативных участка, составляющие T2-мотив, выделены зелёным, область центральной петли выделена оранжевым, консервативные аминокислотные остатки выделены жирным шрифтом. Указаны номера аминокислотных остатков в hpTEN. Нумерация элементов вторичной структуры соответствует hpTEN и ttTEN. (Б–Г) Структуры hpTEN (Б), предсказанной структуры hTEN (В) и структура ttTEN (Г). Элементы структурного кора, соответствующие  $\alpha 7$ – $\alpha 8$ –Gly– $\alpha 9$  в hpTEN окрашены сине-зелёным, участки, соответствующие центральной петле 71–99 в hpTEN окрашена оранжевым.

hpTEN на 33 аминокислотных остатка короче с N-конца, чем ttTEN и в нём отсутствуют эквиваленты элементам  $\alpha 1$  и  $\beta 1$  в ttTEN. Можно обратить внимание, что длина N-концевой части TEN доменов из различных организмов достаточно сильно различается и некоторые виды не содержат аналога ttTEN  $\alpha 1$ . Петли, соединяющие  $\beta 2$  и  $\alpha 4$  в ttTEN и  $\beta 1$  и  $\alpha 4$  в hpTEN, значительно различаются в длине и конформации. Кроме того, петля спирали  $\alpha 3$  в hpTEN отсутствует в ttTEN. Соединение  $\alpha 4$  с V-мотивом (Рисунок 3.18, 3.19) в ttTEN содержит  $\beta$ -шпильку (Thr113-Tyr121), образованную  $\beta 3$  и  $\beta 4$  (Рисунок 3.19, Г). Следующий за этим фрагмент до Arg128 в начале спирали  $\alpha 7$  отсутствует в структуре ttTEN. Соответствующая этому фрагменту петля в структуре hpTEN длиннее и содержит спираль  $\alpha 6$  в середине (Рисунок 3.19, Б).

Наибольшее различие в структурах hpTEN и ttTEN наблюдается в петле между консервативной спиралью  $\alpha 4$  и V-мотивом. В hpTEN этот участок представляет собой длинную петлю со спиралью  $\alpha 6$ , в то время как в ttTEN это короткая петля с  $\beta$ -шпилькой. Анализ аминокислотных последовательностей TEN доменов различных организмов позволяет разделить TEN по длине этой петли на три группы. TEN домены дрожжей (включая hpTEN), животных и водоросли принадлежат к группе с длинной петлей (33-39 аминокислотных остатка) и содержат консервативный участок NhhxxGh (h гидрофобный

аминокислотный остаток, N консервативный Asn, G консервативный Gly, х любой аминокислотный остаток). TEN домены растений составляют группу с короткой петлёй (21 аминокислотный остаток), в состав которой входят остатки из консервативной области. TEN домены реснитчатых (включая ttTEN) образуют третью группу с варьирующейся длиной петли (22-35 аминокислотных остатков при отсутствии какого-либо консервативного участка). Можно предположить, что конформация линкера в TEN доменах группы с длинной петлёй (включая hTEN) соответствует петле hrTEN (Рисунок 3.19, Б, В), в то время как ttTEN с петлёй с  $\beta$ -шпилькой и другие организмы группы с варьирующейся длиной петли более далеки (Рисунок 3.19, Г). Конформация петли предположительно должна быть важна для функции. Петля в hrTEN соответствует фрагменту 89-127 в hTEN и включает большую часть так называемой DAT области (dissociates activities of telomerase – разделяет активность теломеразы) и включает аминокислотные остатки, необходимые для связывания с TPP1 и для привлечения hTEN на теломеры через взаимодействие с TPP1 [44, 45, 48]. Дрожжевой гомолог TPP1 Est3 входит в состав теломеразного комплекса, и было показано его взаимодействие с TEN доменом [51]. В реснитчатых взаимодействия с участием TEN домена более сложные по сравнению с дрожжами и позвоночными, что, вероятно, объясняется альтернативной конформацией петли в ttTEN. В структурной модели теломеразного комплекса *Tetrahymena thermophila* наблюдаются взаимодействия между TEN доменом и тремя другими белками [97, 150]. Показано взаимодействие ttTEN с С-концевым OB-fold доменом TEB1 (через петлю с  $\beta$ -шпилькой), с N-концевым доменом p50 (через аминокислотные остатки R137 и K90, а также участок 122–127, неупорядоченный в кристаллической структуре ttTEN) и с TEB2 (через петлю 77-87, также неупорядоченную в кристаллической структуре). P50 является функциональным ортологом TPP1 и Est3 [151], однако в этих белках не наблюдается гомологии в аминокислотной последовательности и пока не были идентифицированы аминокислотные остатки в p50, отвечающие за

взаимодействие с TEN.  $\beta$ -шпилька 112–120 ttTEN располагается между p50, Teb1 и Teb2 и таким образом играет важную роль в цепи взаимодействий теломеразного комплекса [97].

Таким образом, было показано, TEN домен TERT эволюционно разных организмов, таких как реснитчатые (ttTEN) и дрожжи (hpTEN), обладают схожей структурой. Несмотря на низкую гомологию в аминокислотной последовательности, структурный кор hpTEN консервативен, причём наибольшая консервативность наблюдается в V-мотиве. Сходство в последовательности в этой области в большом количестве различных организмов указывает на структурную и функциональную консервативность TEN домена.

### 3.6.5 Взаимодействие hpTEN с нуклеиновыми кислотами

На данный момент существует несколько гипотез функционирования TEN домена. Согласно одной из них, TEN домен служит якорным сайтом для ДНК при синтезе теломерного повтора. Данные, полученные с использованием фотоактивируемых сшивок, позволяют предположить, что якорный сайт расположен либо в TEN домене, либо в линкере между TEN и TRBD доменами [7, 152]. Было идентифицировано несколько аминокислотных остатков, вовлеченных в связывание ДНК в структуре ttTEN [7]. Однако эта гипотеза не подтверждается экспериментальными данными, поскольку TEN проявляет только очень слабую и зачастую вовсе не детектируемую аффинность в одноцепочечным ДНК фрагментам [49, 60, 153]. При этом TERT ring без TEN домена взаимодействует с одноцепочечной ДНК, хотя TEN домен улучшает это связывание [153, 154]. Была предложена альтернативная модель, согласно которой TEN домен стабилизирует гетеродуплекс, образованный теломерным ДНК продуктом и матричной РНК в активном сайте [55, 154].

В данной работе для проверки существующих гипотез было проверено *in vitro* связывание hpTEN с РНК и ДНК фрагментами, моделирующими фрагменты теломеразной РНК и теломерной ДНК. В качестве метода было



выбрано гетероядерное ЯМР титрование. Для этого hrTEN, в котором все азоты были замещены на  $^{15}\text{N}$ , титровали возрастающей концентрацией РНК и ДНК фрагментами до 5-10 кратного молярного избытка над белком. При этом взаимодействие  $^{15}\text{N}$ -hrTEN с нуклеиновыми кислотами детектировали по изменениям положения  $^1\text{H}$  и  $^{15}\text{N}$  химических сдвигов аминокислотных остатков, расположенных в области связывания (Таблица 3.2).

Таблица 3.2. Нуклеиновые кислоты, использованные для тестирования взаимодействия с hrTEN. а.  $K_d$  измерена для hrTEN с двойной заменой N53A/S55A. б.  $K_d$  измерена для hrTEN с тремя и четырьмя заменами N53A/S55A/R110A и N53A/S55A/R110A/E119A.

#	тип нуклеиновой кислоты	нуклеотидная последовательность	$K_d$ мМ
E1	оцРНК 1	РНК 5'CGCCACCC3'	$5.0 \pm 2.5$
E2	оцДНК 2	ДНК 5'GTGGCGGGTGGCG3'	> 10
E3	РНК-ДНК гетеродуплекс 1	ДНК 3'GCGGTGGG5'	$1.4 \pm 0.3$
		РНК 5'CGCCACCC3'	
E4	РНК-ДНК гетеродуплекс 2	ДНК 3'GCGGTGGGCGGTG5'	$0.9 \pm 0.2$
		РНК 5'CGCCACCCCGCCAC3'	$1.3 \pm 0.3^a$ $6.0 \pm 0.7^b$
E5	оцРНК 2	РНК 5'CGCCACCCCGCCAC3'	$5.0 \pm 3.0$
E6	оцДНК 2	ДНК 5'GTGGCGGGTGGCG3'	n/a
E7	инвертированная РНК-ДНК "вилка"	ДНК 3'ACTACAGGCGGTG5'	>10
		РНК 5'AUUCAACCGCCAC3'	
E8	нативная РНК-ДНК "вилка"	ДНК 3'CGGTGGGCTTTGTC5'	<0.1
		РНК 5'GCCACCCUUCGUCA3'	
E9	РНК-ДНК "вилка" с выступающим фрагментом РНК	ДНК 3'CGGTGGG5'	$4.0 \pm 2.0$
		РНК 5'GCCACCCUUCGUCA3'	
E10	оцРНК до матричного участка	РНК 5'UUCGUCA3'	$4.5 \pm 2.5$
E11	RNA шпилька	<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="text-align: right;">           РНК 5' AACAAAUGGAGACG            3' UUGUGUACCUCUGC         </div> <div style="text-align: center; font-size: 0.8em;">           A U C C         </div> </div>	$1.9 \pm 0.4$

Одноцепочечная РНК, моделирующая фрагмент TER, а также некоторые другие варианты матричной РНК или ДНК-РНК гетеродуплексы сильно влияют на сигналы некоторых аминокислотных остатков hrTEN в спектрах ЯМР, что говорит о специфическом взаимодействии между этими нуклеиновыми кислотами и белком (Рисунок 3.20).

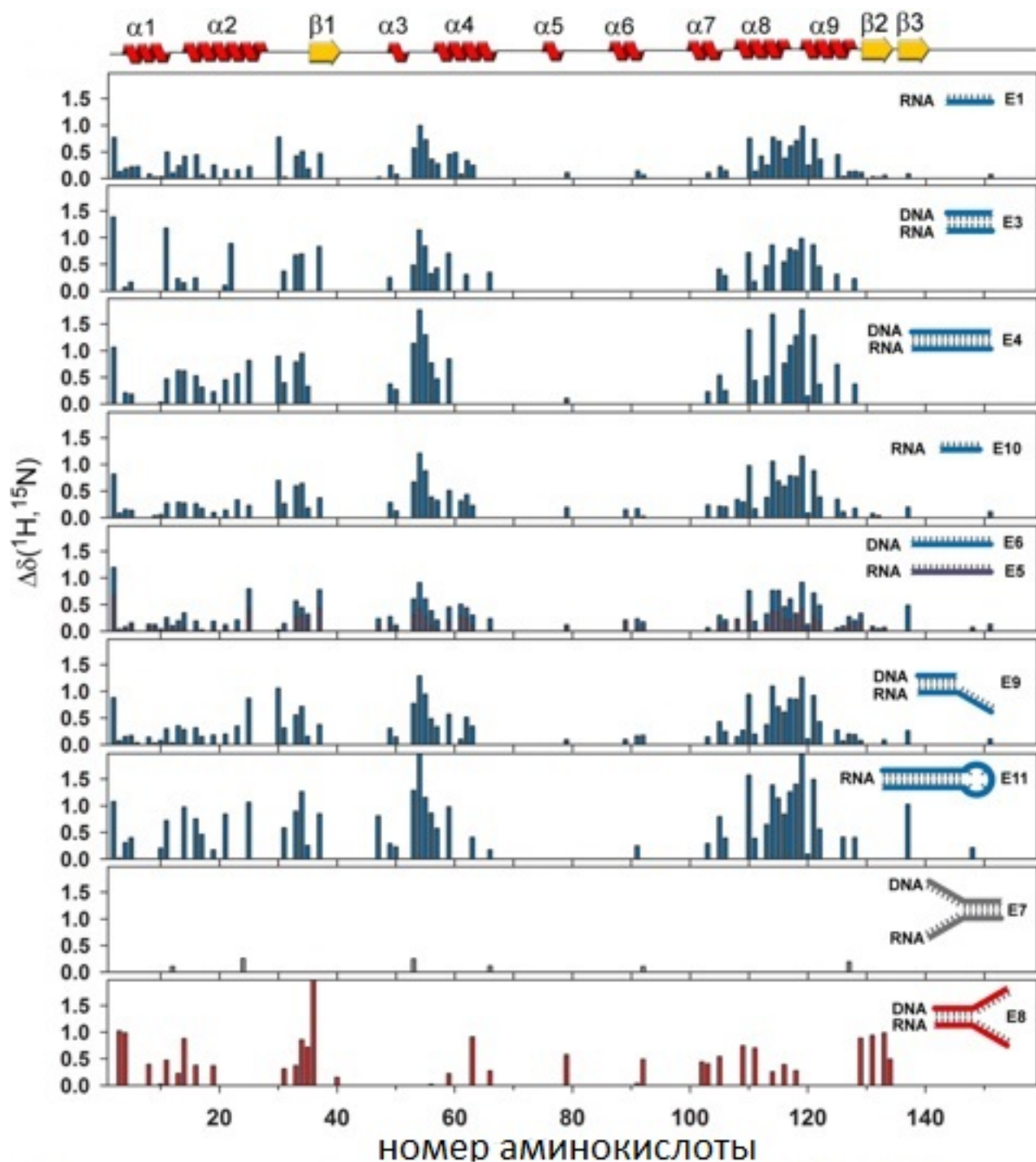


Рисунок 3.20. Взаимодействие hrTEN с РНК и ДНК олигонуклеотидами. Гистограмма, отражающая степень изменения химических сдвигов  $^1\text{H}$  и  $^{15}\text{N}$  в аминокислотной последовательности hrTEN домена при ЯМР титровании

олигонуклеотидами, моделирующими фрагменты теломеразной РНК, теломерной ДНК или РНК-ДНК гетеродуплекса (Таблица 3.2).

Аминокислотные остатки, вовлеченные во взаимодействие с нуклеиновыми кислотами, расположены в структуре hrTEN в двух кластерах (Рисунок 3.21). Первая поверхность, кластер I (Рисунок 3.21, А), включает в себя аминокислотные остатки, расположенные в спиральных  $\alpha 8$  и  $\alpha 9$  структурного кора (His113–Glu119), которые, с участием аминокислотных остатков из спирали  $\alpha 4$  и петли Asn53–His56, образуют бороздку на поверхности hrTEN (Рисунок 3.21, А). Второй участок связывания, кластер II, взаимодействует с нуклеиновыми кислотами с большей аффинностью, чем кластер I. Кластер II состоит из аминокислотных остатков, расположенных в спиральных  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  и в  $\beta$ -листе (R2–K11, G30–R39, G79, Ser129–Tyr136) (Рисунок 3.21, Б).

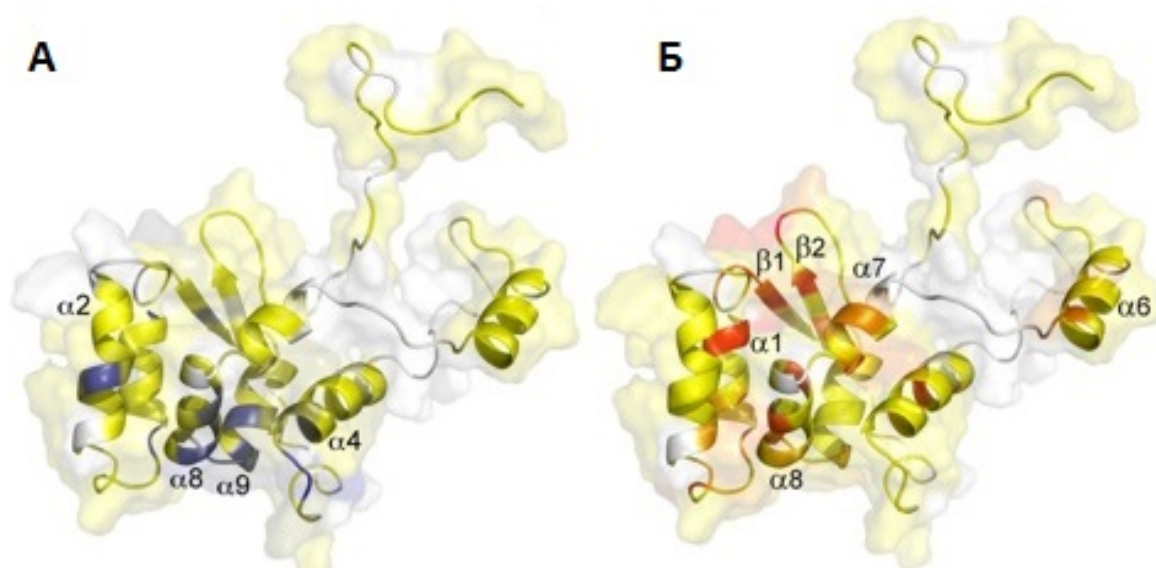


Рисунок 3.21. Структура hrTEN домена, окрашена по величине изменения химических сдвигов при титровании гетеродуплексом (А, кластер I) и нативной РНК-ДНК «вилкой» (Б, кластер II). Желтый – нет взаимодействия, синий или красный – наибольшие изменения при титровании гетеродуплексом и «вилкой» соответственно. Аминокислотные остатки, отсутствующие в  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC спектре окрашены белым.

Кластер II специфически узнаёт структуру «вилку», представляющую собой разветвление комплементарного ДНК-РНК гетеродуплекса на одноцепочечную ДНК и РНК (Таблица 3.2, E8). При этом, согласно данным ЯМР титрования, большинство аминокислотных остатков из кластера II, вовлечённых во взаимодействие с вилкой E8, не участвуют во взаимодействии с оцРНК, оцДНК, РНК-ДНК дуплексом или с инвертированной вилкой (Таблица 3.2, E7), в которой дуплексная и одноцепочечные участки РНК и ДНК поменяны местами (Рисунок 3.20). Стоит отметить, что аминокислотные остатки, образующие кластер I и II, примыкают либо входят в состав двух высоко консервативных между hrTEN и ttTEN структурных мотивов и включают участки последовательностей, консервативные среди TEN доменов разных видов.

Для уточнения локализации двух поверхностей, вовлечённых во взаимодействие с РНК и ДНК, были получены hrTEN с аминокислотными заменами. Для мутагенеза были выбраны поверхностные аминокислотные остатки, образующие кластер I (N53, S55, R110, E119) и кластер II (W36, R131, M132, N134). Однако, получить hrTEN с заменами в кластере II не удалось, данный белок не экспрессировался в *E.coli*. Возможно, это связано с тем, что выбранные аминокислотные остатки необходимы для корректного сворачивания белка. Выбранные остатки, входящие в состав кластера II, были заменены на аланин и в результате были получены белки hrTEN с двумя (N53A/S55A), тремя (N53A/S55A/R110A) и четырьмя заменами (N53A/S55A/R110A/E119A). Для полученных белков были сняты спектры кругового дихроизма, подтверждающие, что введённые аминокислотные замены не повлияли на структуру белков (Приложение 3). Для изучения связывания нативного hrTEN и hrTEN с аминокислотными заменами с нуклеотидными лигандами был использован метод на основе термофореза – MicroScale Thermophoresis (MST) [155]. Термофорез – это направленное движение молекул, индуцированное температурными градиентами. Метод позволяет оценить взаимодействие по распределению концентрации аналита в

пространстве (в капилляре) при повышении температуры, которое визуализируется флуоресцентным красителем, ковалентно связанным с лигандом. MST позволяет изучать взаимодействия с константами диссоциации от нМ до мМ [155].

Для изучения связывания hrTEN с нуклеиновыми кислотами методом MST были использованы ДНК олигонуклеотиды E4 и E8 (Таблица 3.2), содержащие карбоксифлуоресцеин (FAM) на 5' конце. Было изучено взаимодействие с ДНК-РНК гетеродуплексом E4 и нативной вилкой E8, а также с соответствующими оцДНК. Наибольшей аффинностью характеризовалось взаимодействие hrTEN с нативной вилкой E8 ( $K_d$   $0.4 \pm 0.2$  мМ), в то время как для гетеродуплекса E4 и оцДНК E2 значения констант диссоциации составили  $0.9 \pm 0.2$  и  $1.0 \pm 0.2$  мМ соответственно. Аналогичные значения  $K_d$  были получены при использовании флуоресцентно меченого hrTEN, титруемого немечеными нуклеиновыми кислотами, что говорит о том, что введение FAM на 5' конец исследуемых ДНК олигонуклеотидов не влияет на изучаемое взаимодействие. Введение двух замен кластера I в последовательности hrTEN не повлияло на константы, в то время как введение трёх и четырёх замен в области кластера I ослабило взаимодействие с гетеродуплексом E4, но не с нативной вилкой E8, что подтверждает результаты ЯМР титрования и локализации обнаруженных кластеров взаимодействия с нуклеиновыми кислотами. При этом, область связывания достаточно большая и только одновременная замена нескольких аминокислотных остатков может повлиять на взаимодействие. Кроме того, вероятно, что взаимодействие TEN домена с нуклеиновыми кислотами в составе теломеразного комплекса значительно сильнее, чем в модельных экспериментах по титрованию.

Отличие во взаимодействии TEN домена с вилкой от взаимодействия с дуплексом, оцДНК и РНК говорит о возможном участии TEN домена в ограничении длины гетеродуплекса, образованного при синтезе TERT теломерного ДНК повтора по РНК матрице. Понимание структурных основ этого специфического взаимодействия требует дополнительных исследований.

Согласно нашим данным, TEN домен взаимодействует с РНК цепью гетеродуплекса, при этом, практически не образуя контактов с ДНК цепью. Некоторые участки теломеразной РНК могут взаимодействовать с поверхностью, соответствующей кластеру I в TEN домене.

### 3.6.6 Предположительная роль TEN домена в работе теломеразы

Результаты, полученные для hpTEN домена TERT в данной работе, проливают свет на роль TEN домена в работе теломеразы. Согласно полученным данным, hpTEN взаимодействует с гетеродуплексом, образованным между матричным участком теломеразной РНК и новосинтезированной ДНК в месте разветвления цепей, а также с участками TER вне ДНК-РНК дуплекса. Основываясь на полученных результатах, нами была предложена модель полноразмерного комплекса hpTERT с гетеродуплексом, связанным в центральной поре (Рисунок 3.22, Б). При построении модели была использована структура hpTEN – репрезентативная модель, полученная методом ЯМР спектроскопии. Основная часть модели TERT – TERT ring – и ДНК-РНК гетеродуплекс, связанный в центральной поре, смоделированы при использовании TERT *T.castaneum* (PDB Code ID 3KYL [38]), последовательность матричной РНК и теломерной ДНК заменены на соответствующие из *H.polymorpha*. Положение hpTEN относительно TERT ring смоделировано на основании данных, полученных из ЯМР титрования.



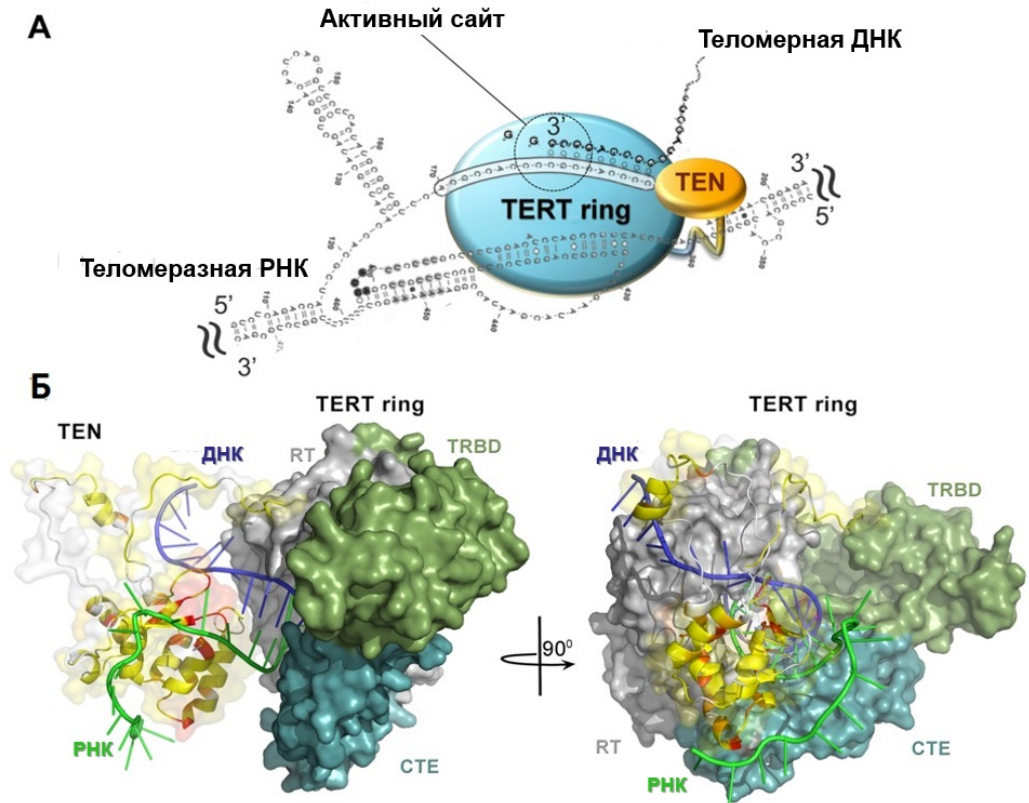


Рисунок 3.22. Предположительная роль TEN домена в работе теломеразы. А. Схема минимального теломеразного комплекса, состоящего из теломеразной обратной транскриптазы и теломеразной РНК. Б. Комбинированная 3Д модель hpTERT (в TERT ring окрашены TRBD, RT и CTE домены. TEN домен окрашен аналогично рисунку 3.21, Б, по величине изменения химических сдвигов при титровании нативной РНК-ДНК «вилкой». Теломеразная РНК окрашена зелёным, теломерная ДНК – синим.

Мы предполагаем, что TEN домен расположен в стороне (по отношению к активному сайту) от центральной поры TERT. Аналогичное положение TEN было предложено ранее в модели полноразмерного hTERT, в которой N- и C-концевые участки TEN домена были помещены в бороздку гетеродуплекса [156]. Однако в модели, предлагаемой в данной работе, ориентация TEN домена немного отличается. Фрагменты цепи непосредственно перед  $\beta 1$  и петля между  $\beta 2$  и  $\beta 3$  непосредственно участвуют в специфическом узнавании структуры ДНК-РНК вилки (Рисунок 3.17, рисунок 3.21, Б). В связи с этим в созданной модели TEN домен расположен таким образом, что эти участки ориентированы в направлении центральной поры TERT ring и ДНК-РНК вилки. В таком



положении N-конец TEN домена располагается достаточно близко для взаимодействия с теломеразной РНК. С-концевой участок TEN неупорядоченный как в кристаллической, так и в структуре ЯМР, однако он может быть расположен близко к теломерной ДНК для их возможного взаимодействия [152].

В связи с тем, что в последовательность матричного участка hpTER входит 2 повтора, длина гетеродуплекса между новосинтезированной теломерной ДНК и TER может достигать 16 нуклеотидов в длину. Однако, известно, что длина такого гетеродуплекса в теломеразах составляет 5-6 или 7-8 нуклеотидов в зависимости от организма [84, 78]. Ступенчатое разделение гетеродуплекса должно совпадать с транслокацией теломеразы после добавления каждого нового нуклеотида. Такой механизм не допускает слишком сильного взаимодействия, которое может помешать полному разделению цепей для RAP (Repeat-addition processivity) или процессивности 2 типа. RAP осуществляется по специальному механизму, включающему разделение цепей гетеродуплекса теломерной ДНК-TER, перемещение матричного участка TER относительно цепи ДНК, отжиг матричного участка TER на 3' конец теломерной ДНК и позиционирование гетеродуплекса в активном сайте TERT для осуществления синтеза [157].

Другим важным моментом является взаимодействие TEN домена с теломерной ДНК. Основываясь на предложенной модели, оцДНК до 5' конца гетеродуплекса расположена между TEN доменом и С-концевым доменом TERT (СТЕ). На поверхности СТЕ находится гидрофобный участок, образованный аминокислотными остатками Pe431, Leu434, Pe504, Leu548 и Pe553, которые могут стабилизировать неспаренные нуклеотиды в цепи ДНК. Эта гипотеза согласуется с недавно предложенной моделью взаимодействия гетеродуплекса и удержания оцДНК с помощью hTERT [158]. С-концевая часть TEN домена и неупорядоченный линкер, содержащий много серинов, глутаминов и лизинов, может участвовать во взаимодействии с сахаро-

фосфатным остовом ДНК, что согласуется с ранее опубликованными данными [154].

Предполагалось, что TEN домен может участвовать в ограничении длины ДНК-ТЕР гетеродуплекса [154], однако механизм процесса пока не до конца ясен. Важно отметить функциональное сходство между TERT и РНК полимеразой II. РНК полимеразы II также образует комплекс с РНК-ДНК гетеродуплексом (РНК продукт-ДНК матрица) и его длина ограничена 8-9 парами оснований [159]. Белковые петли, расположенные на краю области связывания гетеродуплекса, участвуют в разделении цепей, во-первых, выступая стерическим барьером на пути растущего дуплекса, во-вторых, взаимодействуя с неспаренными нуклеотидами, таким образом компенсируя потерю энтропии за счет распаривания дуплекса [159]. В бактериальных РНК полимеразе такой белковый участок не только стерически препятствует росту гетеродуплекса, но и напрямую взаимодействует с его крайними парами [160, 161]. TERT ring без TEN домена не содержит белковых участков вне гетеродуплекс-связывающей поры. TEN домен соединен с TERT ring длинным гибким линкером и может быть расположен аналогично петлям в РНК-полимеразах, вовлечённых в разделение цепей гетеродуплекса.

В модели hpTERT, представленной в данной работе, фрагмент цепи TEN 131-139 расположен непосредственно между ДНК и РНК цепями, аналогично разделяющему цепи элементу РНК-полимераз. Этот фрагмент содержит консервативную последовательность *hQhxG* (*h* гидрофобный аминокислотный остаток, *Q* консервативный глутамин (Gln), *G* инвариантный глицин (Gly), *x* любой аминокислотный остаток). Этот фрагмент очень высоко консервативен в TEN доменах. Редкие исключения включают hpTEN, в котором глутамин заменён на тирозин и включен в мотив T2. Последовательность этого фрагмента может быть связана с последовательностью фрагмента, разделяющего цепи гетеродуплекса РНК-полимераз (например, VQVDG в RpoC из *T.thermophilus*), в которых консервативные гидрофобные аминокислотные остатки стабилизируют нуклеотиды в дуплексе и в РНК [161].

Согласно представленной модели, hpTEN может ограничивать размер длины гетеродуплекса между матричным участком теломеразной РНК и ДНК при синтезе теломерного повтора. Таким образом hpTEN облегчает разделение цепей, необходимое для транслокации РНК и процессивности теломеразы при добавлении теломерных повторов.

### 3.7 Заключение

В данной работе были получены данные о генах, кодирующих дополнительные белковые компоненты теломеразы дрожжей *H.polyomorpha* Est1 и Est3, идентифицированных на основании биоинформатического анализа и экспериментального подтверждения *in vivo*.

Были созданы конструкции для получения рекомбинантных белков hpEst1 и hpEst3. Рекомбинантный белок hpEst1 отсутствовал в растворимой фракции. Рекомбинантный белок hpEst3 оказался хорошо растворим и стабилен в растворе. Полученный белок был охарактеризован физико-химическими методами (CD, TF и DLS) (Приложение 1).

Для регуляторного белка hpEst3 были получены замещённые производные, содержащие  $^{15}\text{N}$  или  $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ . Совместно с Лабораторией магнитной томографии и спектроскопии, Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В.Ломоносова (Польшаков В.И.) были сняты спектры ЯМР и сделано отнесение сигналов, что позволило решить структуру этого белка в растворе.

Полученная структура hpEst3 обладала высокой степенью структурной гомологии с ранее полученной структурой Est3 *S.cerevisiae* (scEst3) [122] и с OB-fold теломерного белка TPP1 человека [46] и ТЕВРβ реснитчатых *O.nova* [105]. hTPP1, как и гетеродимер onТЕВРα/β, входит в состав теломерного комплекса. TPP1 содержит N-концевой OB-fold домен, центральный PBD-домен и C-концевой TIN2-связывающий домен. Est3 входит в состав теломеразного комплекса дрожжей, это небольшой по размеру белок, содержащий единственный OB-fold-домен. Однако, несмотря на эти различия, структурное сходство белков Est3, TPP1 и ТЕВРβ может указывать на их эволюционную связь.

Таким образом, полученная структура hpEst3 дала новую информацию об особенностях структуры Est3 в дрожжах, позволила выявить элементы, консервативные именно для дрожжей, а также элементы, консервативные для всех видов, включая человека.

Кроме того, в данной работе был проведён поиск функциональных доменов hpTERT, подходящих для структурных исследований. В результате была определена и охарактеризована физико-химическими методами стабильный N-концевой домен hpTERT.

Представлены структуры TEN-домена hpTERT: в кристалле, полученная методом рентгеновской кристаллографии, и в растворе, полученная с использованием спектроскопии ЯМР.

Представленное структурное сравнение, вместе с анализом множественных выравниваний последовательностей на основе полученной структуры, позволило нам определить эволюционно консервативные структурные элементы, которые могут быть важны для функции TEN домена. Эти результаты подтверждают гипотезу о том, что N-концевые домены TERT из эволюционно далёких организмов содержат высоко консервативный структурный элемент – V-мотив. Конформация центральной области домена (аминокислотные остатки 71-99, образующие гибкие петли, и спираль  $\alpha 6$ , в случае hpTEN) могут значительно различаться и, таким образом, определять особенности функции и регуляции теломеразы в разных организмах. Основываясь на локальных структурных различиях между проанализированными структурами, можно считать, что hpTEN превосходно подходит для моделирования TEN домена человека.

Охарактеризовано взаимодействие hpTEN с нуклеиновыми кислотами, моделирующими участки теломеразной РНК, теломер и их комплекса. На основании полученных данных была предложена модель hpTERT. Согласно этой модели hpTEN может ограничивать размер длины гетеродуплекса между матричным участком TER и теломерной ДНК при синтезе повтора, что облегчает разделение цепей, необходимое для транслокации РНК и процессивности при добавлении теломерных повторов. hpTEN представляет собой стерический барьер аналогично РНК полимеразе II и бактериальным РНК полимеразам.

#### 4. Выводы

1. В дрожжах *H.polyomorpha* обнаружены и экспериментально подтверждены дополнительные белковые компоненты теломеразы дрожжей Est1 и Est3.
2. Разработан метод получения рекомбинантных и  $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$  замещённых N-концевого домена (TEN) каталитической субъединицы и регуляторного белка Est3 теломеразы *H.polyomorpha*, пригодных для структурных исследований.
3. Решена структура регуляторного белка Est3 теломеразы *H.polyomorpha* в растворе методом спектроскопии ЯМР. Идентифицированный OB-fold полученной структуры hpEst3 обладает высокой степенью структурной гомологии с OB-fold scEst3, hTPP1 и onTEBPβ.
4. Решена структура TEN-домена hpTERT: в кристалле, полученная методом рентгеновской кристаллографии, и в растворе, полученная с использованием спектроскопии ЯМР.
5. Охарактеризовано взаимодействие hpTEN с нуклеиновыми кислотами, моделирующими участки теломеразной РНК, теломер и их комплекса. На основании полученных данных была предложена модель функционирования hpTERT. Согласно этой модели hpTEN может ограничивать размер длины гетеродуплекса между матричным участком TER и теломерной ДНК при синтезе повтора, что облегчает разделение цепей, необходимое для транслокации РНК и процессивности при добавлении теломерных повторов.

## 5. Материалы и методы

### 5.1 Реактивы, буферные растворы, штаммы и биопрепараты

В работе были использованы следующие реактивы:

1,4-дителиотреитол (ДТТ), додецилсульфат натрия (ДСН) фирмы Helicon, Россия;

уксусная кислота, соляная кислота, хлороформ, изоамиловый спирт, фирмы Химмед, Россия;

полиэтиленгликоль 4000 фирмы Fluka, Германия;

этанол фирмы Ферейн, Россия;

NaCl, NaOAc, NH<sub>4</sub>OAc, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KCl, MgCl<sub>2</sub>, Tris, NaOH, KOH, ЭДТА, персульфат аммония, глицерин, бромфеноловый синий, ксиленцианол, бромистый этидий фирм Merk, Германия и Helicon, Россия;

Д-глюкоза, NP-40, насыщенный буфером ТЕ фенол фирмы Helicon, Россия

Ингибитор протеаз Complete Mini фирмы Roth, Германия;

нуклеотиды: dATP, dCTP, dGTP, dTTP; аминокислоты: глицин, лейцин, изолейцин, лизин, гистидин, триптофан, треонин, аргинин, метионин, фенилаланин, валин, тирозин; стеклянные шарики диаметром 425–600 микрон, глюкоза, LiOAc, БСА, поливинилпирролидон, ДНК спермы лосося, формальдегид, канамицин, ампициллин, PIPES, ДМСО, генетицин, bis-tris-propane фирмы Sigma, Германия;

бакто-триптон, бакто-агар, дрожжевой экстракт, Yeast Nitrogen Base w/o aminoacids (YNB), фирмы Difco, США;

легкоплавкая агароза фирмы Life Technologies, Шотландия;

мембрана HybondN+, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dGTP, [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP фирмы GE Healthcare, США;

олигодезоксирибонуклеотиды были синтезированы фирмой Евроген, Россия;

набор для очистки ПЦР продуктов из реакционной смеси и из агарозного геля, набора для выделения плазмидной ДНК фирмы Евроген, Россия



гликоген, набор для быстрого лигирования ДНК, T4 ДНК-лигаза, терминальная трансфераза, полинуклеотид киназа, Taq-полимераза, эндонуклеазы рестрикции *EcoRI*, *HindIII*, *EcoRV*, *NcoI* и буферные растворы к ним фирмы Thermo Scientific, США;

Q5® High-Fidelity DNA Polymerase ДНК полимеразы фирмы New England Biolabs (UK)

фильтровальная бумага Whatman 3MM фирмы Whatman Biomerta, Германия;

штаммы *H.polyomorpha* и плаزمиды рСНLX были любезно предоставлены Михаилом Агафоновым (Москва), штамм ΔhrpTERT был любезно предоставлен Еленой Смекаловой (Москва);

плазмиды рЕТ30aTEV была любезно предоставлена Даниелой Родэс, Кэмридж, Великобритания.

Таблица 4.1. Растворы, использовавшиеся в работе.

Название раствора	Состав раствора
среда LB, твердая среда LB	1 % бакто-триптон, 0,5 % дрожжевой экстракт, 1% NaCl (1,5% бакто-агар для твердой среды)
среда M9	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 48mM, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 22mM, NaCl 8.5mM, NH <sub>4</sub> Cl 18.7mM, глюкоза 0.4%, MgSO <sub>4</sub> 1mM, CaCl <sub>2</sub> 0.1mM
SOB	2% бакто-триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 8,55 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 0,5 mM MgCl <sub>2</sub>
SOC	2% бакто-триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 8,55 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 20 mM глюкоза
TB	10 mM PIPES, 15 mM CaCl <sub>2</sub> , 250 mM KCl, 55 mM MnCl <sub>2</sub> (pH 6,7)
среда YPD, твердая среда YPD	2% бакто-триптон, 1% дрожжевой экстракт, 2% глюкоза (2% бакто-агар для твердой среды)

среда SC, твердая среда SC	0,17% YNB, 0,5% (NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub> , 2% глюкоза, 0,01% аденин, 0,02% урацил, 0,01% триптофан, 0,01% лейцин, 0,005% гистидин, 0,003% изолейцин, 0,003% лизин, 0,003% тирозин, 0,002% аргинин, 0,02% треонин, 0,002% метионин, 0,005% фенилаланин, 0,015% валин (2% бакто-агар для твердой среды, 250 мкл 2М NaOH на 200 мл твердой среды).
среда SC-LEU, твердая среда SC- LEU	среда SC без добавления лейцина, 2% бакто-агар для твердой среды
10x буфер ТА	20 mM Tris-ацетат (pH 7.5), 50 mM NaCl и 2 mM MgCl <sub>2</sub>
2xSSC	0,3 M NaCl, 0,03 M цитрат натрия, pH 7.0
буфер для гибридизации	6xSSC, 0,5% ДСН, 5x раствор Денхардта, 100 мкг/мл ДНК спермы лосося
100x раствор Денхардта	2% БСА, 2% фиколл 400, 2% поливинилпирролидон
TE	10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM ЭДТА
10xTBE	1 M Tris-HCl (pH 8,3), 1 M H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , 20 mM ЭДТА
1xTBE	0,1 M Tris-HCl (pH 8,3), 0,1 M H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , 2 mM ЭДТА
YLB	0.1 M ЭДТА, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1% додецилсульфат лития
агарозный гель	1-2% агароза в буфере 1xTBE, 0,05 мкг/мл бромистый этидий
6x буфер для нанесения на агарозный гель	10 mM Tris, 60 mM ЭДТА (pH 7,6), 60% глицерин, 0,03% ксиленцианол, 0,03 % бромфеноловый синий
Разделяющий гель	375 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,1% SDS, 0,1% персульфат

для электрофореза белков	аммония, 0,05% TEMED, 10% или 15% акриламид, 0,33% или 0,5% N,N'-метиленбисакриламид соответственно
Концентрирующий гель для электрофореза белков	125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 5% акриламид, 0,1% SDS, 0,1% персульфат аммония, 0,05% TEMED, 0,17% N,N'-метиленбисакриламид
4xбуфер для нанесения на белковый гель (SB)	0,2 M Tris-HCl (pH 6,8), 4% SDS, 40% глицерин, 8% β-меркаптоэтанол, 0,2% бромфеноловый синий
Буфер для окрашивания белков в геле	0,25% кумасси голубой R250, 45% этанол, 10% уксусная кислота
TBST	20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20, 1% БСА
БСА-TBST	20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20, 5% БСА
Лизис буфер для выделения hpEst1	50 mM Hepes-NaOH pH 7.5, 500 mM NaCl, 10% глицерин, 20 mM имидазол, 0.1 мг/мл лизоцим, 5 mM 2-меркаптоэтанол и ингибитор протеаз (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail, Roche)
Лизис буфер для выделения hpEst3	50 mM bis-tris-propane pH 6.5, 500 mM KCl, 10% глицерин, 5mM MgCl <sub>2</sub> , 20 mM имидазол, 0.1 мг/мл лизоцим, 5 mM 2-меркаптоэтанол и ингибитор протеаз (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail, Roche)
Лизис буфер для выделения hpTEN для ЯМР	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7, 100 mM NaCl, 10% глицерин, 20 mM имидазол, 0.1 мг/мл лизоцим, 5 mM 2-меркаптоэтанол и ингибитор протеаз (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail, Roche)

Лизис буфер для выделения hpTEN для кристаллизации	50 mM Hepes-NaOH pH 7, 100 mM NaCl, 10% глицерин, 20 mM имидазол, 0.1 мг/мл лизоцим, 5 mM 2-меркаптоэтанол и ингибитор протеаз (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail, Roche)
hpEst3 буфер для гель-фильтрации	50 mM bis-tris-propane pH 6.5, 300 mM KCl, 5mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM ДТТ
hpTEN буфер для гель-фильтрации для ЯМР	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7, 100 mM NaCl, 1mM ДТТ
hpTEN буфер для гель-фильтрации для кристаллизации	50 mM Hepes-NaOH pH 7, 100 mM NaCl, 1mM ДТТ
hpEst3 буфер для ЯМР	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 6.5, 150 mM KCl, 1mM ДТТ
hpTEN буфер для ЯМР	20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7, 50 mM NaCl, 1mM ДТТ
hpTEN буфер для кристаллизации	50 mM Hepes-NaOH pH 7.0, 1mM ДТТ

Таблица 4.2. Олигонуклеотиды, использованные в работе. Если не указано РНК, используется ДНК-олигонуклеотид

Название олигонуклеотида	Нуклеотидная последовательность
E1	РНК 5'-CGCCACCC-3'
E2	5'-GTGGCGGGGTGGCG-3'
E3	3'-GCGGTGGG-5'
E4	РНК 5'-CGCCACCC-3'
E5	3'-GCGGTGGGGCGGTG-5'

E6	PHK 5'-CGCCACCCCGCCAC-3'
E7	PHK 5'-CGCCACCCCGCCAC-3'
E8	5'-GTGGCGGGGTGGCG-3'
E9	3'-ACTACAGGCGGTG-5'
E10	PHK 5'-AUUCAACCGCCAC-3'
E11	PHK 5'- AACAAAUGGAGACGAUCCCGUCUCCAUGUGUU-3'
G4	5'-GGGTGGCGGGGTGGCGGGGTGGCGGGGTGGCG-3'
C4	5'-CGCCACCCCGCCACCCCGCCACCCCGCCACCC-3'
hpEst1fwd	5'-CCTTGCCCAATAGATCTCCAATTTACG-3'
hpEst1rev	5'-GGCGATACTACAGAAAACATGCTTTCG-3'
e3f	5'-GTGAAGGCAACGAACGATGG-3'
e3r	5'-CGGCTAAAGGAGATGCAGAC-3'
hpExpEst1fwd	5'-ACGAATTCCGAATTCAATAACCCTTCCAAG-3',
hpExpEst1rev	5'- AAAAAGCTTTTAGGGTTTTCCATATTGGTGATACGCG- 3'
Est3-new – Fwd	5'- AAAAACCATGGGACCACCTTCCTCGAGAGACGC-3'
Est3-new- Rev	5'- AAAAGATATCTTATTCTTCATCACTAAATTCCTGCTCT ATAAAC –3'
hpTEN-C- his-Fwd	5'- AAAA TCTAGAATGAGGTTTGATCAGTATGT –3'
hpTEN-C- his-Rev	5'- AAAAC TCGAGGCCCTGAAAATACAGGTTTTCTGATGA TTTGCATTGGG –3'

Таблица 4.3. Штаммы, использованные в работе.

Название	Описание
<i>E. coli</i>	
JM-109	e14- (McrA-) <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> (rK-mK+) <i>supE44</i> <i>relA1 (lac-proAB)</i> (F' <i>traD36 proAB lacIqZ M15</i> )
BL-21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>)</i> λ(DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i> ]) [ <i>malB<sup>+</sup></i> ] <sub>K-12</sub> (λ <sup>S</sup> )
<i>H. polymorpha</i>	
Ogataea parapolyomorpha DL-1 (Hansenula polymorpha DL-1, Pichia angusta DL-1)	DL-1 (ATCC 26012) <i>leu2</i>
Ogataea polymorpha NCYC 495	NCYC 495 <i>leu2</i>

## 5.2 Методики, использованные в работе

### 5.2.1 Клонирование

#### 5.2.1.1 ПЦР

В пробирке 0,2 - 0,5 мл составляли следующую смесь:

5x буферный раствор для Q5-полимеразы	10 мкл (5мкл)
матричная ДНК (плазмидная или геномная)	5–50 нг
праймер 1	25 пмоль (12,5 пмоль)
праймер 2	25 пмоль (12,5 пмоль)
смесь dNTP	по 0,1 мМ каждого
H <sub>2</sub> O	до 50 мкл (до 25 мкл)

Добавляли 0,5 мкл (0,25 мкл) Q5-полимеразы (1 ед/мкл), тщательно перемешивали. Помещали пробирку в прибор для проведения ПЦР Mastercycler gradient фирмы Eppendorf.

Параметры ПЦР:

предварительный прогрев	98°C 30 с,
25–35 циклов:	98°C 10 с,
	45–65°C 20 с,
	72°C 30с/1000н.о. матрицы,
в конце программы	72°C 2 мин.

После проведения ПЦР в смесь добавляли 5 мкл (1 мкл) 6x буфера для нанесения на агарозный гель, проводили разделение фрагментов ДНК в 1-2% агарозном геле.

Фрагменты ДНК после проведения ПЦР выделяли при помощи набора для очистки ПЦР продуктов либо из агарозного геля (Евроген) согласно протоколу производителя.

При необходимости проводили ПЦР с колонии клеток *E. coli*. Для этого в ПЦР-смесь вместо матричной ДНК вносили 1 колонию клеток. Параметры ПЦР оставались такие же.

### 5.2.1.2 Выделение плазмидной ДНК

Выделение плазмид осуществляли с помощью набора реагентов для выделения плазмидной ДНК фирмы Евроген согласно протоколу производителя.

### 5.2.1.3 Приготовление векторов и вставок

Состав реакционной смеси:

ДНК	1–4 мкг
10x буферный раствор для эндонуклеазы рестрикции	2 мкл
эндонуклеаза рестрикции	10 ед
H <sub>2</sub> O	до 20 мкл



Полученную смесь инкубировали при 37°C в течение 1-2 ч. Добавляли 4 мкл 6x буфера для нанесения, наносили на агарозный гель и приводили к разделению фрагментов ДНК (5.2.1.4). Фрагмент нужной длины вырезали из геля и выделяли с помощью набора реагентов для выделения ДНК из агарозного геля (Евроген) согласно протоколу производителя.

#### *5.2.1.4 Разделение фрагментов ДНК в агарозном геле*

Для приготовления 1% агарозного геля добавляли 1 г агарозы к 100 мл раствора 1xTBE. Раствор нагревали в микроволновой печи до полного растворения агарозы. Затем раствор охлаждали приблизительно до 40–50°C, добавляли 5 мкл водного раствора бромистого этидия 10 мг/мл, перемешивали и выливали в плашку. После застывания геля образцы вносили в ячейки и проводили электрофорез при силе тока около 120 мА. Разделение фрагментов ДНК контролировали с помощью камеры с УФ лампой (прибор ChemiDoc (Bio-Rad)).

#### *5.2.1.5 Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля*

Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля проводили с помощью набора реагентов для выделения фрагментов ДНК из агарозного геля фирмы Евроген согласно протоколу с использованием фирменных реагентов. Концентрацию ДНК определяли по поглощению при 260 нм.

#### *5.2.1.6 Лигирование*

Состав реакционной смеси:

Вектор	50 нг
Вставка	10–50 нг (3x–7x мольный избыток к вектору)
5x буферный раствор для T4 ДНК-лигазы	4 мкл
T4 ДНК-лигаза	1 мкл
H <sub>2</sub> O	до 20 мкл

Инкубировали при комнатной температуре в течение 1-2 часов либо при +4°C в течение 16 часов. Полученной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* (5.2.2).

### 5.2.2 Приготовление компетентных клеток *E. coli*

Колонию клеток *E. coli* помещали в 50 мл среды SOB и инкубировали при температуре 18°C при перемешивании 125 об/мин до оптической плотности  $A_{600}$  0,5-0,6. Культуру клеток выдерживали во льду в течение 10 минут, затем осаждали центрифугированием при 5000g, при 4°C в течение 10 минут. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 20 мл охлажденного до 4°C буферного раствора ТВ. Суспензию клеток инкубировали при 0°C в течение 10 минут, затем осаждали центрифугированием при 5000g, при 4°C в течение 10 минут, промывали 20 мл буферного раствора ТВ, инкубировали при 0°C 10 минут и осаждали центрифугированием. Клетки ресуспендировали в 4 мл буферного раствора ТВ, добавляли 280 мкл ДМСО (до 7%) и инкубировали 10 минут при 0°C. По 200 мкл суспензии клеток переносили в 1,5 мл стерильные пробирки и замораживали в жидком азоте. Полученные компетентные клетки хранили при температуре -80°C.

### 5.2.3 Трансформация компетентных клеток *E. coli*

Пробирку с 200 мкл компетентных клеток размораживали во льду, добавляли 1-5 мкл раствора плазмидной ДНК (~ 0,1 мкг) или лигазную смесь и инкубировали во льду в течение 30 минут. Затем смесь прогревали в течение 40-50 секунд при 42°C, охлаждали во льду, добавляли 400 мкл среды LB и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. 100-200 мкл трансформационной смеси для плазмидной ДНК, или полный объем для лигазной смеси, высевали на чашку Петри с твердой средой LB, содержащей соответствующий антибиотик. Инкубировали чашку в течение 16 ч. при 37°C.

#### 5.2.4 Секвенирование плазмид

Нуклеотидную последовательность полученных плазмид контролировали с помощью автоматического секвенатора ABI prism 3100-Avant genetic Analyzer (4-х капиллярный). Для проведения реакции секвенирования образцы отдавали в Центр Коллективного Пользования «Геном» (Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН).

#### 5.2.5 Клонирование генов *hpEst1*, *hpEst3* и *hpTEN* в экспрессионный вектор

Для амплификации гена *hpEst1* проводили ПЦР с использованием олигонуклеотидов *hpExpEst1fwd* и *hpExpEst1rev*, *hpEst3* - *Est3-new-Fwd* и *Est3-new-Rev*, *hpTEN* – *hpTEN-C-his-Fwd* и *hpTEN-C-his-Rev* и гДНК в качестве матрицы. Полученный ПЦР продукт очищали с помощью набора Cleanup для очистки фрагментов ДНК из агарозных гелей и реакционных смесей (Евроген) согласно протоколу производителя.

Очищенный фрагмент ДНК и экспрессионный вектор обрабатывали эндонуклеазами рестрикции (*hpEst1* - *HindIII* и *EcoRV*, *hpEst3* - *NcoI* и *EcoRV*, *hpTEN* – *XbaI* и *XhoI*) (раздел 5.2.1.3), затем лигировали (раздел 5.2.1.6) для получения плазмиды *pET30aTEV-Est1*, *-Est3*, где *hpEst1* или *hpEst3* слит с 6His-, S-тагом и сайтом узнавания TEV-протеазой с N-конца, либо *pET33b+\_TEN*, где ген *hpTEN* слит с 6His-тагом и сайтом узнавания TEV-протеазой с C-конца. Плазмида *pET30aTEV* любезно предоставлена Даниелой Родэс (Кембридж, MRC LMB, Великобритания). Затем проводили трансформацию лигазной смеси в компетентные клетки *E.coli*, штамм JM-109 (раздел 5.2.3).

Проверяли наличие вставки методом ПЦР (раздел 5.2.1.1), нуклеотидную последовательность полученных плазмид контролировали при помощи секвенирования (раздел 5.2.4)

### 5.2.6 Получение штаммов дрожжей *H.polyomorpha*, «нокаутных» по генам *Est1* и *Est3*

#### 5.2.6.1 Получение кассет для трансформации дрожжей

Для создания штамма дрожжей *H.polyomorpha* с нокаутом гена *Est1* или *Est3*, был клонирован соответствующий ген с фланкирующими последовательностями длиной около 500 нуклеотидов из генома *H.polyomorpha* в вектор pUC19. Для амплификации гена *Est1* использовали олигонуклеотиды hpEst1fwd 5'-ССТТГСССААТАГАТСТССААТТТАСГ-3' и hpEst1rev 5'-GGCGАТАСТАСАГААААСАТГСТТТТСГ-3', для амплификации гена *Est3* использовали олигонуклеотиды e3f 5'-GTGAAGGСААСГААСГАТGG-3' и e3r 5'-СGGСТААAGGAGATGCAGAC-3' и геномную ДНК *H. polyomorpha* в качестве матрицы. Полученный ПЦР фрагмент обрабатывали Т4 ДНК полимеразой, Т4 полинуклеотид киназой, далее проводили его очистку через агарозный гель. Вектор pUC19, предварительно обработанный эндонуклеазой рестрикции *SmaI* и дефосфорилированный, вводили в реакцию лигирования с ПЦР фрагментом. По окончании реакции смесью трансформировали компетентные клетки *E.coli*, штамм JM-109. Колонии отбирали с помощью сине-белой селекции на чашках с ампициллином, X-gal и ИПТГ. Наличие вставки проверяли методом ПЦР.

Далее была создана кассета для нокаута соответствующего гена. Для получения нокаута по гену *Est1*, разрежали полученную конструкцию pUC19-*Est1* с помощью эндонуклеазы рестрикции *EcoRV*, сайт которой уникален для созданной конструкции и расположен приблизительно в середине гена белка *Est1*. Лейциновый маркер – это ген hpLEU2, позволяющий клеткам дрожжей расти на среде без лейцина – снимали при помощи ПЦР с плазмиды pCHLX. Лигировали лейциновый маркер с порезанной *EcoRV* плазмидой pUC19-*Est1*. Лигазной смесью трансформировали клетки *E.coli*, штамм JM-109. Отбирали колонии, содержащие плазмиду pUC19-*Est1* со вставкой hpLEU2 (pUC19-*Est1*-LEU2), наличие вставки проверяли методом ПЦР и секвенированием.

Для получения нокаута по гену *Est3*, разрезали полученную конструкцию pUC19-*Est3* с помощью эндонуклеаз рестрикции *NheI* (G/CTAGC) и *XhoI* (C/TCGAG). Плазмиду, содержащую ген-маркер лейцина (pCHLX) обрабатывали эндонуклеазами рестрикции: *XbaI* (T/CTAGA), *SalI* (G/TCGAC). Эндонуклеазы рестрикции инактивировали, продукты рестрикции очищали через гель. Лигировали разрезанную плазмиду pUC19-*Est3* и лейциновый маркер (hpLEU2). Лигазной смесью трансформировали клетки *E.coli*, штамм JM-109. Отбирали колонии, содержащие плазмиду pUC19-*Est3* со вставкой hpLEU2 (pUC19-*Est3*-LEU2), наличие вставки проверяли методом ПЦР и секвенированием.

Кассеты для трансформации получали методом ПЦР с праймерами hpEst1fwd 5'-CCTTGCCCAATAGATCTCCAATTTACG-3' и hpEst1rev 5'-GGCGATACTACAGAAAACATGCTTTTCG-3' и плазмидой pUC19-*Est1*-LEU2 в качестве матрицы; e3f 5'-GTGAAGGCAACGAACGATGG-3' и e3r 5'-CGGCTAAAGGAGATGCAGAC-3' и плазмидой pUC19-*Est3*-LEU2 в качестве матрицы.

Для получения кассеты для трансформации методом ПЦР составляли следующую смесь (такая же смесь использовалась для проверки замены генов на хромосоме методом ПЦР):

10x буфер для Taq полимеразы (+KCl)	2,5 мкл
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5 мкл
смесь dNTP (25 mM каждого)	0,2 мкл
праймер 1	15 пмоль
праймер 2	15 пмоль
плазида (гДНК)	5 нг (150 нг)
Taq-полимераза	0,3 мкл
H <sub>2</sub> O	до 25 мкл

Параметры ПЦР:

предварительный прогрев 95°C 5 мин,

30 циклов: 95°C 30 с,  
55°C 30 с,  
72°C 3 мин,  
в конце программы 72°C 10 мин.

После проведения ПЦР на приборе T100™ Thermal Cycler - Bio-Rad добавляли 5 мкл 6х буфера для нанесения на агарозный гель и проводили разделение фрагментов ДНК в 1-2% агарозном геле (раздел 5.2.1.4.).

ДНК-фрагмент нужной длины вырезали из геля и выделяли с помощью набора реагентов для выделения ДНК из агарозного геля (Евроген) согласно протоколу производителя.

Полученной кассетой трансформировали клетки дрожжей *H. polymorpha*.

#### 5.2.6.2 Трансформация клеток *H. polymorpha*

Колонию клеток *H. polymorpha* помещали в 5 мл среды YPD и инкубировали при перемешивании 200 об/мин в течение 16 часов при 30°C. Затем культуру клеток разбавляли свежей средой до  $A_{600} \sim 0,2$  и инкубировали при перемешивании еще 4 часа (150–170 об/мин) при 30°C до  $A_{600} \sim 0,6-1,0$ . 1 мл суспензии клеток осаждали центрифугированием 4000 g в течение 5 мин при 4°C, промывали стерильной дистиллированной водой, затем снова осаждали центрифугированием. Осадок клеток ресуспендировали в 25 мкл раствора 0,1 М LiOAc в буферном растворе TE, содержащим 0,5 мг/мл карьерной ДНК, добавляли к клеткам около 1 мкг ДНК (плазмида или ПЦР-фрагмент) и 3 капли стерильного 70% PEG4000 (~30мкл) и перемешивали. Полученную суспензию инкубировали при перемешивании 200 об/мин в течение 30 минут при 30°C. Затем прогревали в термостате в течение 18 минут при 45°C. После этого клетки охлаждали в течение 5 минут при -70°C, добавляли 1 мл YPD и инкубировали при перемешивании 200 об/мин в течение 2 ч при 30°C. Затем клетки осаждали центрифугированием в течение 1 мин при 4000 g при 4°C, ресуспендировали в 50 мкл TE и высевали на заранее прогретые до 30°C чашки

Петри с селективной средой. Для селекции после трансформации клетки высевали на среду, не содержащую лейцин (SC-LEU).

Замену генов на хромосоме в колониях после трансформации подтверждали методом ПЦР с праймерами hpEst1fwd и hpEst1rev для гена Est1; e3f и e3r для гена Est3, используя гДНК из колоний в качестве матрицы. Состав ПЦР смеси и параметры ПЦР описаны в разделе 5.2.1.1

### 5.2.7 Выделение геномной ДНК *H.polytorpha*

Колонию клеток необходимого штамма *H.polytorpha* помещали в 2 мл среды YPD и инкубировали при перемешивании 200 об/мин при 37°C около 12 часов. Клетки осаждали центрифугированием при 17000 g в течение 5 минут, промывали в 500 мкл стерильной воды, осаждали центрифугированием, отбирали воду и ресуспендировали в оставшемся количестве воды. Далее добавляли 200 мкл смеси фенол:хлороформ:изоамиловый спирт в соотношении 25:24:1, 0,3 г стеклянных шариков и 200 мкл буфера YLB. Перемешивали на вортексе в течение 2 минут, добавляли 200 мкл раствора TE. Центрифугировали при 17000 g в течение 5 минут, отбирали верхнюю водную фазу, добавляли к ней 1 мл этанола (96%) и перемешивали. Центрифугировали при 17000 g в течение 5 минут, отбирали водную фазу, осадок растворяли в 400 мкл раствора TE, добавляли 3 мкл рибонуклеазы А (10 мг/мл), инкубировали при 37°C в течение 5 минут. Затем добавляли 10 мкл 4 М NH<sub>4</sub>OAc и 1 мл этанола. Центрифугировали при 17000 g в течение 5 минут, отбирали супернатант, осадок сушили на воздухе при 44-45°C после чего растворяли в 30 мкл раствора TE. Концентрация выделенной ДНК составляла ~ 0,5 мкг/мкл.

### 5.2.8 Саузерн-блот анализ рестрикционных фрагментов теломер

#### 5.2.8.1 Получение и разделение рестрикционных фрагментов теломер

Из необходимого штамма *H. polytorpha* выделяли 10 мкг геномной ДНК и обрабатывали её эндонуклеазой рестрикции EcoRI. Состав смеси:

10x буфер для EcoRI

2,5 мкл



гДНК	10 мкг
EcoRI	3 мкл
H <sub>2</sub> O	до 25 мкл

Инкубировали смесь в течение 16 часов при 37 °С, затем 20 минут при 65 °С. Добавляли 5 мкл 6х буфера для нанесения на агарозный гель. Образцы наносили в 1,5% агарозный гель и проводили электрофорез при 100мА в течение 4 часов.

#### *5.2.8.2 Перенос ДНК на нитроцеллюлозную мембрану*

Гель инкубировали в 0,25 М HCl в течение 15 мин при перемешивании, споласкивали водой, инкубировали в 0,4 М NaOH в течение 30 минут при перемешивании. Для переноса использовали мембрану HybondN+, Amersham, Pharmacia Biotech, перенос проводили капиллярным методом в щелочном буфере (0,4М NaOH).

#### *5.2.8.3 Приготовление зондов для гибридизации*

Гибридизацию проводили с одновременным использованием двух зондов: олигонуклеотида G4 (5'-(GGGTGGCG)<sub>4</sub>-3'), радиоактивно меченного с 3' конца добавлением [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dGTP терминальной трансферазой (Thermo Scientific); и олигонуклеотида C4 (5'-(CGCCACCC)<sub>4</sub>-3'), радиоактивно меченного с 5'-конца добавлением [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]dATP T4 полинуклеотид киназой (Thermo Scientific) согласно протоколам производителя.

Для введения радиоактивной метки в олигонуклеотид G4 составляли следующую смесь:

Олигонуклеотид G4	1 нмоль
5х буфер для терминальной трансферазы	10 мкл
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]dGTP	800 МБк
H <sub>2</sub> O	до 50 мкл
терминальная трансфераза	1 мкл

Смесь инкубировали в течение 15 минут при 37°С, затем добавляли 2 мкл 0,5М ЭДТА и инкубировали в течение 10 минут при 75°С.

Для введения радиоактивной метки в олигонуклеотид С4 составляли следующую смесь:

С4	1 нмоль
10x буфер А	5 мкл
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]dATP	800 МБк
H <sub>2</sub> O	до 50 мкл
T4 полинуклеотид киназа	1 мкл

Смесь инкубировали в течение 20 минут при 37°C, затем в течение 10 минут при 75°C.

#### *5.2.8.4 Гибридизация мембраны с зондами*

Мембрану промывали в буфере 0,3M NaCl, 30mM Na<sub>3</sub>citrate (2x SSC, 20x SSC: 3M NaCl, 300mM Na<sub>3</sub>citrate), запекали в течение 1 часа при 80°C под вакуумом, промывали буфером 6xSSC. Далее проводили прегибридизацию в буфере, содержащем 6xSSC, 0,5% ДСН, 5x раствор Денхардта (1% поливинилпирролидон, 1% БСА, 1% фиколл), 100мкг/мл ДНК спермы лосося, предварительно денатурированной кипячением при 95°C в течение 5 минут. Объем буфера выбирали из расчета 0,2 мл на каждый квадратный сантиметр мембраны, прегибридизацию проводили в течение 2-5 часов при 68°C. Далее меняли буфер на гибридизационный (6xSSC; 0,01 М ЭДТА; зонд, предварительно меченный <sup>32</sup>P, из расчета 10 пмоль/мл гибридизационного буфера, 0,5% ДСН, 5x раствор Денхардта, 100мкг/мл ДНК спермы лосося, предварительно денатурированной кипячением при 95°C в течение 5 минут). Гибридизацию проводили в течении 12-16 часов при 68°C. Затем мембрану трижды промывали буфером, содержащим 2xSSC и 0,25% ДСН, при 68°C в течение 15 минут. Мембрану подсушивали и анализировали с помощью электронной автордиографии на приборе PhosphorImager (Molecular Dynamics).

### 5.2.9 Проверка сенесценс фенотипа штамма с нокаутом гена кандидата методом разведения на чашках Петри

Для анализа фенотипа в ряду поколений получали серию чашек Петри с увеличивающимся числом поколений клеток после удаления гена Est1 или Est3. Колонию клеток дрожжей растили в объеме 5 мл минимальной среды в присутствии глюкозы до насыщения. Культуру разбавляли свежей средой YPD до оптической плотности  $A_{600} = 0,02$  о.е. и продолжали растить. Аликвоту полученной разбавленной культуры последовательно разбавляли в 5 раз свежей средой и переносили на чашку Петри со средой YPD в количестве 5мкл. Таким образом, высаживали 5 мкл исходной разбавленной культуры с оптической плотностью  $A_{600} = 0,02$  и далее 3 последовательных разбавления ее в 5 раз. Чашку инкубировали при 37°C до появления колоний. Процедуру разбавления и высаживания на чашку повторяли 7 раз каждые 24 ч. Расчет числа поколений: 1) после удаления генов и выростания клеток на чашке с селективной средой, проходит около 15-20 поколений; 2) рост клеток из разбавленной культуры до насыщения – примерно 7-8 поколений.

### 5.2.10 Выделение и очистка рекомбинантных белков *hpEst1*, *hpEst3*, *hpTEN*

#### 5.2.10.1 Первая стадия очистки белков металл-хелатной хроматографией

Клетки *E.coli* штамма BL21DE3, трансформированного плазмидой pET30aTEV-Est1, либо pET30aTEV-Est3, либо pET33b+\_TEN, растили при 37°C до оптической плотности 0.5–0.8 ( $OD_{600}$ ) на среде LB либо M9 с добавлением [ $^{13}\text{C}_6$ ]-D-глюкозы (2 г/л) и  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  (1 г/л) (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.), для получения  $^{15}\text{N}$  и  $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$  замещённого образца. Затем индуцировали экспрессию белка добавлением 0,5 мМ изопропилтио- $\beta$ -D-галактозидом (IPTG) и инкубировали при перемешивании в течение 12–16 ч при 18°C. Клетки собирали центрифугированием и ресуспендировали в соответствующем лизис буфере. Все манипуляции проводили на льду либо при температуре 4°C. Клетки

лизировали при помощи ультразвука (амплитуда 95%, 3 раза по 2 минуты, чередовали 3 секунды ультразвук включен, 7 секунд пауза). Клеточный дебрис отделяли с помощью центрифугирования при 48000g в течение 30 минут. Затем инкубировали клеточный лизат с Ni-NTA-сефарозой (Qiagen) в течение 1 часа, аффинный сорбент отделяли от не связавшейся фракции белков центрифугированием при 3000g с последующим декантированием супернатанта. Ni-NTA-сефарозу промывали трижды соответствующим лизис буфером, содержащим 30 мМ имидазол. Белок, связавшийся с аффинным сорбентом, элюировали соответствующим лизис буфером, содержащим 350 мМ имидазолом. Отбирали алиquotы от полученных фракций, добавляли к ним 4xSB и анализировали в денатурирующем ПААГ.

#### *5.2.10.2 Протеолитическое удаление аффинного тага*

Для удаления аффинного тага, фракции, полученные на предыдущем этапе, собирали и диализовали против соответствующего лизис буфера, но без имидазола, глицерина, лизоцима и ингибитора протеаз. Диализ проводили дважды в течение 3-4 часов при температуре 4°C против сто кратного избытка по объёму буфера. К раствору белка добавляли раствор TEV-протеазы в мольном соотношении 1:20 (1 моль TEV-протеазы на 20 моль тагированного белка). Протеолиз проводили в течение 12-16 часов при температуре 4°C. Для удаления аффинного тага, оставшегося тагированного белка и TEV-протеазы, повторно проводили очистку металл-хелатной хроматографией на Ni-NTA-сефарозе (раздел 5.2.9.1), однако в этом случае интересующая фракция белка без аффинного тага находилась в проскоке, то есть во фракции, не связавшейся с аффинным сорбентом. Отбирали алиquotы от полученных фракций, добавляли к ним 4xSB и анализировали в денатурирующем 15% ПААГ.

#### *5.2.10.3 Гель-фильтрация*

Дополнительную очистку белков hpEst3 и hpTEN проводили с помощью гель-фильтрации на колонке Superdex 75 10/300 (GE Healthcare Life Sciences, Великобритания) при 4°C. Для этого собирали фракции, полученные на

предыдущем этапе, концентрировали их до получения образца объёмом 1 мл при помощи концентраторов согласно протоколу производителя (Amicon-Ultra, Merck Millipore, Германия) и наносили на колонку, предварительно уравновешенную соответствующим буфером для гель-фильтрации. Скорость потока устанавливали 0,5 мл/мин. За разделением белков следили по профилю поглощения  $A_{280}$ . Отбирали аликвоты от полученных фракций, добавляли к ним 4xSB и анализировали в денатурирующем ПААГ. Полученные образцы для ЯМР концентрировали до 0,2-0,6мМ, диализовали против соответствующего буфера, лиофилизировали и хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Для кристаллизации, образец hpTEN концентрировали до 8-10мг/мл, диализовали против соответствующего буфера и хранили при температуре  $4^{\circ}\text{C}$ . Концентрации белков определяли при помощи NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, США) по поглощению на 280 нм (коэффициент экстинкции hpTEN  $29910 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , Abs 0.1% = 1.61 мг/мл, коэффициент экстинкции hpEst3  $17420 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , Abs 0.1% = 0.852 мг/мл, коэффициенты рассчитаны с помощью сервиса ExPASy - ProtParam Tool).

#### *5.2.11 Проведение полиакриламидного гель-электрофореза и проверка экспрессии белка hpEst1 методом Вестерн-блот*

Собирали камеру для заливки полиакриламидного геля Mini-Protean II фирмы Bio-Rad, заливали 10% или 15% разделяющий гель. После полимеризации разделяющего геля заливали концентрирующий гель. После полимеризации концентрирующего геля наносили предварительно прогретые при  $95^{\circ}\text{C}$  в течение 10 минут образцы клеток *E.coli*, трансформированных плазмидой pET30aTEVhp-Est1 до и после индукции экспрессии ИПТГ. Электрофорез проводили в буферном растворе Tris-Gly-SDS, при 80–150 V до прохождения бромфенолового синего до конца геля.

Для окрашивания, гель помещали в ванночку с раствором, содержащим 0,25% красителя Кумасси R-250, 45% этанола и 10% уксусной кислоты, и инкубировали при покачивании 2–3 ч. Затем гель переносили в отмывочный

раствор, содержащий 30% этанол и 5% уксусную кислоту, и отмывали до проявления белковых зон.

Далее проводили перенос на мембрану. Гель помещали на три листа фильтровальной бумаги Whatman 3MM, смоченной буферным раствором Tris-Gly-SDS. На гель помещали нитроцеллюлозную мембрану, предварительно смоченную в этаноле и промытую раствором Tris-Gly-SDS. На мембрану помещали три листа фильтровальной бумаги Whatman 3MM, смоченной раствором Tris-Gly-SDS. Полученный «сэндвич» переносили в прибор для полусухого переноса Semi-dry фирмы Хеликон. Проводили перенос белков из геля на мембрану при 100 мА в течение 1,5 ч.

Разбирали «сэндвич», мембрану помещали в 10 мл раствора БСА-TBST и инкубировали в течение 16 ч при 4°C. Промывали мембрану 1 раз 10 мл буферного раствора TBST (0,1% Tween 20, 1% БСА) при комнатной температуре, далее инкубировали мембрану с раствором TBST (0,1% Tween 20, 1% БСА), содержащим первичные антитела на bHis с разведением в соотношении 1:5000, в течение часа при комнатной температуре. Мембрану промывали раствором TBST (0,1% Tween 20, 1% БСА), далее инкубировали мембрану со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, использовали разведение 1:10000. Мембрану инкубировали при перемешивании в течение часа при комнатной температуре. Затем мембрану промывали 5 раз 15 мл буферного раствора TBST при комнатной температуре по 10 минут, детектировали полосы белков с помощью набора реагентов ECL Western Blotting Detection Kit (Amersham) согласно протоколу производителя. Детекцию проводили при помощи прибора ChemiDoc (Bio-Rad).

#### *5.2.12 Спектроскопия кругового дихроизма*

Метод спектроскопии кругового дихроизма основан на оптической анизотропии, различии коэффициентов поглощения лево - и правополяризованного света хиральных молекул, в том числе белков. В дальней ультрафиолетовой области (от 190 до 240 нм) КД определяется в

основном поглощением амидов карбонильных групп полипептидного остова. Спектры КД зависят от асимметрии окружения пептидных групп, что позволяет определить наличие в белке элементов вторичной структуры,  $\alpha$ -спиралей,  $\beta$ -слоёв и неупорядоченных участков, и их соотношение.

Спектры кругового дихроизма снимали на КД-спектрометре «CHIRASCAN» («Applied Photophysics Ltd.», Великобритания) при длинах волн 190-260нм в кювете с длиной оптического пути 0,01см при температуре 25°C.

### *5.2.13 Термофлюориметрия*

Данный метод позволяет тестировать влияние буферных условий и различных добавок на стабильность белка, оценка которой осуществляется по температуре плавления [162]. Следили за возгоранием флуорофора SYPRO Orange (возбуждение 473нм, эмиссия 570нм) при связывании гидрофобных участков белка при термической денатурации. Кривые термической денатурации были получены на приборе CFX96TM Real-Time System с использованием программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager. Для эксперимента использовались 96-луночные плашки для RT ПЦР. Объем раствора в каждой ячейке плашки составлял 25 мкл. В ячейки плашки раскапывали по 21 мкл тестируемых буферов и добавок (или 21 мкл воды в контрольном эксперименте), затем добавляли по 2 мкл раствора белка (до конечной концентрации 0,16 мг/мл), затем в ячейки добавляли по 2 мкл флуоресцентного красителя Sypro Orange, разбавленного водой в 125 раз. Плашку центрифугировали 30 секунд при 5000g и нагревали в автоматическом режиме от 5 до 95°C, скорость нагрева один градус в минуту. Кривые денатурации обрабатывали с помощью программы Prizm.

### *5.2.14 Динамическое светорассеяние*

Измерения проводились на приборе Wyatt DynaPro NanoStar DLS при температуре 19°C. Значение %полидисперсности менее 15% говорит о монодисперсности образца. Для каждого пика также рассчитывается размер частиц (нм), молекулярная масса (кДа), %массы – процент частиц данного



размера по массе (100% означает наличие популяции частиц одного размера или 1 пика на графике), %интенсивности – процент частиц данного размера по интенсивности (100% означает наличие популяции частиц одного размера или 1 пика на графике).

#### 5.2.15 Биоинформатический анализ

Аминокислотные последовательности TERT *H. polymorpha* и других организмов брали из базы данных UniProtKB (<http://www.uniprot.org/help/uniprotkb>). Для множественного выравнивания последовательностей использовали программу ClustalW, Clustal Omega или сервиса T-Coffee [143], для поиска гомологичных последовательностей в базе данных – программу BLAST, для расчета масс и pI – программу ProtParam на сервере ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>).

Предсказание свойств белков (возможность экспрессии, очистки, кристаллизуемости белкового материала) по их аминокислотной последовательности проводили с помощью сервера PPCPred (<http://biomine.cs.vcu.edu/servers/PPCPred/>) [163]. Сервер анализирует и рассчитывает индексы гидрофобности, соотношение упорядоченных и неупорядоченных участков цепи, содержание скрытых гидрофильных и экспонированных гидрофобных остатков, наличие химически нестабильных остатков и на основе этого анализа моделирует вероятные свойства белка при его экспрессии и очистке. Для анализа экспрессии использовали тагированные с N-конца последовательности, для анализа стабильности и кристаллизуемости – последовательности без аффинного тага.

Предсказание кристаллизуемости белков по их последовательности проводили с помощью сервера XtalPred (<http://ffas.burnham.org/XtalPred/cgi/xtal.pl>) [164]. Сервер рассчитывает индекс нестабильности, относительное содержание и длину разупорядоченных участков, pI и др., сравнивает их с аналогичными значениями из базы данных и по эмпирическому распределению

этих параметров выводит одно значение – класс кристаллизуемости от 1 (оптимален для кристаллизации) до 5 (очень трудно кристаллизуется).

## 6. Список литературы

1. Hayflick L. Mortality and immortality at the cellular level. A review. // *Biochemistry*. – 1997. – V. 62. – №.11. – P. 1180-1190.
2. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. // *Science*. – 1994. – V. 266. – № 5193. – P. 2011-2015.
3. Popli DB, Sircar K, Chowdhry A. Telomerase: An exploration toward the end of cancer // *Indian J Dent Res*. – 2017. – V. 28 – № 5. – P. 574-584.
4. Kailashiya C, Sharma HB, Kailashiya J. Telomerase based anticancer immunotherapy and vaccines approaches. // *Vaccine*. – 2017. – V. 35 – № 43. – P. 5768-5775.
5. Sauerwald A, Sandin S, Cristofari G, Scheres SH, Lingner J, Rhodes D. Structure of active dimeric human telomerase. // *Nat Struct Mol Biol*. – 2013. – V. 20 – № 4. – P. 454-460.
6. Gillis A.J., Schuller A.P., Skordalakes E. Structure of the *Tribolium castaneum* telomerase catalytic subunit TERT. // *Nature*. – 2008. – V. 455. – P. 633-637.
7. Jacobs SA, Podell ER, Cech TR. Crystal structure of the essential N-terminal domain of telomerase reverse transcriptase. // *Nat Struct Mol Biol*. – 2006. – V. 13 – № 3. – P. 218-225.
8. Greider CW, Blackburn EH. The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. // *Cell*. – 1987. – V. 51. – № 6. – P. 887-898.
9. Zahler AM, Prescott DM. Telomere terminal transferase activity in the hypotrichous ciliate *Oxytricha nova* and a model for replication of the

- ends of linear DNA molecules. // *Nucleic Acids Res.* – 1988. – V. 16. – P. 6953–6972.
10. Shippen-Lentz D, Blackburn EH. Telomere terminal transferase activity from *Euplotes crassus* adds large numbers of TTTTGGGG repeats onto telomeric primers. // *Mol. Cell. Biol.* – 1989. – V. 9. – P. 2761–2764.
  11. Morin GB. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. // *Cell.* – 1989. – V. 59. – P. 521–529.
  12. Lingner J, Cech TR, Hughes TR, Lundblad V. Three Ever Shorter Telomere (EST) genes are dispensable for in vitro yeast telomerase activity // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1997. – V. 94. – № 21. – P. 11190–11195.
  13. Blackburn EH, Collins K. Telomerase: an RNP enzyme synthesizes DNA. // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2011. – V. 3– № 5. – P. a003558.
  14. Chen LY, Redon S, Lingner J. The human CST complex is a terminator of telomerase activity // *Nature.* – 2012. – V. 488. – P. 540-544.
  15. Wu RA, Upton HE, Vogan JM, Collins K. Telomerase mechanism of telomere synthesis // *Annu Rev Biochem.* – 2017. – V. 86. – P. 4.1-4.22.
  16. Armanios M, Blackburn EH. The telomere syndromes // *Nat Rev Genet.* – 2012. – V. 13. – P. 693-704.
  17. Jafri MA, Ansari SA, Alqahtani MH, Shay JW. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. // *Genome Med.* – 2016. – V. 8. – № 1. – P. 69.
  18. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of life-span by

- introduction of telomerase into normal human cells. // *Science*. – 1998. – V. 279. – № 5349. – P. 349-352.
19. Blackburn EH. Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. // *FEBS Lett*. – 2005. – V. 579– № 4. – P. 859-862.
20. Cech TR. Beginning to understand the end of the chromosome. // *Cell*. – 2004. – V. 116– № 2. – P. 273-279.
21. Greider CW. Telomerase is processive. // *Mol Cell Biol*. – 1991. – V. 11. – № 9. – P. 4572-4580.
22. Lendvay TS, Morris DK, Sah J, Balasubramanian B, Lundblad V. Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication identify three additional EST genes. // *Genetics*. – 1996. – V. 144. – № 4. – P. 1399-1412.
23. Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. // *Science*. – 1997. – V. 276. – P. 561–567.
24. Bryan TM, Sperger JM, Chapman KB, Cech TR. Telomerase reverse transcriptase genes identified in *Tetrahymena*. // *Proc. Natl. Acad. Sci*. – 1998. – V. 95 – № 15. – P. 8479-8484.
25. Podlevsky JD, Bley CJ, Omana RV, Qi X, Chen JJ. The telomerase database. // *Nucleic Acids Res*. – 2008. – V. 36. – P. D339–43.
26. Lingner J., Hughes T.R., Shevchenko A., Mann M., Lundblad V., Cech T.R. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. // *Science*. – 1997. – V. 276. – № 5321. – P. 561–567.
27. Harrington L., Zhou W., McPhail T., Oulton R., Yeung D.S., Mar V., Bass

- M.B., Robinson M.O. Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits. // *Genes Dev.* – 1997. – V. 11. – P. 3109–3115.
28. Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, Harley CB, Cech TR. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. // *Science.* – 1997. – V. 277. – № 5328. – P. 955-959.
29. Collins K., Gandhi L. The reverse transcriptase component of the *Tetrahymena* telomerase ribonucleoprotein complex. // *Proc. Natl Acad. Sci.* – 1998. – V. 95. – № 15. – P. 8485–8490.
30. Weinrich SL, Pruzan R, Ma L, Ouellette M, Tesmer VM, Holt SE, Bodnar AG, Lichtsteiner S, Kim NW, Trager JB, Taylor RD, Carlos R, Andrews WH, Wright WE, Shay JW, Harley CB, Morin GB. Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTRT. // *Nat Genet.* – 1997. – V. 17. – № 4. – P. 498-502.
31. Beattie TL, Zhou W, Robinson MO, Harrington L. Reconstitution of human telomerase activity in vitro. // *Curr Biol.* – 1998. – V. 8. – № 3. – P. 177-180.
32. Lue NF, Lin YC, Mian IS. A conserved telomerase motif within the catalytic domain of telomerase reverse transcriptase is specifically required for repeat addition processivity. // *Mol. Cell Biol.* – 2003. – V. 23. – P. 8440–8449.
33. Xie M, Podlevsky JD, Qi X, Bley CJ, Chen JJ. A novel motif in telomerase reverse transcriptase regulates telomere repeat addition rate and processivity. // *Nucleic Acids Res.* – 2010. – V. 38. – P. 1982–1996.

34. Friedman KL, Cech TR. Essential functions of amino-terminal domains in the yeast telomerase catalytic subunit revealed by selection for viable mutants. // *Genes Dev.* – 1999. – V. 13. – P. 2863–2874.
35. Robart AR, Collins K. Human telomerase domain interactions capture DNA for TEN domain-dependent processive elongation. // *Mol. Cell.* – 2011. – V. 42. – P. 308–318.
36. Malik H.S., Burke W.D., Eickbush T.H. Putative telomerase catalytic subunits from *Giardia lamblia* and *Caenorhabditis elegans*. // *Gene.* – 2000. – V. 251. – P. 101–108.
37. Meier B, Clejan I, Liu Y, Lowden M, Gartner A, Hodgkin J, Ahmed S. *trt-1* Is the *Caenorhabditis elegans* Catalytic Subunit of Telomerase // *PLoS Genet.* – 2006. – V. 2. – № 2. – P. e18.
38. Mitchell M, Gillis A, Futahashi M, Fujiwara H, Skordalakes E. Structural basis for telomerase catalytic subunit TERT binding to RNA template and telomeric DNA. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2010. – V. 17. – P. 513–518.
39. Sarafianos SG, Das K, Tantillo C, Clark AD Jr, Ding J, Whitcomb JM, Boyer PL, Hughes SH, Arnold E. Crystal structure of HIV-1 reverse transcriptase in complex with a polypurine tract RNA:DNA. // *EMBO J.* – 2001. – V. 20. – P. 1449–1461.
40. Sasaki T., Fujiwara H. Detection and distribution patterns of telomerase activity in insects. // *European Journal of Biochemistry.* – 2000. – V. 267. – P. 3025-3031.
41. Fujiwara H. Accumulation of Telomeric-Repeat-Specific Retrotransposons in Subtelomeres of *Bombyx mori* and *Tribolium castaneum* // *Subtelomeres.* – Ed. by Becker MM Louis EJ. Springer, Berlin, Heidelberg. – 2014. – P. 227-241.

42. Pardue ML, DeBaryshe PG. *Drosophila* Telomeres: A Variation on the Telomerase Theme // *Fly*. – 2008. – V. 2. – № 3. – P. 101-110.
43. Jurczyk J, Nouwens AS, Holien JK, Adams TE, Lovrecz GO, Parker MW, Cohen SB, Bryan TM. Direct involvement of the TEN domain at the active site of human telomerase. // *Nucleic Acids Res*. – 2011. – V. 39. – P. 1774-1788.
44. Armbruster BN, Banik SS, Guo C, Smith AC, Counter CM. N-terminal domains of the human telomerase catalytic subunit required for enzyme activity in vivo. // *Mol Cell Biol*. – 2001. – V. 21. – № 22. – P. 7775-7786.
45. Zaug AJ, Podell ER, Nandakumar J, Cech TR. Functional interaction between telomere protein TPP1 and telomerase. // *Gene Dev*. – 2010. – V. 24. – P. 613-622.
46. Wang, F, Podell ER, Zaug AJ, Yang YT, Baciú P, Cech TR, Lei M. The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. // *Nature*. – 2007. – V. 445. – P. 506-510.
47. Latrick CM, Cech TR. POT1-TPP1 enhances telomerase processivity by slowing primer dissociation and aiding translocation. // *The EMBO Journal*. – 2010. – V. 29. – P. 924-933.
48. Zhong FL, Batista LFZ, Freund A, Pech MF, Venteicher AS, Artandi SE. TPP1 OB-Fold Domain Controls Telomere Maintenance by Recruiting Telomerase to Chromosome Ends. // *Cell*. – 2012. – V. 150. – P. 481-494.
49. Bairley RCB, Guillaume G, Vega LR, Friedman KL. A mutation in the catalytic subunit of yeast telomerase alters primer-template alignment while promoting processivity and protein-DNA binding // *J Cell Sci*. – 2011. – V. 124. – № 24. – P. 4241-4252.
50. Lue NF, Li Z. Modeling and structure function analysis of the putative



- anchor site of yeast telomerase // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – V. 35. – № 15. – P. 5213–5222.
51. Yen WF, Chico L, Lei M, Lue NF. Telomerase regulatory subunit Est3 in two *Candida* species physically interacts with the TEN domain of TERT and telomeric DNA // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2011. – V. 108. – №51. – P. 20370-20375.
52. Sharanov YS, Zvereva MI, Dontsova OA. *Saccharomyces cerevisiae* telomerase subunit Est3p binds DNA and RNA and stimulates unwinding of RNA/DNA heteroduplexes. // *FEBS Lett.* – V. 580. – №19. – 2006. – P. 4683-4690.
53. Jacobs SA, Podell ER, Wuttke DS, Cech TR. Soluble domains of telomerase reverse transcriptase identified by high-throughput screening. // *Protein Sci.* – 2005. – V. 14. – P. 2051-2058.
54. Eckert B., Collins K. Roles of Telomerase Reverse Transcriptase N-terminal Domain in Assembly and Activity of *Tetrahymena* Telomerase Holoenzyme. // *J Biol Chem.* – 2012. – V. 287. – P. 12805-12814.
55. Akiyama BM, Parks JW, Stone MD. The telomerase essential N-terminal domain promotes DNA synthesis by stabilizing short RNA-DNA hybrids. // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – V. 43. – P. 5537-5549.
56. Lai CK, Mitchell JR, Collins K. RNA binding domain of telomerase reverse transcriptase // *Mol. Cell. Biol.* – 2001. – P. 990-1000.
57. Cunningham DD, Collins K. Biological and biochemical functions of RNA in the *tetrahymena* telomerase holoenzyme. // *Mol Cell Biol.* – 2005. – V. 25. – №11. – P. 4442-4454.
58. Akiyama BM, Gomez A, Stone MD. A conserved motif in *Tetrahymena thermophila* telomerase reverse transcriptase is proximal to the RNA

- template and is essential for boundary definition. // *J Biol Chem.* – 2013. – V. 288. – №30. – P. 22141-22149.
- 59.Rouda S, Skordalakes E. Structure of the RNA-Binding Domain of Telomerase: Implications for RNA Recognition and Binding. // *Structure.* – 2007. – V. 15. – P. 1403-1412.
- 60.O'Connor, C.M., Lai, C.K., Collins K. Two purified domains of telomerase reverse transcriptase reconstitute sequence-specific interactions with RNA. // *J. Biol. Chem.* – 2005. – V. 280. – P. 17533–17539.
- 61.Harkisheimer M, Mason M, Shuvaeva E, Skordalakes E. A Motif in the Vertebrate Telomerase N-terminal Linker of TERT Contributes to RNA Binding and Telomerase Activity and Processivity // *Structure.* – 2013. – V. 21. – P. 1870-1878.
- 62.Bley CJ, Qi X, Rand DP, Borges CR, Nelson RW, Chen JJ. RNA-protein binding interface in the telomerase ribonucleoprotein. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2011. – V. 08. – №51. – P. 20333-20338.
- 63.Moriarty TJ, Huard S, Dupuis S, Autexier C. Functional multimerization of human telomerase requires an RNA interaction domain in the N terminus of the catalytic subunit. // *Mol Cell Biol.* – 2002. – V. 22. – №4. – P. 1253-1265.
- 64.Huang J, Brown AF, Wu J, Xue J, Bley CJ, Rand DP, Wu L, Zhang R, Chen JJ, Lei M. Structural basis for protein-RNA recognition in telomerase. // *Nat.Struct.Mol.Biol.* – V. 21. – 2014. – P. 507-512.
- 65.Jansson LI, Akiyama BM, Ooms A, Lu C, Rubin SM, Stone MD. Structural Basis of Template Boundary Definition in Tetrahymena Telomerase. // *Nat Struct Mol Biol.* – 2015. – V. 22. – №11. – P. 883–888.
- 66.Mitchell JR, Collins K. Human telomerase activation requires two

- independent interactions between telomerase RNA and telomerase reverse transcriptase. // *Mol Cell*. – 2000. – V. 6. – №2. – P. 361-371.
67. Chen JL, Opperman KK, Greider CW. A critical stem-loop structure in the CR4-CR5 domain of mammalian telomerase RNA. // *Nucleic Acids Res*. – 2002. – V. 30. – №2. – P. 592-597.
68. Brown Y, Abraham M, Pearl S, Kabaha MM, Elboher E, Tzfati Y. A critical three-way junction is conserved in budding yeast and vertebrate telomerase RNAs. // *Nucleic Acids Res*. – 2007. – V. 35. – №18. – P. 6280-6289.
69. Chen JL, Greider CW. Template boundary definition in mammalian telomerase. // *Genes Dev*. – 2003. – V. 17. – P. 2747-2752.
70. Di Marco S, Volpari C, Tomei L, Altamura S, Harper S, Narjes F, Koch U, Rowley M, De Francesco R, Migliaccio G, Carfi A. Interdomain communication in hepatitis C virus polymerase abolished by small molecule inhibitors bound to a novel allosteric site. // *J. Biol. Chem*. – 2005. – V. 280. – P. 29765–29770.
71. Wang J, Sattar AK, Wang CC, Karam JD, Konigsberg WH, Steitz TA. Crystal structure of a pol  $\alpha$  family replication DNA polymerase from bacteriophage RB69. // *Cell*. – 1997. – V. 89. – P. 1087–1099.
72. Chu TW, MacNeil DE, Autexier C. Multiple mechanisms contribute to the cell growth defects imparted by human telomerase insertion in fingers domain mutations associated with premature aging diseases // *J Biol Chem*. – 2016. – V. 291. – P. 8374-8386.
73. Chu TW, D'Souza Y, Autexier C. The insertion in fingers domain in human telomerase can mediate enzyme processivity and telomerase recruitment to telomeres in a TPP1-dependent manner // *Mol Cell Biol*. –

2016. – V. 36. – P. 210-222.
74. Bosoy D, Lue NF. Functional analysis of conserved residues in the putative “finger” domain of telomerase reverse transcriptase. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – P. 46305–46312.
75. Hossain S, Singh S, Lue NF. Functional analysis of the C-terminal extension of telomerase reverse transcriptase. A putative “thumb” domain. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – P. 36174–36180.
76. Huard S, Moriarty TJ, Autexier C. The C terminus of the human telomerase reverse transcriptase is a determinant of enzyme processivity. // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – V. 31. – P. 4059–4070.
77. Banik SS, Guo C, Smith AC, Margolis SS, Richardson DA, Tirado CA, Counter CM. C-terminal regions of the human telomerase catalytic subunit essential for in vivo enzyme activity. // *Mol. Cell. Biol.* – 2002. – V. 22. – P. 6234–6246.
78. Forstemann K, Lingner J. Telomerase limits the extent of base pairing between template RNA and telomeric DNA. // *EMBO Rep.* – V. 6. – 2005. – P. 361–366.
79. Hoffman H, Rice C, Skordalakes E. Structural analysis reveals the deleterious effects of telomerase mutations in bone marrow failure syndromes // *J Biol Chem.* – V. 292. – 2017. – P. 4593-4601.
80. Greider CW, Blackburn EH. A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. // *Nature.* – 1989. – V. 337. – №6205. – P. 331-337.
81. Kachouri-Lafond R, Dujon B, Gilson E, Westhof E, Fairhead C, Teixeira MT. Large telomerase RNA, telomere length heterogeneity and escape from senescence in *Candida glabrata*. // *FEBS Lett.* – 2009. – V. 583. –

- №22. – P. 3605-3610.
- 82.Ueda CT, Roberts RW. Analysis of a long-range interaction between conserved domains of human telomerase RNA. // RNA. – 2004. – V. 10. – №1. – P. 139-147.
- 83.Podlevsky JD, Chen JLL. Evolutionary perspectives of telomerase RNA structure and function. // RNA Biol. – 2016. – V. 13. – №8. – P. 720–732.
- 84.Qi X, Li Y, Honda S, Hoffmann S, Marz M, Mosig A, Podlevsky JD, Stadler PF, Selker EU, Chen JJ-L. The common ancestral core of vertebrate and fungal telomerase RNAs. // Nucleic Acids Res. – 2013. – V. 41. – P. 450-462.
- 85.Drosopoulos WC, Drenzo R, Prasad VR. Human telomerase RNA template sequence is a determinant of telomere repeat extension rate. // J Biol Chem. – V. 280. – №38. – 2005. – P. 32801-32810.
- 86.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. – V. 19. – №11. – P. 1563-1574.
- 87.Podlevsky JD, Li Y, Chen JJ. The functional requirement of two structural domains within telomerase RNA emerged early in eukaryotes. // Nucleic Acids Res. – 2016. – V. 44. – №20. – P. 9891-9901.
- 88.Shefer K, Brown Y, Gorkovoy V, Nussbaum T, Ulyanov NB, Tzfati Y. A triple helix within a pseudoknot is a conserved and essential element of telomerase RNA. // Mol Cell Biol. – 2007. – V. 27. – №6. – P. 2130-2143.
- 89.Theimer CA, Blois CA, Feigon J. Structure of the Human Telomerase RNA Pseudoknot Reveals Conserved Tertiary Interactions Essential for

- Function // *Mol Cell*. – 2005. – V. 17. – №5. – P. 671-826.
90. Wang Y, Yesselman JD, Zhang Q, Kang M, Feigon J. Structural conservation in the template/pseudoknot domain of vertebrate telomerase RNA from teleost fish to human // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2016. – V. 113. – №35. – P. E5125–E5134.
91. Cash DD, Cohen-Zontag O, Kim NK, Shefer K, Brown Y, Ulyanov NB, Tzfati Y, Feigon J. Pyrimidine motif triple helix in the *Kluyveromyces lactis* telomerase RNA pseudoknot is essential for function in vivo. // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2013. – V. 110. – №27. – P. 10970–10975.
92. Kuprys PV, Davis SM, Hauer TM, Meltser M, Tzfati Y, Kirk KE. Identification of telomerase RNAs from filamentous fungi reveals conservation with vertebrates and yeasts. // *PLoS One*. – 2013. – V. 8. – №3. – P. e58661.
93. Mason DX, Goneska E, Greider CW. Stem-loop IV of tetrahymena telomerase RNA stimulates processivity in trans. // *Mol Cell Biol*. – 2003. – V. 23. – №16. – P. 5606-5613.
94. Zappulla DC, Goodrich K, Cech TR. A miniature yeast telomerase RNA functions in vivo and reconstitutes activity in vitro. // *Nat. Struct. Mol. Biol*. – 2005. – V. 12. – P. 1072–77.
95. Webb CJ, Zakian VA. Telomerase RNA stem terminus element affects template boundary element function, telomere sequence, and shelterin binding. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2015. – V. 112. – №36. – P. 11312-11317.
96. Zappulla DC, Cech TR. Yeast telomerase RNA: a flexible scaffold for protein subunits. // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2004. – V. 101. – №27. – P. 10024-10029.

97. Jiang J, Chan H, Cash DD, Miracco EJ, Ogorzalek Loo RR, Upton HE, Cascio D, O'Brien Johnson R, Collins K, Loo JA, Zhou ZH, Feigon J. Structure of Tetrahymena telomerase reveals previously unknown subunits, functions, and interactions // *Science*. – 2015. – V. 350. – №6260. – P. aab4070.
98. Feigon J, Chan H, Jiang J. Integrative structural biology of Tetrahymena telomerase — insights into catalytic mechanism and interaction at telomeres // *FEBS J*. – 2016. – V. 283. – P. 2044-2050.
99. Upton HE, Hong K, Collins K. Direct Single-Stranded DNA Binding by Teb1 Mediates the Recruitment of Tetrahymena thermophila Telomerase to Telomeres // *Mol Cell Biol*. – 2014. – V. 34. – №22. – P. 4200–4212.
100. Zeng Z, Min B, Huang J, Hong K, Yang Y, Collins K, Lei M. Structural basis for Tetrahymena telomerase processivity factor Teb1 binding to single-stranded telomeric-repeat DNA. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2011. – V. 108. – №51. – P. 20357-20361.
101. Wan B, Tang T, Upton H, Shuai J, Zhou Y, Li S, Chen J, Brunzelle JS, Zeng Z, Collins K, Wu J, Lei M. The Tetrahymena telomerase p75-p45-p19 subcomplex is a unique CST complex. // *Nat Struct Mol Biol*. – 2015. – V. 22. – №12. – P. 1023-1026.
102. Schmidt JC, Cech TR. Human telomerase: biogenesis, trafficking, recruitment, and activation // *Genes Dev*. – 2015. – V. 29. – №11. – P. 1095–1105.
103. Chen LY, Lingner J. CST for the grand finale of telomere replication. // *Nucleus*. – 2013. – V. 4. – №4. – P. 277-282.
104. Lewis KA, Wuttke DS. Telomerase and telomere-associated proteins: Structural insights into mechanism and evolution // *Structure*. –

2012. – V. 20. – №1. – P. 28–39.
105. Horvath MP, Schweiker VL, Bevilacqua JM, Ruggles JA, Schultz SC. Crystal structure of the *Oxytricha nova* telomere end binding protein complexed with single strand DNA. // *Cell*. – 1998. – V. 95. – P. 963–974.
106. Chen C, Gu P, Wu J, Chen X, Niu S, Sun H, Wu L, Li N, Peng J, Shi S, Fan C, Huang M, Wong CC, Gong Q, Kumar-Sinha C, Zhang R, Pusztai L, Rai R, Chang S, Lei M. Structural insights into POT1–TPP1 interaction and POT1 C-terminal mutations in human cancer // *Nat Commun*. – 2017. – P. 14929.
107. Rice C, Shastrula PK, Kossenkov AV, Hills R, Baird DM, Showe LC, Doukov T, Janicki S, Skordalakes E. Structural and functional analysis of the human POT1–TPP1 telomeric complex // *Nat Commun*. – V. 8. – 2017. – P. 14928.
108. Bisht K, Smith EM, Tesmer VM, Nandakumar J. Structural and functional consequences of a disease mutation in the telomere protein TPP1 // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2016. – V. 113. – P. 13021-13026.
109. Singer MS, Gottschling DE. TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. // *Science*. – 1994. – V. 266. – №5184. – P. 404-409.
110. Gao H, Cervantes RB, Mandell EK, Otero JH, Lundblad V. RPA-like proteins mediate yeast telomere function. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2007. – V. 14. – P. 208– 214.
111. Malyavko AN, Parfenova YY, Zvereva MI, Dontsova OA. Telomere length regulation in budding yeasts. // *FEBS Letters*. – 2014. – V. 588. – №15. – P. 2530–2536.
112. Tucey TM, Lundblad V. A Yeast Telomerase Complex Containing



- the Est1 Recruitment Protein Is Assembled Early in the Cell Cycle. // *Biochemistry*. – 2013. – V. 52. – №7. – P. 1131-1133.
113. Wu Y, Zakian VA. The telomeric Cdc13 protein interacts directly with the telomerase subunit Est1 to bring it to telomeric DNA ends in vitro. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2011. – V. 108. – №51. – P. 20362-20369.
114. Webb CJ, Zakian VA. *Schizosaccharomyces pombe* Ccq1 and TER1 bind the 14-3-3-like domain of Est1, which promotes and stabilizes telomerase-telomere association. // *Genes Dev*. – 2012. – V. 26. – №1. – P. 82-91.
115. Singh SM, Lue NF. Ever shorter telomere 1 (EST1)-dependent reverse transcription by *Candida* telomerase in vitro: evidence in support of an activating function. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2003. – V. 100. – №10. – P. 5718-5723.
116. Evans SK, Lundblad V. Est1 and Cdc13 as comediators of telomerase access. // *Science*. – 1999. – V. 286. – №5437. – P. 117-120.
117. Zhang ML, Tong XJ, Fu XH, Zhou BO, Wang J, Liao XH, Li QJ, Shen N, Ding J, Zhou J Q. Yeast telomerase subunit Est1p has guanine quadruplex-promoting activity that is required for telomere elongation. // *Nat Struct Mol Biol*. – 2010. – V. 17. – №2. – P. 202-209.
118. Tuzon CT, Wu Y, Chan A, Zakian VA. The *Saccharomyces cerevisiae* telomerase subunit Est3 binds telomeres in a cell cycle- and Est1-dependent manner and interacts directly with Est1 in vitro. // *PLoS Genet*. – 2011. – V. 7. – №5. – P. e1002060.
119. Friedman KL, Heit JJ, Long DM, Cech TR. N-terminal domain of yeast telomerase reverse transcriptase: recruitment of Est3p to the

- telomerase complex. // *Mol Biol Cell*. – 2003. – V. 14. – №1. – P. 1-13.
120. Talley JM, DeZwaan DC, Maness LD, Freeman BC, Friedman KL. Stimulation of yeast telomerase activity by the ever shorter telomere 3 (Est3) subunit is dependent on direct interaction with the catalytic protein Est2. // *J Biol Chem*. – 2011. – V. 286. – №30. – P. 26431-26439.
121. Tucey TM, Lundblad V. Regulated assembly and disassembly of the yeast telomerase quaternary complex. // *Gene Dev*. – 2014. – V. 28 . – №19. – P. 2077-2089.
122. Rao T, Lubin JW, Armstrong GS, Tucey TM, Lundblad V, Wuttke DS. Structure of Est3 reveals a bimodal surface with differential roles in telomere replication. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2014. – V. 111. – №1. – P. 214-218.
123. Lee J, Mandell EK, Tucey TM, Morris DK, Lundblad V. The Est3 protein associates with yeast telomerase through an OB-fold domain. // *Nature structural molecular biology*. – 2008. – V. 15. – №9. – P. 990-997.
124. Young Yu E, Wang F, Lei M, Lue NF. A proposed OB-fold with a protein-interaction surface in *Candida albicans* telomerase protein Est3. // *Nature structural molecular biology*. – 2008. – V. 15. – №9. – P. 985-989.
125. Nandakumar J, Bell CF, Weidenfeld I, Zaug AJ, Leinwand LA, Cech TR. The TEL patch of telomere protein TPP1 mediates telomerase recruitment and processivity. // *Nature*. – 2012. – V. 492. – №7428. – P. 285-289.
126. Schmidt JC, Dalby AB, Cech TR. Identification of human TERT elements necessary for telomerase recruitment to telomeres. // *Elife*. – 2014. – P. 3.
127. Kocak H, Ballew BJ, Bisht K, Eggebeen R, Hicks BD, Suman S,

- O'Neil A, Giri N, Laboratory NDCGR, Group NDCSW, Maillard I, Alter BP, Keegan CE, Nandakumar J, Savage SA. Hoyeraal-Hreidarsson syndrome caused by a germline mutation in the TEL patch of the telomere protein TPP1. // *Gene Dev.* – 2014. – V. 28. – №19. – P. 2090-2102.
128. Barthel FP, Wei W, Tang M, Martinez-Ledesma E, Hu X, Amin SB, Akdemir KC, Seth S, Song X, Wang Q, Lichtenberg T, Hu J, Zhang J, Zheng S, Verhaak RG. Systematic analysis of telomere length and somatic alterations in 31 cancer types // *Nature Genetics.* – 2017. – V. 49. – P. 349–357.
129. Chan H, Wang Y, Feigon J. Progress in human and Tetrahymena telomerase structure. // *Annu. Rev. Biophys.* – 2017. – V. 46. – P. 199–225.
130. Ravin NV, Eldarov MA, Kadnikov VV, Beletsky AV, Schneider J, Mardanova ES, Smekalova EM, Zvereva MI, Dontsova OA, Mardanov AV, Skryabin KG. Genome sequence and analysis of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL1 // *BMC Genomics.* – 2013. – V. 14. – P. 837.
131. Sohn JH, Choi ES, Kang HA, Rhee JS, Rhee SK. A family of telomere-associated autonomously replicating sequences and their functions in targeted recombination in *Hansenula polymorpha* DL-1. // *J Bacteriol.* – 1999. – V. 181. – P. 1005-1013.
132. Eldarov MA, Mardanov AV, Beletsky AV, Ravin NV, Skryabin KG. Complete sequence and analysis of the mitochondrial genome of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL-1. // *FEMS Yeast Res.* – 2011. – V. 11. – P. 464-472.
133. Ramezani-Rad M, Hollenberg CP, Lauber J, Wedler H, Griess E, Wagner C, Albermann K, Hani J, Piontek M, Dahlems U, Gellissen G. The *Hansenula polymorpha* (strain CBS4732) genome sequencing and

- analysis. // *FEMS Yeast Res.* – 2003. – V. 4. – №2. – P. 207-215.
134. Смекалова ЕМ. Идентификация и изучение функциональных особенностей новой теломеразы дрожжей. // Диссертация на соискание учёной степени кандидата химических наук, МГУ, Москва. – 2012.
135. Smekalova EM, Petrova OA, Zvereva MI, Dontsova OA. *Hansenula Polymorpha* TERT: A Telomerase Catalytic Subunit Isolated in Recombinant Form with Limited Reverse Transcriptase Activity. // *Acta Naturae.* – V. 4. – 2012. – P. 70-73.
136. Петрова ОА. Разработка системы реконструкции теломеразы *in vitro*. // Дипломная работа, МГУ, Москва. – 2009.
137. Парфёнова ЮЮ. Поиск функции белка Est3 в работе теломеразного комплекса дрожжей *Hansenula polymorpha*. // Дипломная работа, МГУ, Москва. – 2014.
138. Blatch GL, Lässle M. The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. // *Bioessays.* – 1999. – V. 21. – №11. – P. 932-939.
139. Sealey DC, Kostic AD, LeBel C, Pryde F, Harrington L. The TPR-containing domain within Est1 homologs exhibits species-specific roles in telomerase interaction and telomere length homeostasis. // *BMC Mol Biol.* – 2011. – V. 12. – P. 45.
140. Livengood AJ, Zaugg AJ, Cech TR. Essential regions of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase RNA: separate elements for Est1p and Est2p interaction. // *Mol Cell Biol.* – 2002. – V. 22. – №7. – P. 2366-2374.
141. Finn RD, Coghill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Mistry J, Mitchell AL,

- Potter SC, Punta M, Qureshi M, Sangrador-Vegas A, Salazar GA, Tate J, Bateman A. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – V. 44. – №D1. – P. D279-85.
142. Petrova OA, Smekalova EM, Zvereva ME, Lamzin V, Dontsova OA. Identification of additional telomerase component of the yeast *Hansenula polymorpha* is a step towards understanding the complex at the atomic level. // *Doklady Biochemistry and Biophysics.* – 2014. – V. 455. – №1. – P. 59-64.
143. Di Tommaso P, Moretti S, Xenarios I, Orobitz M, Montanyola A, Chang JM, Taly JF, Notredame C. T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – V. 39(Web Server issue). – P. W13-17.
144. Mariasina SS, Efimov SV, Petrova OA, Rodina EV, Malyavko AN, Zvereva MI, Klochkov VV, Dontsova OA, Polshakov VI. Chemical shift assignments and the secondary structure of the Est3 telomerase subunit in the yeast *Hansenula polymorpha*. // *Biomol NMR Assign.* – 2017. – P. 1-6.
145. Flynn RL, Zou L. Oligonucleotide/Oligosaccharide-Binding (OB) Fold Proteins: A Growing Family of Genome Guardians // *Crit Rev Biochem Mol Biol.* – 2010. – V. 45. – №4. – P. 266–275.
146. Чугунова АА. Доменная организация каталитической субъединицы теломеразы *Hansenula polymorpha* как основа для структурных исследований // *Дипломная работа, МГУ, Москва.* – 2014.
147. Зверева МЭ, Петрова ОА, Парфенова ЮВ, Смекалова ЕМ,

- Малявко АН, Родина ЕВ, Каллио И, Хакенберг К, Вигенс Т, Ламзин ВС, Донцова ОА. На пути к атомной структуре компонентов теломеразного комплекса с целью создания регуляторов контроля развития раковых клеток // Вестник РФФИ. – 2013. – V. 4. – №80. – P. 33-37.
148. Petrova OA, Mantsyzov AB, Rodina EV, Efimov SV, Hackenberg C, Hakanpää J, Klochkov VV, Lebedev AA, Chugunova AA, Malyavko AN, Zatsepin TS, Mishin AV, Zvereva MI, Lamzin VS, Dontsova OA, Polshakov VI. Structure and function of the N-terminal domain of the yeast telomerase reverse transcriptase. // *Nucleic Acids Research*. – 2017. – V. 46. – №3. – P. 1525-1540.
149. Polshakov VI, Petrova OA, Parfenova YY, Efimov SV, Klochkov VV, Zvereva MI, Dontsova OA. NMR assignments of the N-terminal domain of *Ogataea polymorpha* telomerase reverse transcriptase. // *Biomol NMR Assign*. – 2016. – V. 10. – №1. – P. 183-187.
150. Jiang J, Miracco EJ, Hong K, Eckert B, Chan H, Cash DD, Min B, Zhou ZH, Collins K, Feigon J. The architecture of *Tetrahymena* telomerase holoenzyme. // *Nature*. – 2013. – V. 496. – P. 187–192.
151. Hong K, Upton H, Miracco EJ, Jiang J, Zhou ZH, Feigon J, Collins K. *Tetrahymena* Telomerase Holoenzyme Assembly, Activation, and Inhibition by Domains of the p50 Central Hub. // *Mol. Cell Biol*. – 2013. – V. 33. – P. 3962–3971.
152. Romi E, Baran N, Gantman M, Shmoish M, Min B, Collins K, Manor H. High-resolution physical and functional mapping of the template adjacent DNA binding site in catalytically active telomerase. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2007. – V. 104. – P. 8791–8796.
153. Wyatt HDM, Lobb DA, Beattie TL. Characterization of physical

- and functional anchor site interactions in human telomerase. // *Mol. Cell Biol.* – V. 27. – 2007. – P. 3226–3240.
154. Wu RA, Collins K. Human telomerase specialization for repeat synthesis by unique handling of primer-template duplex. // *EMBO J.* – 2014. – V. 33. – P. 921–935.
155. Wienken CJ, Baaske P, Rothbauer U, Braun D, Duhr S. Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. // *Nat. Commun.* – 2010. – V. 1. – P. 100.
156. Steczkiewicz K, Zimmermann MT, Kurcinski M, Lewis BA, Dobbs D, Kloczkowski A, Jernigan RL, Kolinski A, Ginalski K. Human telomerase model shows the role of the TEN domain in advancing the double helix for the next polymerization step. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2011. – V. 108. – P. 9443–9448.
157. Qi X, Xie M, Brown AF, Bley CJ, Podlevsky JD, Chen JJ. RNA/DNA hybrid binding affinity determines telomerase template-translocation efficiency. // *EMBO J.* – 2012. – V. 31. – №1. – P. 150-161.
158. Wu RA, Tam J, Collins K. DNA-binding determinants and cellular thresholds for human telomerase repeat addition processivity. // *EMBO J.* – 2017. – V. 36. – P. 1908–1927.
159. Westover KD, Bushnell DA, Kornberg RD. Structural basis of transcription: Separation of RNA from DNA by RNA polymerase II. // *Science.* – 2004. – V. 303. – P. 1014–1016.
160. Vassylyev DG, Vassylyeva MN, Perederina A, Tahirov TH, Artsimovitch I. Structural basis for transcription elongation by bacterial RNA polymerase. // *Nature.* – 2007. – V. 448. – P. 157–162.
161. Kent T, Kashkina E, Anikin M, Temiakov D. Maintenance of RNA–

- DNA Hybrid Length in Bacterial RNA Polymerases. // *J. Biol. Chem.* – 2009. – V. 284. – P. 13497–13504.
162. Huynh K, Partch CL. Analysis of protein stability and ligand interactions by thermal shift assay // *Curr Protoc Protein Sci.* – 2015. – V. 79. – P. 28.9.1–28.9.14.
163. Mizianty MJ, Kurgan LA. Sequence-based prediction of protein crystallization, purification, and production propensity. // *Bioinformatics.* – 2011. – V. 27. – №13. – P. i24-i33.
164. Slabinski L, Jaroszewski L, Rychlewski L, Wilson IA, Lesley SA, Godzik A. XtalPred: a web server for prediction of protein crystallizability. // *Bioinformatics.* – 2007. – V. 23. – №24. – P. 3403-3405.

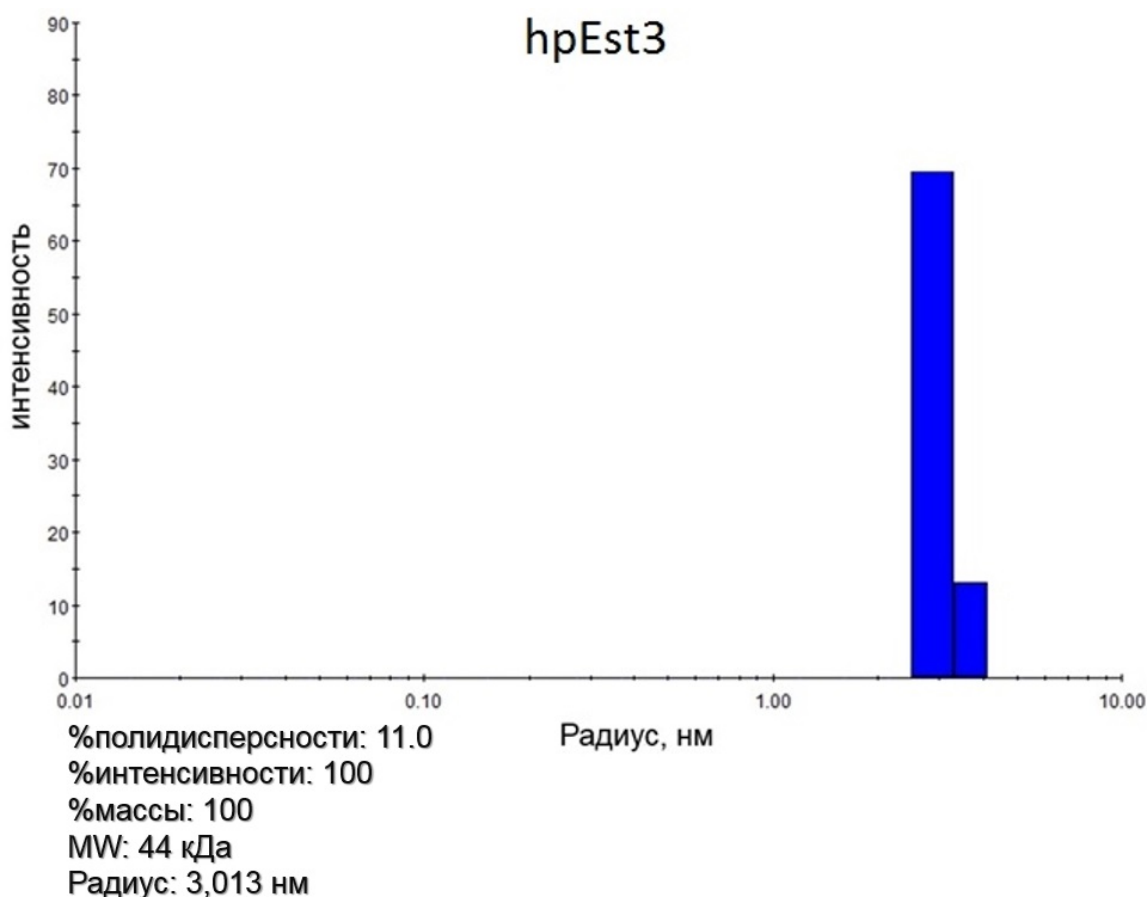


## 7. Приложение

### 7.1 Приложение 1

#### 7.1.1 Результаты динамического светорассеяния (DLS) для очищенного рекомбинантного белка hpEst3

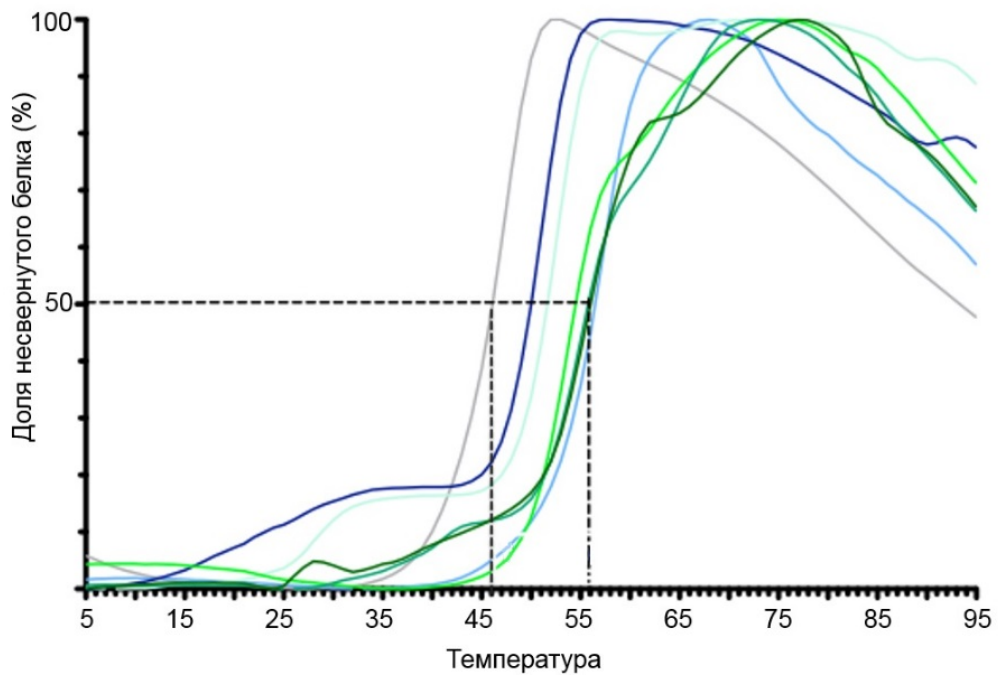
Значение %полидисперсности менее 15% - монодисперсный образец, %массы – процент частиц данного размера по массе (100% означает наличие популяции частиц одного размера или 1 пика на графике), %интенсивности – процент частиц данного размера по интенсивности (100% означает наличие популяции частиц одного размера или 1 пика на графике).



Результаты измерения динамического светорассеяния для образца рекомбинантного белка hpEst3 с удаленным аффинным тагом. Концентрация белка 6 мг/мл. Буферные условия: hpEst3 буфер для ЯМР (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6.5, 150 mM KCl, 1mM ДТТ).

7.1.2 Пример результатов термофлуориметрии (ТФ, TF) для очищенного рекомбинантного белка *hpEst3*

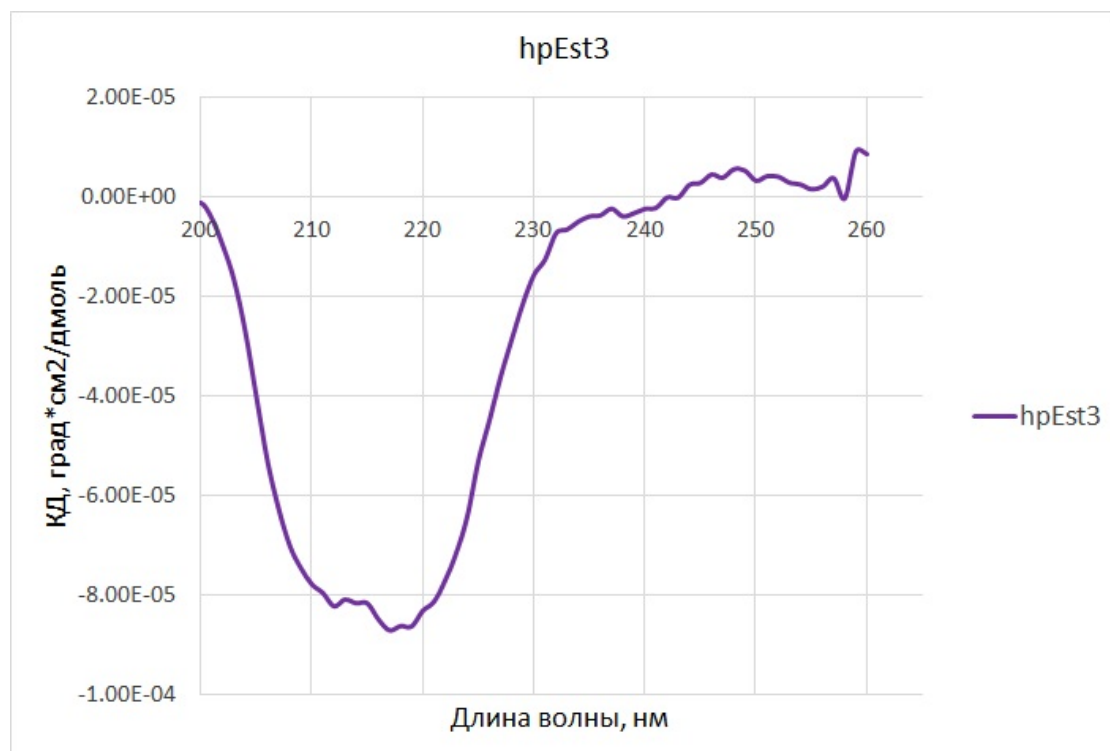
Следили за возгоранием флуорофора SYPRO Orange при связывании гидрофобных участков белка при термической денатурации. Температура плавления соответствует 50% несвернутого белка (точка перегиба на графике).



Результаты термофлуориметрии для очищенного рекомбинантного белка *hpEst3* с удаленным аффинным тагом. Несколько кривых соответствуют различным буферным условиям.

### 7.1.3 Результаты измерения кривой кругового дихроизма (КД) для очищенного рекомбинантного белка hpEst3

Спектры кругового дихроизма снимали на КД-спектрометре «CHIRASCAN» («Applied Photophysics Ltd.», Великобритания) при длинах волн 200-260 нм в кювете с длиной оптического пути 0,01 см при температуре 25°C.

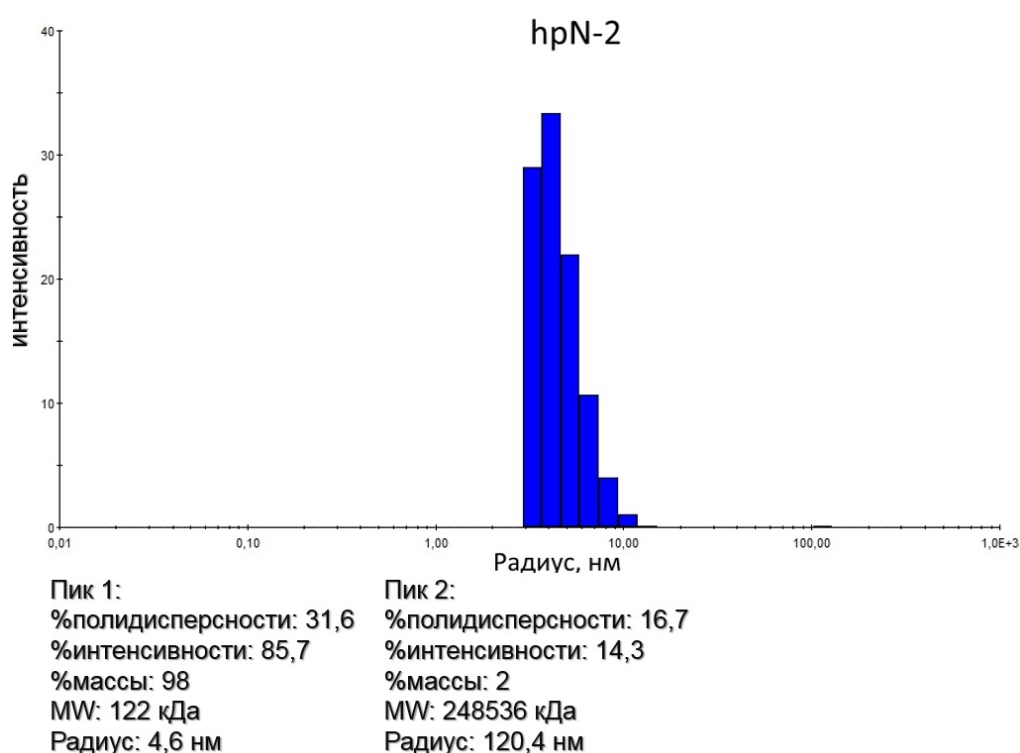


Спектр кругового дихроизма для образца рекомбинантного белка hpEst3 с удаленным аффинным тагом. Концентрация белка 5 мг/мл. Буферные условия: hpEst3 буфер для ЯМР (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6.5, 150 mM KCl, 1mM ДТТ)

## 7.2 Приложение 2

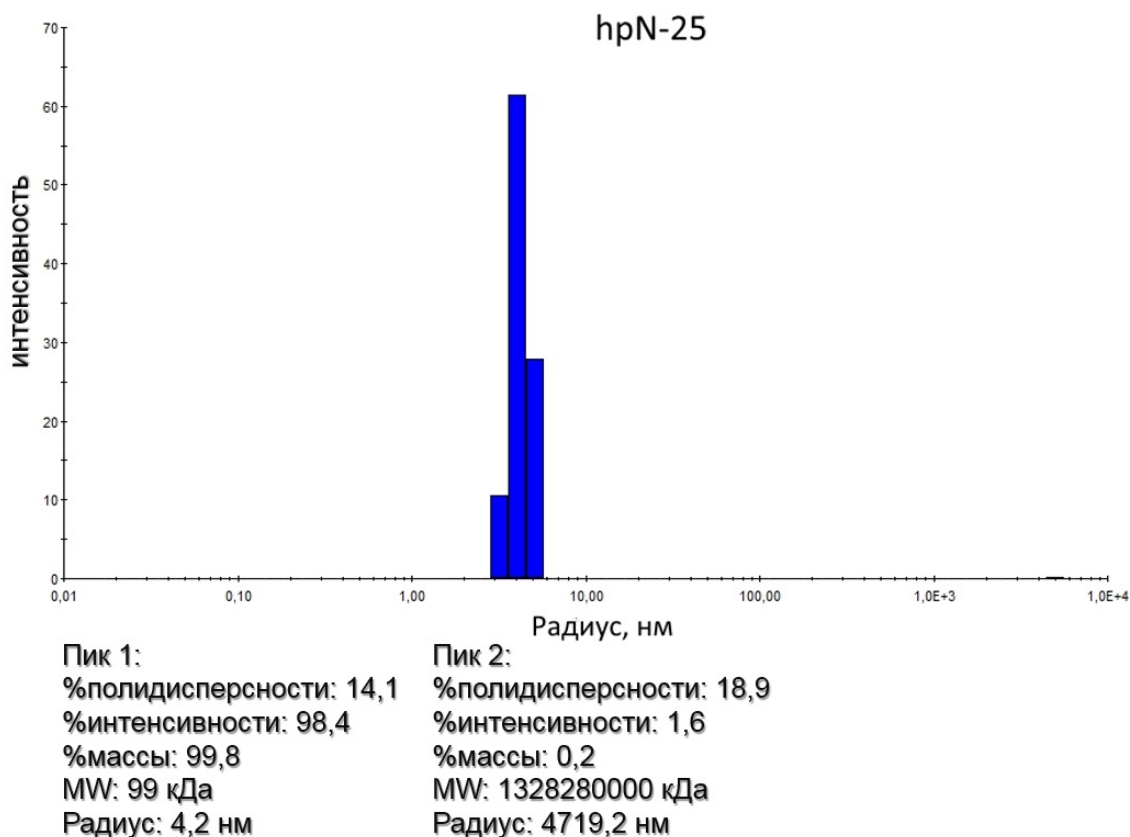
### 7.2.1 Результаты динамического светорассеяния (DLS) для очищенных рекомбинантных белков *hpN-2*, *hpN-25*, *hpTEN*

Значение %полидисперсности менее 15% - монодисперсный образец, %массы – процент частиц данного размера по массе (100% означает наличие популяции частиц одного размера или 1 пика на графике), %интенсивности – процент частиц данного размера по интенсивности (100% означает наличие популяции частиц одного размера или 1 пика на графике).



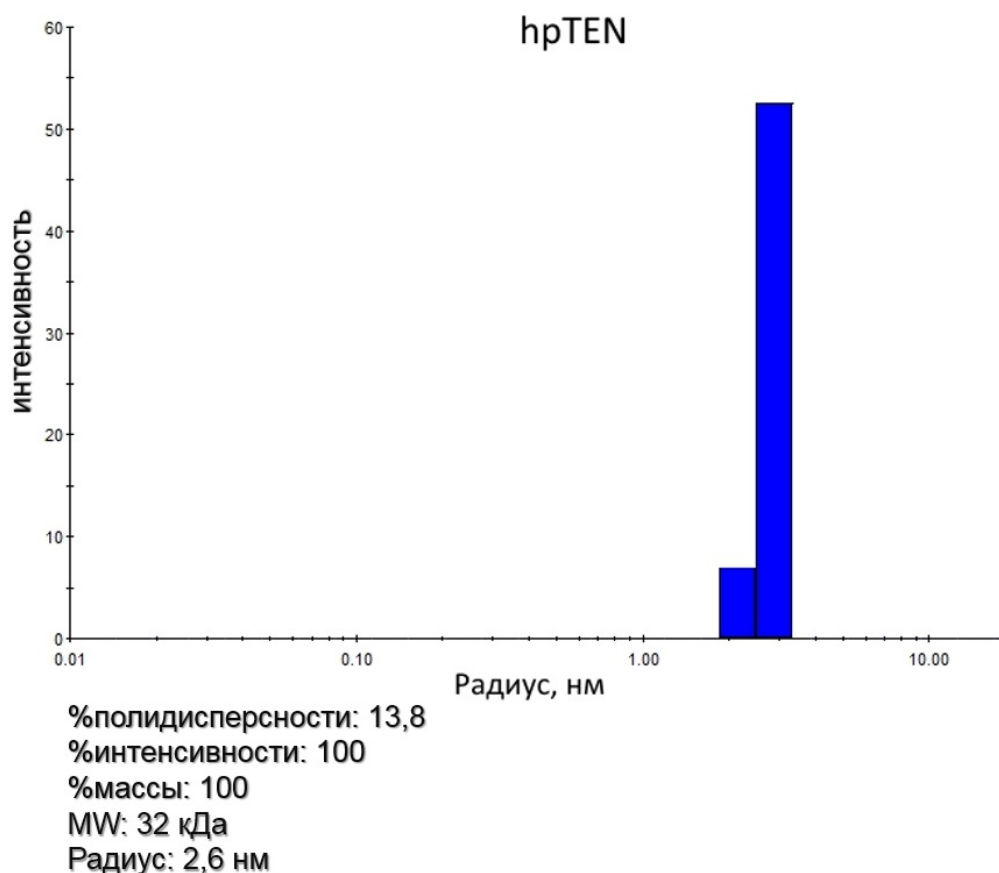
Результаты измерения динамического светорассеяния для образца рекомбинантного белка *hpN-2* с аффинным тагом (6 гистидинов, S-таг, сайт узнавания TEV-протеазы) с N-конца белка. Концентрация белка 3 мг/мл. Буферные условия: 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 300 mM KCl, 1mM ДТТ. Препарат содержал две популяции частиц, что давало два пика на графике. Процент полидисперсности первого пика, расчетная молекулярная масса которого совпадала с расчетной молекулярной массой белка *hpN-2*, составил 31,6%, что говорит о полидисперсности полученного образца, %массы составил 98%, оставшиеся 2% составляли компоненты расчётной массы, значительно

превышающей теоретически рассчитанную для данного белка. %интенсивности для первого пика составил 85,7.



Результаты измерения динамического светорассеяния для образца рекомбинантного белка hpN-25 с аффинным тагом (6 гистидинов, S-таг, сайт узнавания TEV-протеазы) с N-конца белка. Концентрация белка 4 мг/мл. Буферные условия: 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 300 mM KCl, 1mM ДТТ. Препарат белка содержал две популяции частиц, что давало два пика на графике. Процент полидисперсности первого пика, расчетная молекулярная масса которого совпадала с расчетной молекулярной массой белка hpN-25, составил 14,1%, что говорит о монодисперсности полученного образца (менее 15% - монодисперсный образец). %массы составил 99,8% (100% означает наличие популяции частиц одного размера или 1 пика на графике), 0,2% составляли компоненты расчётной массы, значительно превышающей теоретически рассчитанную для данного белка. %интенсивности для первого пика составил 98,4. Таким образом, в образце присутствовали высокомолекулярные примеси,

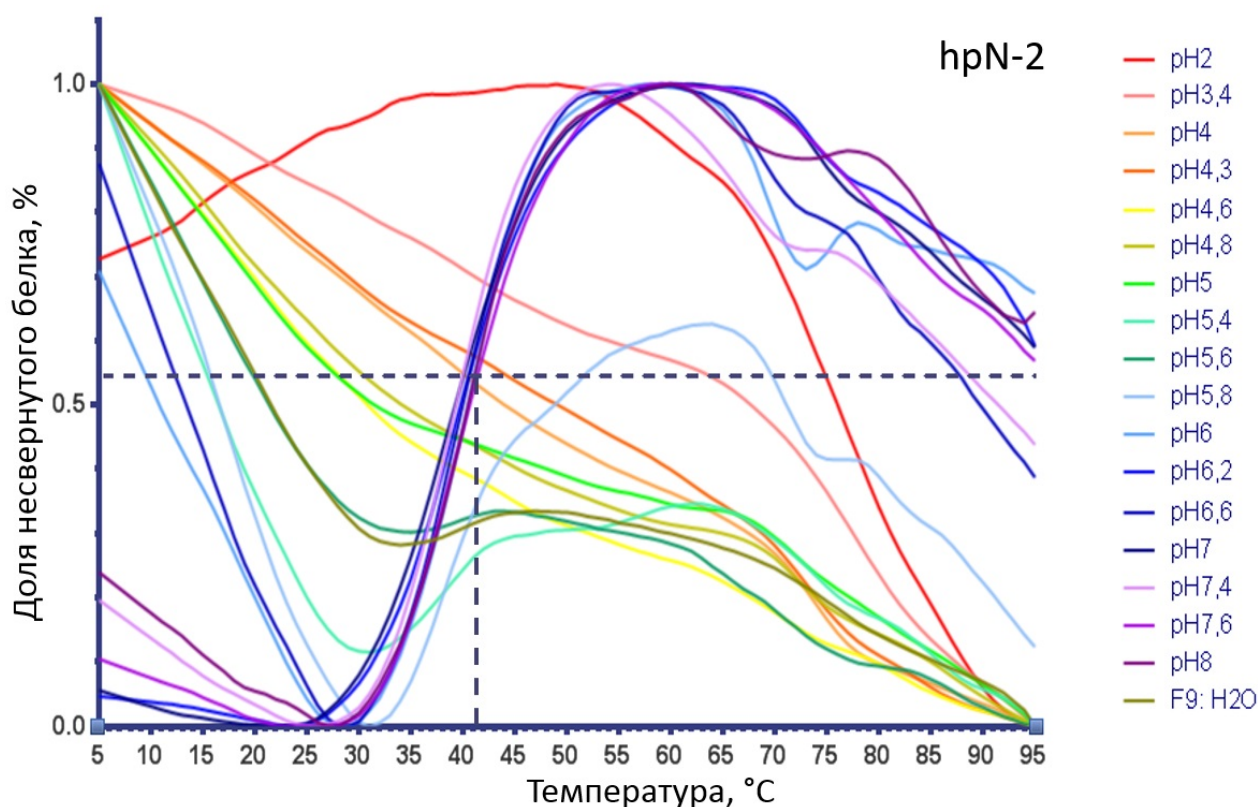
предположительно белковые агрегаты, однако их количество можно было считать незначительным.



Результаты измерения динамического светорассеяния для образца рекомбинантного белка hrTEN с удалённым аффинным тагом. Концентрация белка 4 мг/мл. Буферные условия: hrTEN буфер для ЯМР (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7, 50 mM NaCl, 1мМ ДТТ). Белковый препарат содержал частицы одного размера. Процент полидисперсности составил 13,8%, что говорит о монодисперсности полученного образца. %массы составил 100%, %интенсивности составил 100%, что говорит о наличии популяции частиц одного размера.

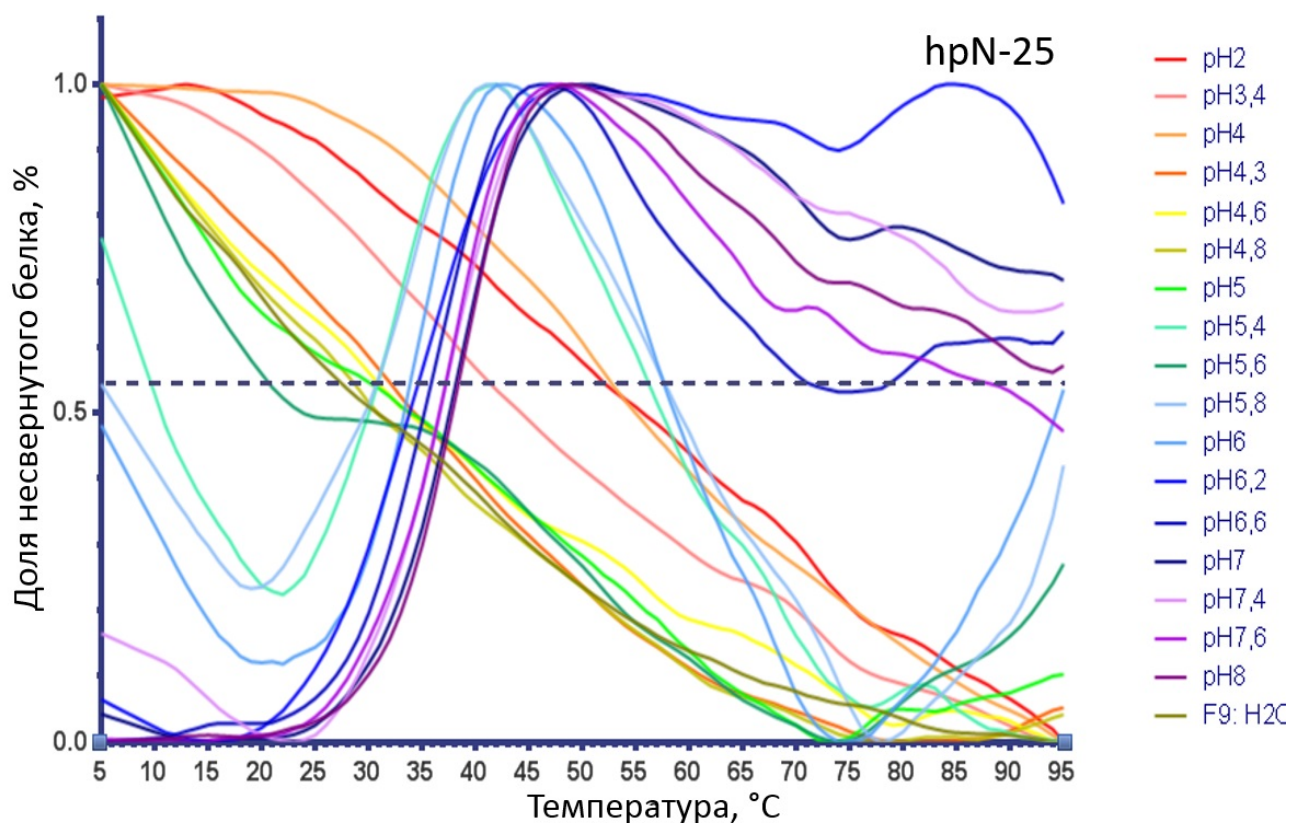
### 7.2.2 Пример результатов термофлуориметрии (ТФ, TF) для очищенных рекомбинантных белков hpN-2, hpN-25, hpTEN

Следили за возгоранием флуорофора SYPRO Orange при связывании гидрофобных участков белка при термической денатурации. Температура плавления соответствует 50% несвернутого белка (точка перегиба на графике).

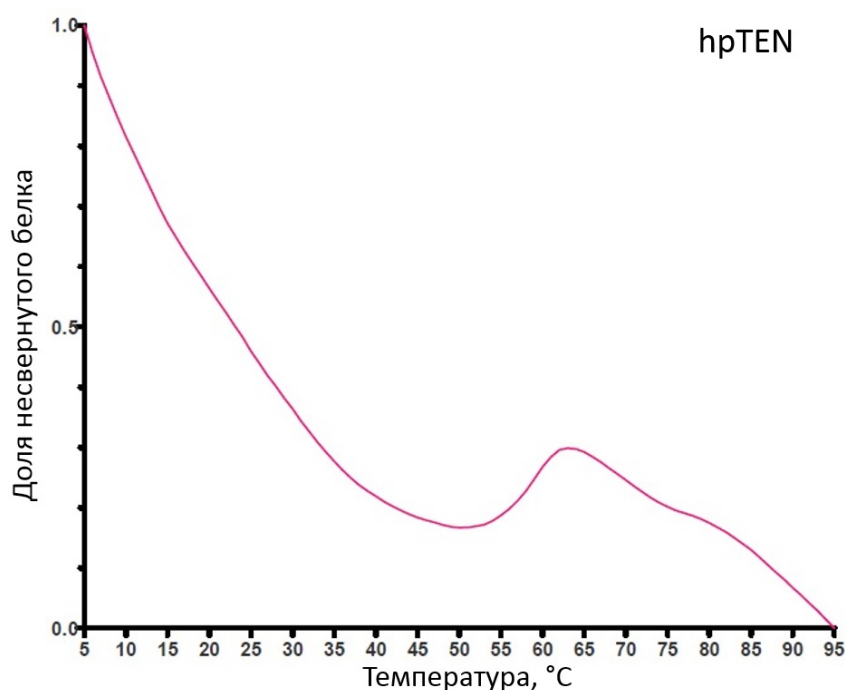


Кривые термофлуориметрии для образца рекомбинантного белка hpN-2 с аффинным тагом (6 гистидинов, S-таг, сайт узнавания TEV-протеазы) с N-конца белка. Тестировали влияние pH на стабильность белка (pH 2-8, 50 мМ фосфат-цитратный буфер). При pH 2-6,2 наблюдается высокая доля развёрнутого белка уже при 5°C. В диапазоне pH 6,6-8 hpN-2 свёрнут и наблюдается ярко выраженный перегиб кривой на графике, температура плавления 42°C.





Кривые термофлюориметрии образца рекомбинантного белка hpN-25 с аффинным тагом (6 гистидинов, S-таг, сайт узнавания TEV-протеазы) с N-конца белка. Тестировали влияние pH на стабильность белка (pH 2-8, 50 мМ фосфат-цитратный буфер). При pH 2-6 наблюдается высокая доля развёрнутого белка уже при 5°C. В диапазоне pH 6,2-8 hpN-25 свёрнут и наблюдается ярко выраженный перегиб кривой на графике, температура плавления 42°C.



hpTEN

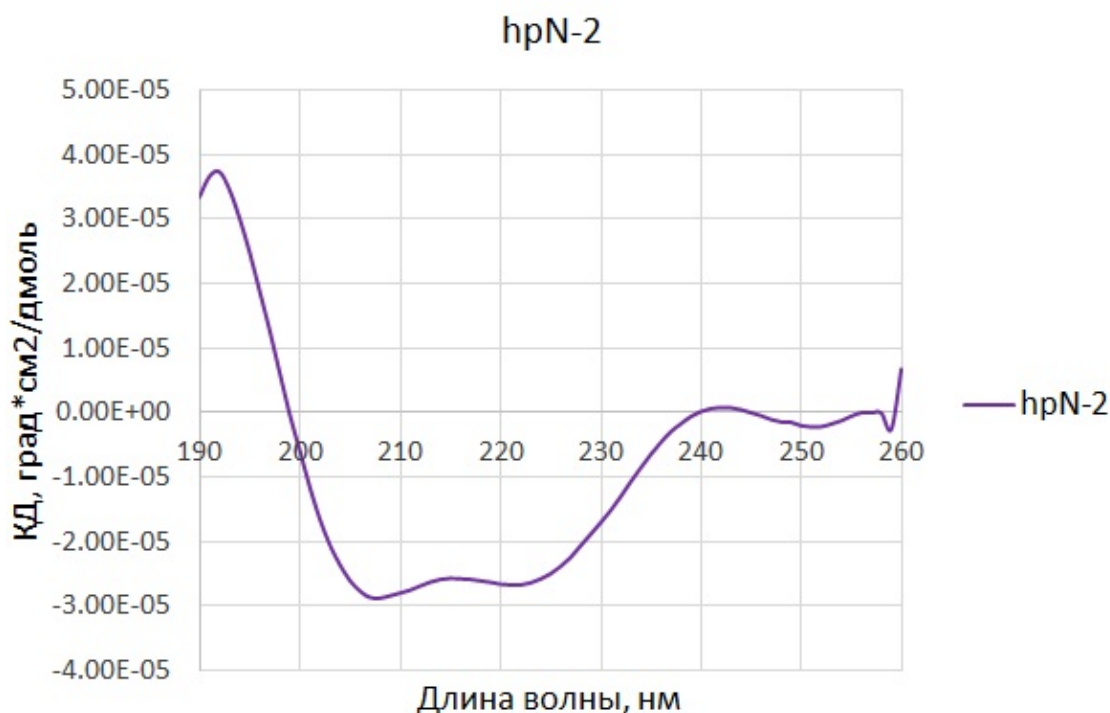
Кривая термофлюориметрии образца рекомбинантного белка hpTEN с удалённым аффинным тагом. Форма кривой позволяет предположить наличие гидрофобного участка на поверхности белка (начало кривой со



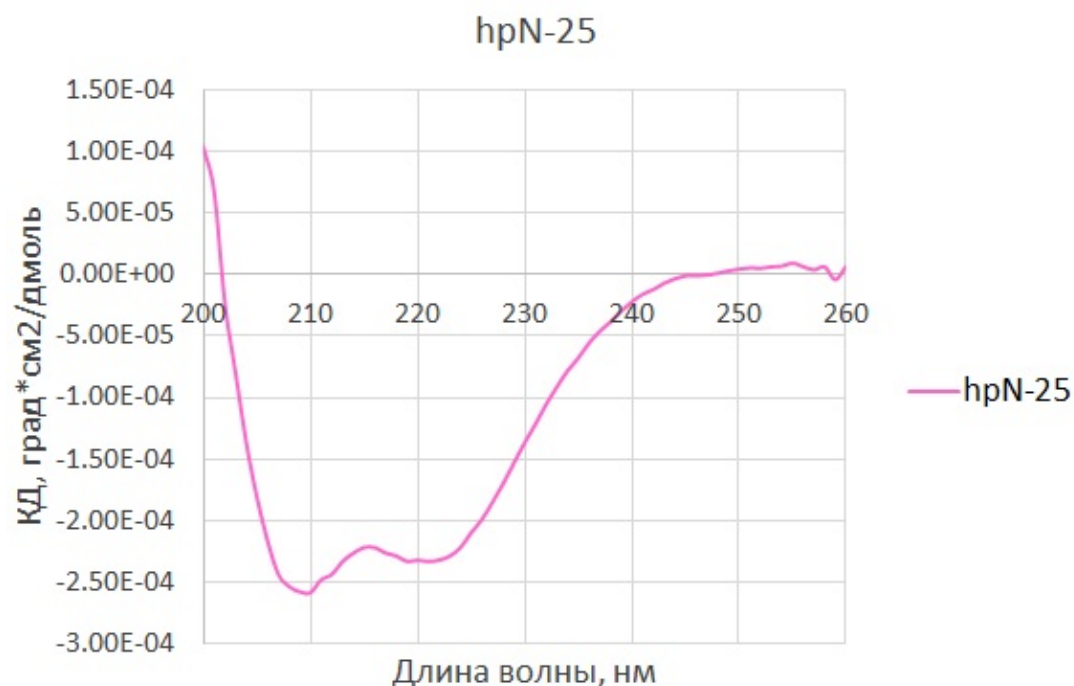
значением доли несвернутого белка равной единице).

### 7.2.3 Результаты измерения кривой кругового дихроизма (КД) для очищенных рекомбинантных белков *hpN-2*, *hpN-25*, *hpTEN*

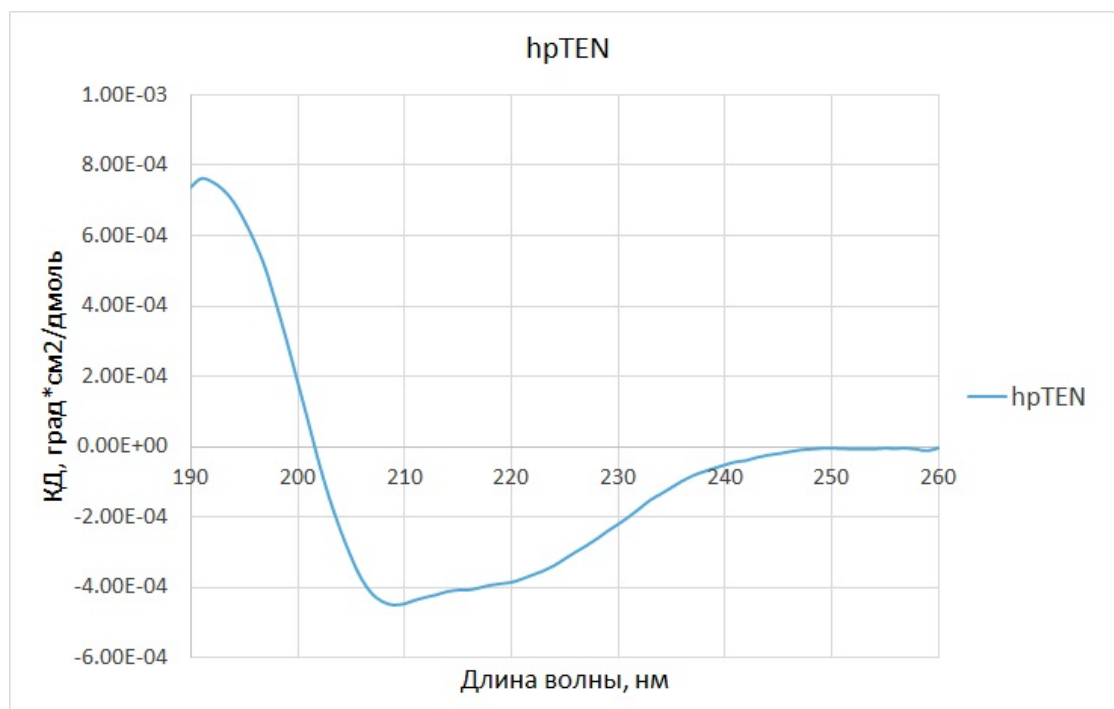
Спектры кругового дихроизма снимали на КД-спектрометре «CHIRASCAN» («Applied Photophysics Ltd.», Великобритания) при длинах волн 190-260нм в кювете с длиной оптического пути 0,01см при температуре 25°C



Спектр кругового дихроизма для образца рекомбинантного белка *hpN-2* с аффинным тагом (6 гистидинов, S-таг, сайт узнавания TEV-протеазы) с N-конца белка. Полученный белковый препарат являлся структурированным, с преобладанием  $\alpha$ -спиральных элементов вторичной структуры.



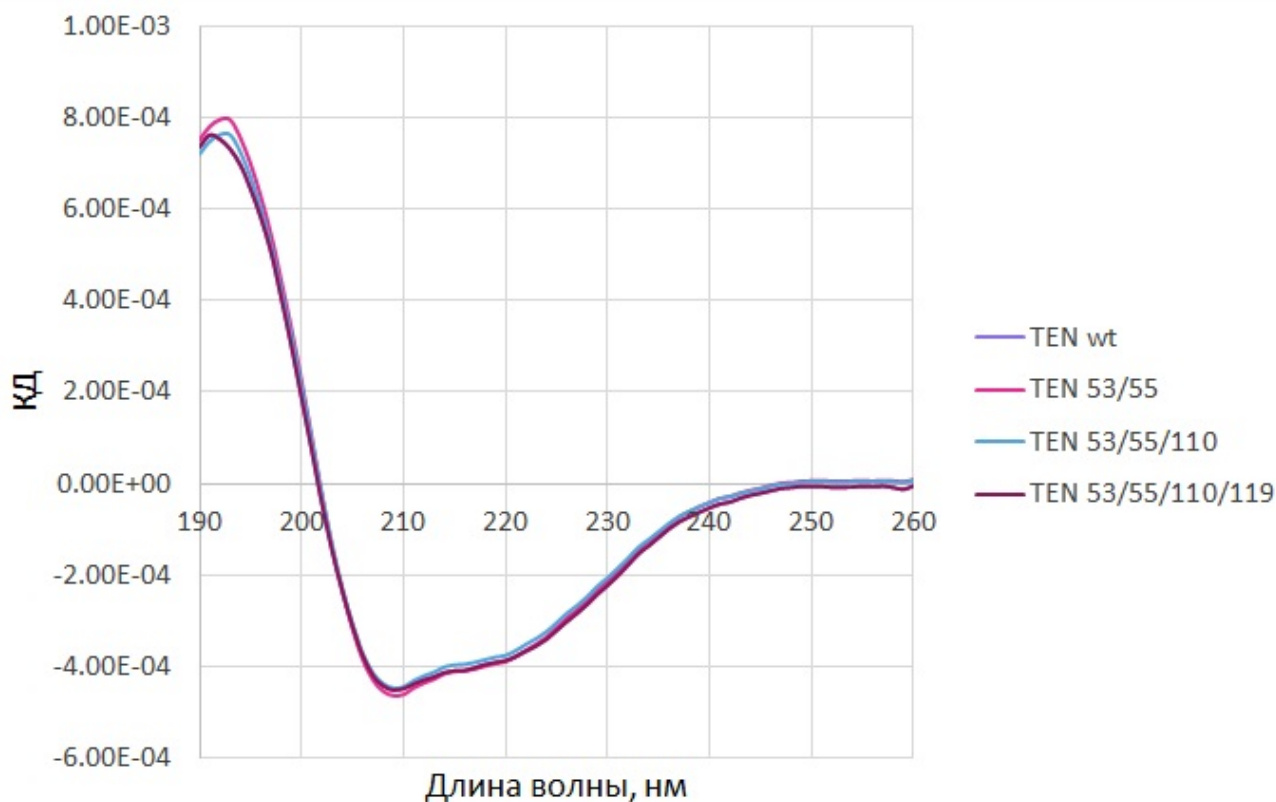
Спектр кругового дихроизма для образца рекомбинантного белка hpN-25 с аффинным тагом (6 гистидинов, S-таг, сайт узнавания TEV-протеазы) с N-конца белка. Полученный белковый препарат являлся структурированным, с преобладанием  $\alpha$ -спиральных элементов вторичной структуры.



Спектр кругового дихроизма для образца рекомбинантного белка hpTEN с удаленным аффинным тагом. Полученный белковый препарат являлся структурированным, с преобладанием  $\alpha$ -спиральных элементов вторичной структуры.

### 7.3 Приложение 3

Спектры кругового дихроизма снимали на КД-спектрометре «CHIRASCAN» («Applied Photophysics Ltd.», Великобритания) при длинах волн 190-260 нм в кювете с длиной оптического пути 0,01 см при температуре 25°C.



Спектры кругового дихроизма рекомбинантных белков hrTEN без аффинного тага с двумя (N53A/S55A), тремя (N53A/S55A/R110A) и четырьмя заменами (N53A/S55A/R110A/E119A). Внесение замен не повлияло на структуру белка.