

创新团队成果专栏

## 裂殖酵母 Shelterin 五元复合物的电镜结构研究

鲁彦伽, 孙 虹, 吴振芳, 雷 鸣

上海交通大学医学院附属第九人民医院上海精准医学研究院, 上海 200125

**[摘要]** **目的**·通过电子显微镜(电镜)和负染技术分析裂殖酵母端粒结合蛋白质 Shelterin 五元复合物(Rap1-Poz1-Tpz1-Ccq1-Pot1)的三维结构。**方法**·利用大肠埃希菌表达系统在体外重组和表达带有组氨酸-小分子泛素相关修饰物蛋白(histidine-small ubiquitin related modifier, His-SUMO)和谷胱甘肽巯基转移酶(glutathione S-transferase, GST)纯化标签的目的蛋白质,通过两步亲和层析(镍离子金属螯合亲和层析、谷胱甘肽琼脂糖凝胶亲和层析)以及一步凝胶过滤层析(Superose™6 10/300 GL)分离纯化目的蛋白质复合物。采用0.75%甲酸双氧铀对蛋白质样品进行染色,用120 kV透射电镜观察,放大倍数设置为92 000倍,收集颗粒分散性较好的负染照片。用EMAN2软件和Relion3.0软件,通过单颗粒重构技术研究裂殖酵母 Shelterin 复合物的三维结构,最后利用UCSF Chimera软件对裂殖酵母 Shelterin 复合物的重构模型进行分析。**结果**·经过两步亲和层析以及凝胶过滤层析获得纯度高、组分齐、均一性良好的重组裂殖酵母 Shelterin 五元复合物的蛋白质样品;利用120 kV透射电镜获得负染电镜照片83张,从中挑选18 659个蛋白质复合物颗粒进行三维模型构建,初步解析了该复合物的三维结构;将重构模型与已报道的蛋白质组分的高分辨率结构进行分子对接,确定各组分在复合物中的定位情况,揭示该复合物以二聚体的形式存在。**结论**·构建了裂殖酵母 Shelterin 五元复合物(Rap1-Poz1-Tpz1-Ccq1-Pot1)的低分辨率的三维模型。

**[关键词]** 端粒;端粒末端保护;Shelterin复合物;电子显微镜;负染

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2022.03.005 **[中图分类号]** Q518.2 **[文献标志码]** A

## Electron microscopic study of Shelterin quinary complex structure in fission yeast

LU Yanjia, SUN Hong, WU Zhenfang, LEI Ming

Shanghai Institute of Precision Medicine, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200125, China

**[Abstract]** **Objective**·To study the structure of the Shelterin quinary complex (Rap1-Poz1-Tpz1-Ccq1-Pot1) in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) by negative-staining and electron microscopy. **Methods**·The Shelterin quinary complex was reconstituted via expression and purification of recombinant proteins in *Escherichia coli* with histidine-small ubiquitin-related modifier (His-SUMO) and glutathione S-transferase (GST) tags. The target protein complex was isolated via sequential Ni-NTA and glutathione sepharose affinity purification followed by gel filtration chromatography (Superose™6 10/300 GL). The protein samples were stained by 0.75% uranium formate, and then observed by 120 kV transmission electron microscope (TEM) with a magnification of 92 000. The micrographs with good particle dispersity were obtained and the 3D structure of Shelterin complex was reconstructed by single particle image analysis by using EMAN2 and Relion3.0. Finally, UCSF Chimera was used to analyze the reconstruction model of Shelterin complex. **Results**·The recombinant *S. pombe* Shelterin quinary complex with high purity, component integrity and good homogeneity was obtained by using a tandem affinity purification scheme with Ni-NTA and GST-based chromatography. Eighty-three micrographs were collected through 120 kV TEM, in which 18 659 particles were picked for 3D model reconstruction. After that, the rough 3D structure of the complex was obtained. Molecular docking of the available crystal structures of Shelterin subcomplex into the reconstructed model revealed that the complex existed in a dimeric form and determined the positioning of each component in the complex. **Conclusion**·The low-resolution 3D model of *S. pombe* Shelterin quinary complex (Rap1-Poz1-Tpz1-Ccq1-Pot1) is obtained.

**[Key words]** telomere; telomere end-protection; Shelterin complex; electron microscopy; negative-staining

**[基金项目]** 国家重点研发计划(2018YFA0107004);国家自然科学基金(31930063)。

**[作者简介]** 鲁彦伽(1997—),女,硕士生;电子邮箱:jocelyn-lu@sjtu.edu.cn。

**[通信作者]** 雷 鸣,电子邮箱:leim@shsmu.edu.cn。

**[Funding Information]** National Key R&D Program of China (2018YFA0107004); National Natural Science Foundation of China (31930063).

**[Corresponding Author]** LEI Ming, E-mail: leim@shsmu.edu.cn.



端粒是真核细胞线性染色体末端的保护性结构,由特定的DNA重复序列和蛋白质组分构成,在维持基因组的稳定中发挥重要作用<sup>[1]</sup>。Shelterin复合物是一种结合在端粒DNA上的复合物,由多种亚基构成。它与不同的复合物相互作用,通过精细的调控,使得端粒长度始终维持在稳定的状态<sup>[2]</sup>。人源Shelterin复合物由TRF1 (telomeric repeat binding factor 1)、TRF2、TIN2 (TRF1-interacting nuclear factor 2)、RAP1 (repression/activation protein 1)、TPP1 (adrenocortical dysplasia protein homolog, 又称ACD)、POT1 (protection of telomeric protein 1) 6种组分构成,这些组分通过广泛的相互作用,抑制多种DNA损伤应答反应,调节端粒酶与端粒DNA的结合,维持端粒的稳态<sup>[3]</sup>。除此之外,Shelterin复合物还会配合细胞周期的进程,保证端粒DNA复制的正常进行<sup>[4]</sup>。由于Shelterin复合物在维持端粒稳态方面的重要性,其组分结构和功能上的异常,都会导致疾病的发生。例如在人类的乳腺癌细胞中发现Shelterin复合物的各种组分表达异常增高<sup>[5]</sup>,在其他多种肿瘤细胞中检测到Shelterin组分的突变<sup>[6]</sup>,这些变化大多会造成Shelterin复合物与DNA链之间或是Shelterin组分之间的相互作用遭到破坏,最终导致染色体脱帽,端粒DNA暴露在含有端粒酶以及多种损伤响应因子的环境中,促使癌症的发生<sup>[5,7]</sup>。

对Shelterin复合物结构的清晰认识能够极大地推进对慢性淋巴细胞白血病 (chronic lymphocytic leukemia, CLL)<sup>[8]</sup>、先天性角化不良 (dyskeratosis congenita, DKC)<sup>[9]</sup> 等由Shelterin组分功能异常导致的端粒相关疾病的认识,以及相应治疗手段的研究进展。有研究表明,Shelterin组分之间的相互作用是通过一种高度保守的“domain-peptide”(结构域对肽段)的机制来达成的<sup>[10-11]</sup>,即一种Shelterin组分可以通过同一结构域中的保守残基与多种蛋白质相互作用。这种相互作用机制不仅利于小分子药物的设计和开发<sup>[12]</sup>,更是赋予了Shelterin复合物较高的进化可塑性<sup>[11]</sup>。裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*, *S. pombe*) 在进化上相对缓慢,相较于芽殖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 来说,还留有許多后生生物的特性。正因如此,裂殖酵母在染色体的保护机制上与高等哺乳动物具有较高的同源性<sup>[13-14]</sup>。裂殖酵母的Shelterin复合物由Taz1 (telomere length regulator taz1)、Rap1、Poz1 (Pot1-associated protein Poz1)、Ccq1 (coiled-coil quantitatively-enriched protein 1)、Tpz1 (telomere-protecting protein)、Pot1 6个组分

成,在结构和功能上与人源Shelterin复合物都高度保守<sup>[15]</sup>。近年来也有不少以裂殖酵母的Shelterin复合物为研究对象,进行相关疾病起源的研究以及药物研发的实例。基于裂殖酵母Tpz1-Pot1之间和人源TPP1-POT1之间相互作用的保守性,通过Tpz1-Pot1生化 and 结构特性的研究结果,推测人类黑色素瘤相关的POT1突变(A532P)位于TPP1-POT1界面,该突变引起的TPP1-POT1相互作用缺失可能是导致端粒异常延长的原因<sup>[16]</sup>;利用人源POT1以及裂殖酵母Pot1结构的高度相似性,以裂殖酵母Pot1与单链DNA结合复合物为对象进行药物筛选,成功筛选到了一种能打断Pot1与单链DNA相互作用的小分子抑制剂<sup>[17]</sup>。这些治疗手段与抑制端粒酶活性的治疗方式联合,能够在一定程度上克服癌细胞对药物的耐受性,有望显著提高药物对多种癌症的治疗效果<sup>[18]</sup>。

近20年来Shelterin复合物中多种蛋白质-蛋白质以及蛋白质-DNA相互作用的高分辨率晶体结构已获得解析<sup>[19-24]</sup>。然而,Shelterin复合物在体内具有高度的异质性——各亚基间可能形成不同组合的亚复合物,参与不同的调控反应<sup>[25]</sup>;同时,Shelterin复合物的结构具有较大的可变性,这些因素都极大地阻碍了完整Shelterin复合物高分辨率结构的解析。本实验室之前的工作已解析了裂殖酵母Shelterin三元复合物(Rap1-Poz1-Tpz1)的晶体结构<sup>[19]</sup>,在此基础上本研究采用在体外重组并表达裂殖酵母Shelterin复合物的方法,通过两步亲和层析、凝胶过滤层析等蛋白质纯化流程、负染技术、电子显微镜(电镜)以及单颗粒重构技术,最终获得了裂殖酵母Shelterin五元复合物Rap1-Poz1-Tpz1-Ccq1-Pot1的低分辨率三维结构模型,为解析高分辨率的Shelterin复合物结构奠定了坚实的基础,对理解整个复合物的组装方式及其发挥功能的分子机制具有重要的意义,同时也将为相关疾病的治疗提供新的思路和潜在靶点。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

1.1.1 表达质粒与菌株 pGEX-6P1 以及 pET-28AS-m2 克隆载体均由本实验室保管,其中 pET-28AS-m2 为本实验室基于 pET-28a(+) 改造的质粒——用编码小分子泛素相关修饰物蛋白 (small ubiquitin related modifier, SUMO) 序列替换原 pET-28a(+) 中的 ACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGC 序列。用于质

粒扩增的大肠埃希菌 (*E. coli*) DH5 $\alpha$  以及用于蛋白质表达的 *E. coli* BL21 (DE3) 菌株由本实验室保管。

**1.1.2 主要试剂以及仪器** LB培养基购于青岛生工生物技术有限公司, 镍离子金属螯合亲和层析介质 (Ni-NTA) 购于德国 Qiagen 公司, 谷胱甘肽琼脂糖凝胶 (glutathione sepharose 4B) 购于美国 GE 公司, 甲酸双氧铀购于美国 TED PELLA 公司, 氨苄青霉素、卡纳霉素、氯化钠 (NaCl)、甘油 (glycerol)、异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG)、苯甲基磺酰氟 (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)、亮抑肽酶 (leupeptin)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT) 均购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 考马斯亮蓝 G250 购于上海碧云天生物技术有限公司。本实验使用的 His-ULP1 (带组氨酸标签的 SUMO 蛋白酶) 以及谷胱甘肽巯基转移酶 3C 酶 (GST-3C) 均由实验室表达、纯化及保存。

高压细胞破碎仪 (FB-110X) 购于上海励途超高压设备有限公司, 高速离心机 (Beckman Avanti JXN26) 购于美国 Beckman Coulter 公司, 超声波清洗器 (SB-5200DTN) 购于宁波新芝生物技术有限公司, 垂直电泳仪 (Mini-PROTEAN Tetra Cell) 购于 Bio-Rad (中国) 公司, 控温振荡培养箱 (YR101) 购于上海西雷生物有限公司, 快速蛋白质液相色谱 (fast protein liquid chromatography, FPLC) 系统 (ÄKTA™ pure) 和 Superose™6 10/300 GL 层析柱购于美国 GE 公司, 普通碳支持膜 (BZ1102XX) 购于北京中镜科仪有限公司, 透射电子显微镜 (Talos L120C) 购于美国 FEI 公司。

## 1.2 实验方法

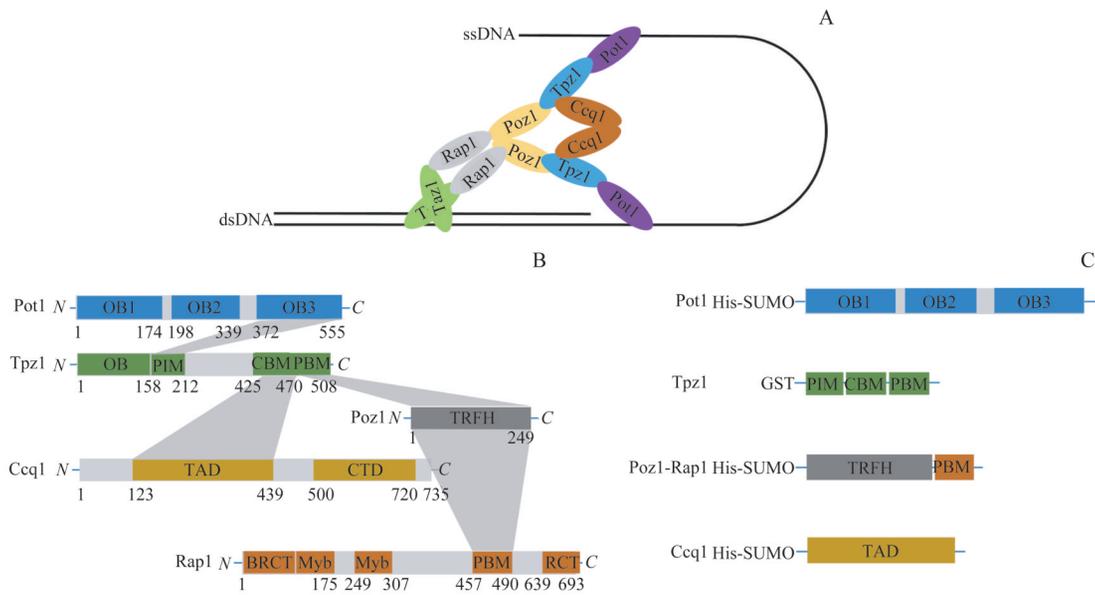
**1.2.1 质粒构建** 从 Shelterin 复合物各亚基间的相对位置关系 (图 1A), 复合物各组分之间的相互作用情况 (图 1B), 以及本实验室已发表的实验数据来看, Poz1 全长蛋白质中的 71~83 位肽段不利于蛋白质稳定纯化<sup>[19]</sup>; 我们在本次构建中去除了这段序列 (本文仍简称 Poz1), 并在 Poz1 的羧基端引入编码融合蛋白质柔性连接——(GGG)<sub>2</sub> 肽段的序列, 再利用该连接将 Poz1 的 C 端与 Rap1<sub>PBM</sub> (Rap1 上与 Poz1 相互作用的区域, 氨基酸残基: 465~491) 的氨基端相连, 构建出融合蛋白质 Poz1-Rap1<sub>PBM</sub> [相对分子质量 ( $M_r$ ) 30 000]。同样地, 通过从氨基端到羧基端依次排列 Tpz1<sub>PBM</sub> (Tpz1 上与 Pot1 相互作用的区域, 氨基酸残

基: 167~240)、Tpz1<sub>CBM</sub>-Tpz1<sub>PBM</sub> (Tpz1 上与 Ccq1 相互作用的区域-Tpz1 上与 Poz1 相互作用的区域, 氨基酸残基: 425~509), 构建 Tpz1<sub>INT</sub> ( $M_r$  17 000), 2 个片段用 (GGG)<sub>2</sub> 肽段连接。将 Pot1<sub>FL</sub> (Pot1 全长蛋白质,  $M_r$  61 000)、Poz1-Rap1<sub>PBM</sub> 和 Ccq1<sub>TAD</sub> (Ccq1 上与 Tpz1 相互作用的区域, 氨基酸残基: 123~439,  $M_r$  34 000) 3 段序列分别构建于 pET-28AS-m2 克隆载体, 使它们各自氨基端带上 His-SUMO 纯化标签; Tpz1<sub>INT</sub> 构建于 pGEX-6P1 克隆载体, 使其氨基端带上谷胱甘肽巯基转移酶 (GST) 纯化标签 (图 1C)。

**1.2.2 蛋白质表达与纯化** 将 Tpz1<sub>INT</sub> 与 Pot1<sub>FL</sub> 共同转化进 *E. coli* BL21 (DE3), Poz1-Rap1<sub>PBM</sub> 以及 Ccq1<sub>TAD</sub> 单独转化进 BL21 (DE3)。挑取单个菌落至对应抗性的 LB 液体培养基, 于 37 °C 活化 12 h。将活化好的菌体转接至 1 L 对应抗性的 LB 液体培养基。接种比例为菌种:培养基=1:100。每次摇菌 6 L, 包括 3 L Tpz1<sub>INT</sub> 和 Pot1<sub>FL</sub> 共表达菌、2 L Poz1-Rap1 融合蛋白质表达菌和 1 L Ccq1<sub>TAD</sub> 表达菌。

在 37 °C 下培养至吸光度值为 0.8, 降温至 18 °C 后, 加入 IPTG (终浓度为 0.2 mmol/L) 诱导蛋白质表达 18 h。然后以 3 990 $\times$ g、25 °C 离心 15 min, 收集菌体。用 lysis buffer 吹悬菌体, 直至无细菌团块。向悬液中添加终浓度为 1 mmol/L 的 PMSF、1  $\mu$ g/mL 的亮抑肽酶并混匀, 于高压均质机中彻底裂解并取样。裂解后的样品立刻于 39 190 $\times$ g、4 °C 离心 45 min, 收集上清液并取样。然后, 将收集的上清液与 Ni-NTA 于 4 °C 低速结合 1 h。离心收集 Ni-NTA 于层析柱, 收集流穿液并取样。之后用 wash buffer I 清洗杂蛋白质并取样。洗杂期间, 用考马斯亮蓝 G250 实时监测杂蛋白质的洗脱情况, 待考马斯亮蓝 G250 几乎不再变蓝后, 用 elution buffer I 洗脱并收集目的蛋白质, 取样。然后立刻用 His-ULP1 于 4 °C 酶切处理洗脱液, 去除所有蛋白质氨基端的 His-SUMO 标签。

在 His-ULP1 酶切进行 6 h 后, 取样。直接加入谷胱甘肽琼脂糖凝胶进行第 2 步的亲合层析, 于 4 °C 低速旋转结合 4 h。4 h 后, 将谷胱甘肽凝胶转移至层析柱, 收集流穿液, 并取样。然后用 wash buffer II 彻底清洗杂蛋白质, 将谷胱甘肽凝胶转移至干净的 50 mL 管, 于 4 °C 下用 GST-3C 酶低速过夜处理谷胱甘肽琼脂糖凝胶, 将 Tpz1 蛋白质氨基端 GST 标签以及 GST-3C 酶与目的蛋白质完全分开。将目的蛋白质留在流穿液里, 而将 GST 标签和酶留在谷胱甘肽凝胶上。10 h 后 200 $\times$ g 离心收集上清液并取样, 将纯化各



**Note:** A. Modularized organization of Shelterin in fission yeast. B. Domain organization of the Shelterin quinary complex. Shaded areas indicate the identified bipartite interaction regions. C. Schematic diagram of construction of reconstitution of Shelterin complex in *E. coli*. OB—OB-fold domain; TRFH—telomeric repeat factors homology domain; BRCT—BRCA1 C-terminal domain; RCT—Rap1 C-terminal domain; CTD—C-terminal domain; Myb—Myb domain.

**图1** 裂殖酵母 Shelterin 复合物各组分重组质粒的构建

**Fig 1** Construction of recombinant plasmids of each component of *S. pombe* Shelterin complex

步骤留取的样品行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)。检查纯化各步骤样品蛋白质组成的变化情况。

在目的蛋白质样品中加入 DTT (终浓度为 2 mmol/L), 用截留  $M_r$  为 100 000 的超滤浓缩管将蛋白质体积浓缩至 1 mL, 并于 21 130×g 离心 10 min 后, 取上清液, 使用 Superose™6 10/300 GL 与 FPLC buffer, 以 0.4 mL/min 的流速分离纯化蛋白质。根据出峰情况, 利用 SDS-PAGE 检测出峰位置对应收集管内的蛋白质组成状况。上述缓冲液配方见表 1。

**表 1** 缓冲液配方

**Tab 1** Buffer recipes

Buffer name	NaCl/ (mmol·L <sup>-1</sup> )	Tris-HCl/ (mmol·L <sup>-1</sup> )	Glycerol/ %	Imidazole/ (mmol·L <sup>-1</sup> )
Lysis buffer	500	25	10	—
Wash buffer I	150	25	—	20
Wash buffer II	150	25	—	—
Elution buffer I	150	25	—	250
FPLC buffer	150	25	—	—

**Note:** All buffers listed above were filtered through a membrane filter with 0.22 μm pore size. The FPLC buffer was stored at 4 °C after removing air bubbles by an ultrasonic cleaner.

**1.2.3 电镜样品制作、观察以及数据处理** 将铜网碳膜覆盖面向上, 经过真空放电亲水化处理后使用。取 5 μL 稀释后的蛋白质样品滴于铜网中心 (碳膜面

朝上), 等待样品吸附 1 min, 用滤纸边缘吸走多余的液体。将 3 个 5 μL 0.75% (质量体积浓度) 甲酸双氧铀染液滴置于疏水薄膜, 铜网碳膜面朝下蘸取染液, 并立刻吸走多余染液, 重复 2 次。最后, 吸取 5 μL 染液静置染色 1 min, 用滤纸吸取多余的染液。然后将铜网碳膜朝上置于滤纸上, 65 °C 照射 5 min, 至铜网完全干燥。将干燥的样品用 120 kV 透射电镜观察, 放大倍数设置为 92 000 倍, 欠焦值为 -2~-1 μm, 选择衬度好、颗粒分散性好、形态均一、浓度合适的区域收集数据。每张照片拍摄的位置的中心应间隔至少 2 μm, 以确保每张照片的视野没有重叠的区域, 收集到的颗粒均不重复。将收集的原始图片数据用 EMAN2 软件进行颗粒抽取, 然后从 EMAN2 软件中将抽取颗粒的图像和位置信息全部导入 RELION3.0 软件, 经过对采集数据的处理最终产生一个目的复合物的三维重构模型。

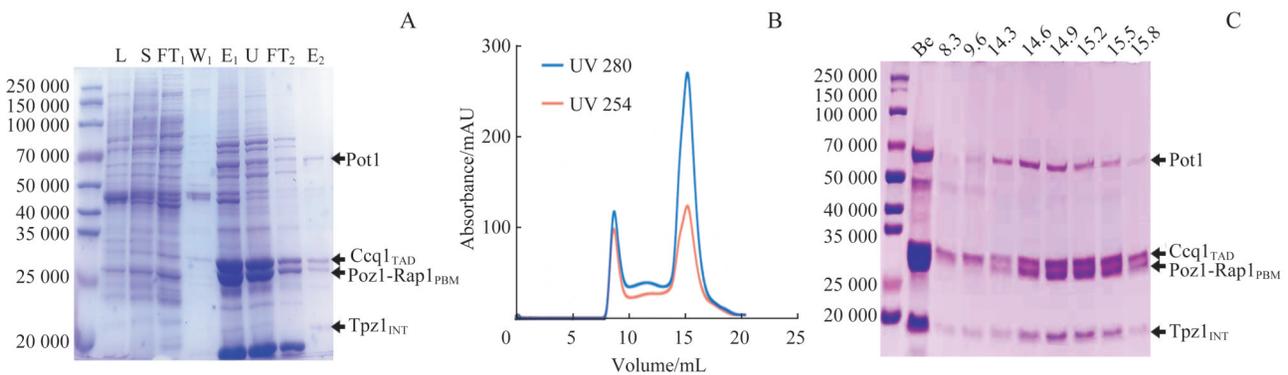
**1.2.4 Shelterin 复合物结构初步分析** 将获得的三维重构模型与已发表的裂殖酵母亚复合物高分辨率结构进行拟合。亚复合物 Rap1<sub>PBM</sub>-Poz1-Tpz1<sub>PBM</sub> (PDB ID: 5XXF)、Ccq1<sub>TAD</sub>-Tpz1<sub>CBM</sub> (PDB ID: 7CUJ)、Pot1<sub>OB3</sub>-Tpz1<sub>PIM</sub> (PDB ID: 7CUI)、Pot1<sub>OB1-OB2</sub> (PDB ID: 7CUH) 高分辨率结构均由 PDB 数据库检索获得。将上述结构导入 USFC Chimera 软件, 与我们所获得的重构模型进行拟合, 以推测各组分在整个 Shelterin 复合物中大致分布以及取向情况。

## 2 结果

### 2.1 Shelterin复合物的表达与纯化结果

*E. coli*体系经18 °C诱导,能大量表达目的蛋白质。经过Ni-NTA亲和层析,除去了大量杂蛋白质,但可以看出,洗脱后的样品纯度依然不高。之后,经过His-ULP1处理以及谷胱甘肽琼脂糖凝胶亲和层析,可以获得纯度较高的样品(图2A)。为获得性质均一

的蛋白质样品,我们又将获得的样品浓缩至1 mL后,以0.4 mL/min的流速进行Superose™6 10/300 GL凝胶过滤层析,最终得到了性质均一,并且组分齐全、比例合适的样品,目的蛋白质在Superose™6 10/300 GL分子筛上大量被洗脱的体积为15.16 mL(图2B),经SDS-PAGE检测对应出峰位置的蛋白质样品组成情况,可以证明蛋白质样品纯度较高、组分齐全且比例合适(图2C)。



**Note:** A. Two-step affinity purification of Shelterin complex. L—lysate; S—supernatant; FT<sub>1</sub>—Ni-NTA flow through; W<sub>1</sub>—Ni-NTA buffer wash; E<sub>1</sub>—Ni-NTA elution; U—6 h ULP1 digestion; FT<sub>2</sub>—glutathione sepharose flow through; E<sub>2</sub>—supernatant after GST-3C digestion. B. Gel filtration chromatography profile of the Shelterin complex on Superose™6 10/300 GL column. C. Fractions corresponding to the peaks in the gel-filtration profile examined by Coomassie blue staining of SDS-PAGE. The corresponding elution volumes (mL) are marked above each lane. Be—sample before Superose™6 10/300 GL gel filtration chromatography.

图2 裂殖酵母 Shelterin 复合物的体外表达与纯化

Fig 2 Expression and purification of *S. pombe* Shelterin complex *in vitro*

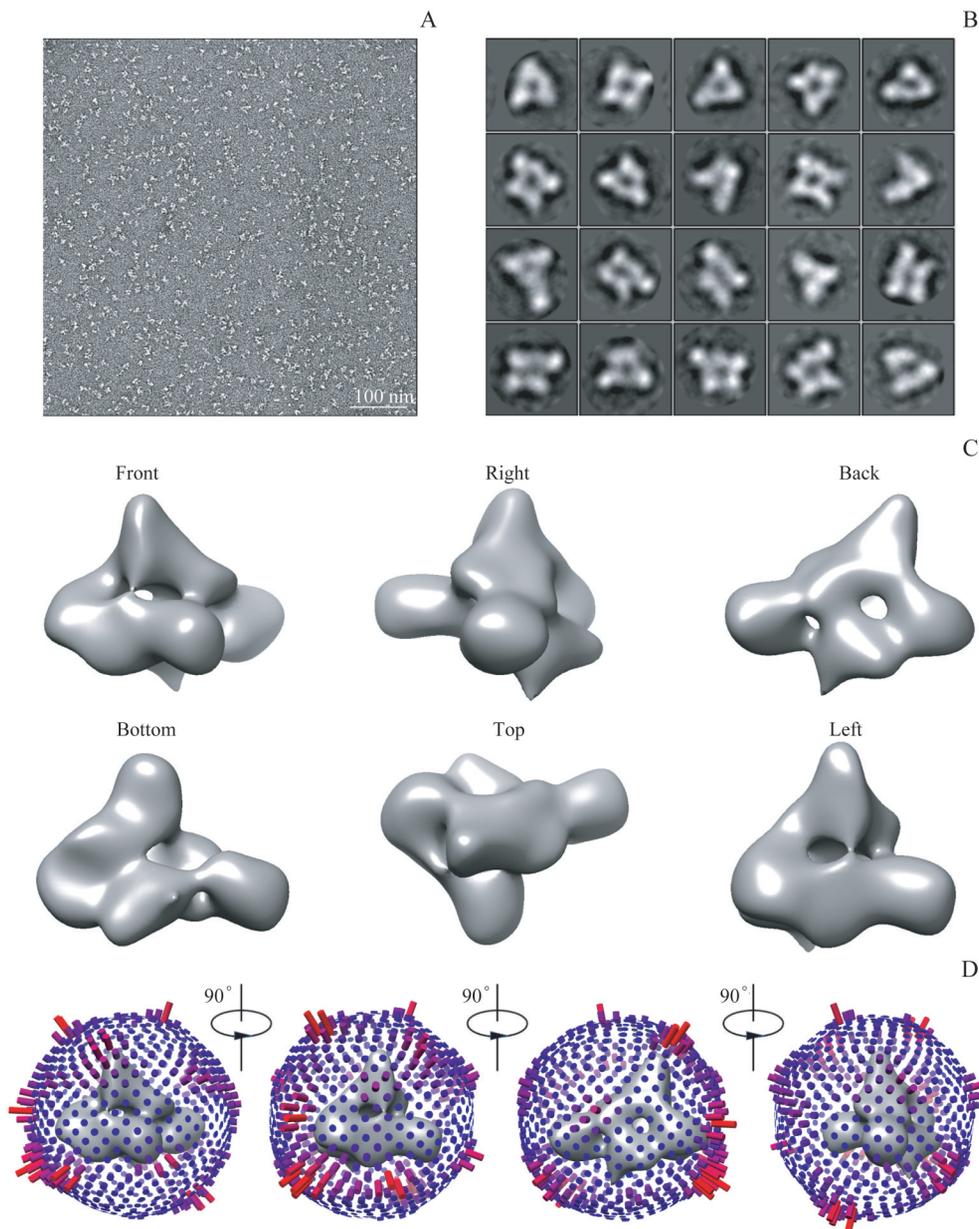
### 2.2 电镜数据收集与处理

从120 kV电镜的视野下观察被甲酸双氧铀覆盖的样品,可以看见,蛋白质颗粒的形态被染盐衬托得较为清晰,颗粒与颗粒之间的距离合适。颗粒直径约为15 nm,结合凝胶过滤层析结果,推测所纯化出的复合物为二聚体。在视野中能看见存在不同角度投影的形态信息,这说明蛋白质颗粒的多角度数据都能被收集(图3A)。可以通过后期的数据计算,获得较为立体的颗粒结构信息。在92 000倍的放大倍数下,每张照片采集间隔2 μm的距离,收集到负染图片83张,用EMAN2软件<sup>[26]</sup>挑选了18 659个颗粒,然后使用Relion3.0软件<sup>[27]</sup>对所有的颗粒进行2D分类(图3B)、初始模型构建、以及3D分类和3D优化处理获得Shelterin五元复合物的负染三维结构模型。使用USCF Chimera软件对计算出的模型进行评测,可以看出目的蛋白质颗粒结构特征明显,三维重构效果良好(图3C),挑选出的颗粒角度分布均匀(图3D)。

### 2.3 Shelterin复合物结构初步分析

3D分类后的每个分组的颗粒个数基本均匀,选择其中结构形态各部分过渡最均匀的为模版进行优化处理,最终获得一个分辨率为17 Å(1 Å=0.1 nm)的三维模型(图4A),整个蛋白质复合物大小为145 Å×120 Å×110 Å(图4B)。然后我们利用USCF Chimera软件<sup>[28]</sup>将PDB数据库<sup>[29]</sup>中已有的裂殖酵母相关高分辨率Shelterin亚复合物的结构与我们获得的模型进行拟合和匹配。

根据近年来发表的多种裂殖酵母 Shelterin 亚复合物的结构信息可以得知:① Rap1<sub>PBM</sub>-Poz1-Tpz1<sub>PBM</sub>可以通过Poz1的N端前2个α螺旋形成反向平行的二聚体<sup>[19]</sup>。②在Ccq1<sub>2-439</sub>-Tpz1<sub>406-508</sub>-Poz1<sub>FL</sub>复合物中通过基于双琥珀酰亚胺亚砷(disuccinimidyl sulfoxide, DSSO)的交联质谱分析鉴定出Ccq1的N端(氨基酸残基:2~439)与Poz1之间有广泛的相互作用<sup>[30]</sup>,并且在Tpz1组分中与Ccq1以及Poz1产生相互作用的2个结构域Tpz1<sub>CBM</sub>、Tpz1<sub>PBM</sub>紧密相



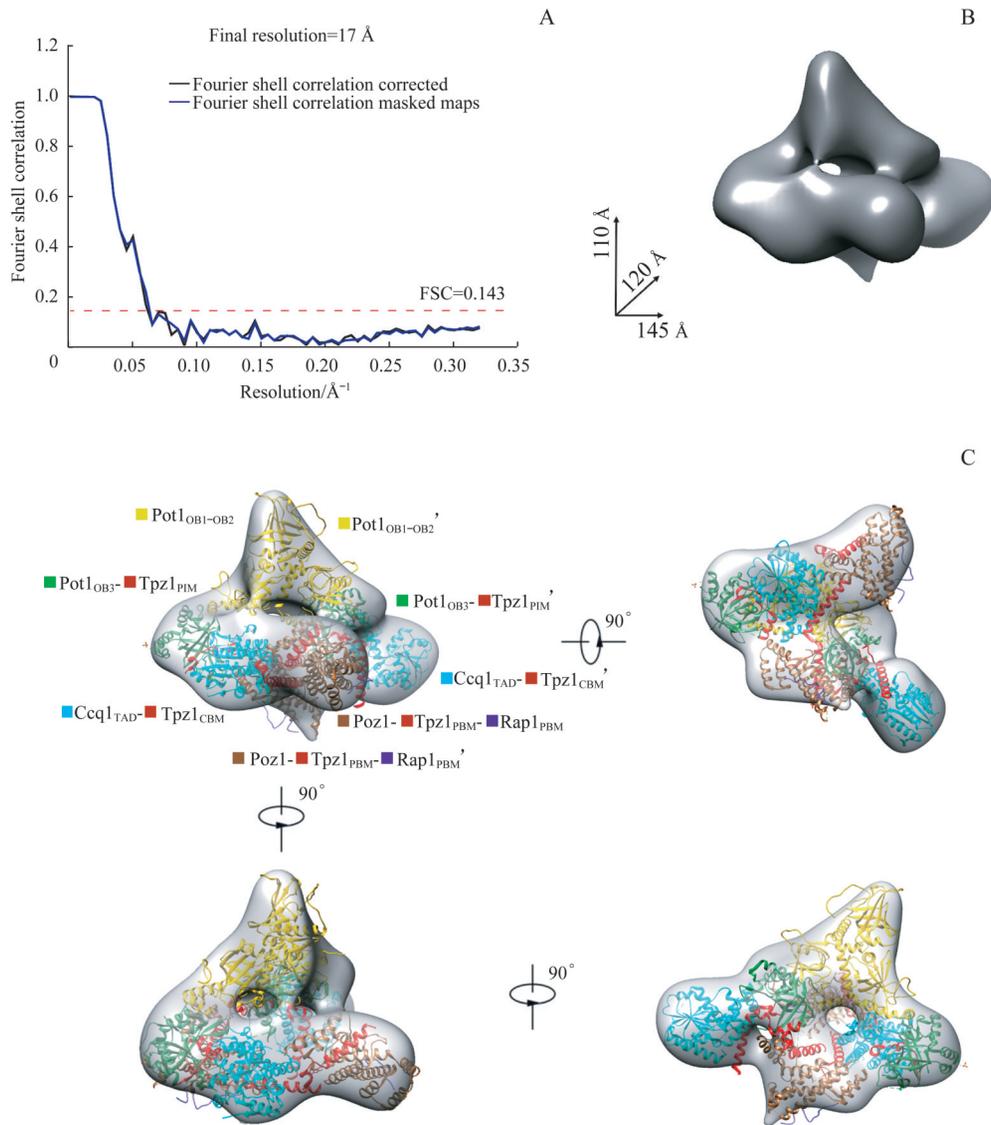
**Note:** A. A representative negative-staining (NS) image of the *S. pombe* Shelterin quinary complex (Rap1-Poz1-Tpz1-Ccq1-Pot1). Scale bar=100 nm. B. Representative reference-free 2D class averages of the particles of Shelterin complex extracted from NS images. C. 3D reconstruction of Shelterin complex shown in six orthogonal views. D. Angular distribution of the selected particles used for the reconstruction of Shelterin complex. The colours represent the number of particles used for 3D reconstruction at the projection angle. The closer the colour is to red, the more particles there are; the closer the colour is to blue, the less particles there are.

**图3 Shelterin 复合物的负染电镜分析结果**

**Fig 3** Negative-staining electron microscopy analysis of Shelterin complex

邻。这说明, Ccq1 与 Poz1 组分在空间位置上相近。  
③ 有相关的负染电镜结果表明, 在 Ccq1<sub>2-439</sub>-Tpz1<sub>406-508</sub>-Poz1<sub>FL</sub> 二聚体中, 2 个 Ccq1 组分由于缺失 C 端结构域, 会采取相对自由的取向<sup>[30]</sup>。所以, 在我们进行匹配的模型中, 将 2 个 Poz1-Tpz1<sub>PBM</sub> 组分放在空间结构上接近的位置, 2 个 Ccq1<sub>TAD</sub> 分别放在与 2 个 Poz1 相近的位置。然后, 由于 Tpz1<sub>PIM</sub> 和 Tpz1<sub>CBM</sub> 通过 (GGS)<sub>2</sub> 肽段连接, 所以在匹配过程中

我们将与 Tpz1<sub>PIM</sub> 有相互作用的 Pot1<sub>OB3</sub>-Tpz1<sub>PIM</sub>, 以及与 Tpz1<sub>CBM</sub> 有相互作用的 Ccq1<sub>TAD</sub>-Tpz1<sub>CBM</sub> 放置在相近的位置。最后, 将 Pot1<sub>OB1-OB2</sub> 组分放置在整个结构中相对独立、占比大、且有对称倾向的“三角形”的两边。从分子对接结果可以说明所有高分辨率结构与重构模型匹配情况良好, 进而大致确定了各亚基在重构模型中的相对位置 (图 4C)。



**Note:** A. Gold standard Fourier shell correlation (FSC) curve of the final reconstructed electron micrograph map of Shelterin quinary complex. B. Volume size of the Shelterin complex. C. Docking of the atomic structures of Pot1<sub>OB3</sub>-Tpz1<sub>PIM</sub>, Rap1<sub>PBM</sub>-Poz1-Tpz1<sub>PBM</sub>, Tpz1<sub>CBM</sub>-Ccq1<sub>TAD</sub>, and Pot1<sub>OB1-OB2</sub> complexes into the NS-electron microscopic structure of the Shelterin complex in four orthogonal views.

图4 Shelterin 复合物三维重构模型和各亚基的分子对接情况

Fig 4 3D reconstruction of the Shelterin complex and docking of solved structures into the overall envelope

### 3 讨论

Shelterin 复合物是结合在真核生物端粒区域, 维持基因组稳定的重要复合物<sup>[2]</sup>。它保护端粒, 防止其被识别为双链 DNA 而发生断裂, 并能够调控端粒酶的结合<sup>[3]</sup>, 保证端粒 DNA 复制正常进行<sup>[4]</sup>。正由于 Shelterin 复合物在端粒末端保护方面的重要性, 其组分缺失、突变<sup>[31]</sup>或是复合物组分间相互作用的破坏<sup>[16]</sup>都会造成端粒功能紊乱, 导致基因组稳定性被严重破坏, 进而导致疾病的发生。

最近几十年以来, 研究人员已经从进化上、功能上、结构上对多种生物的 Shelterin 复合物开展了广泛

的研究<sup>[3,11,32]</sup>。这些研究的成果对帮助我们理解端粒末端稳态调控的具体机制提供了宝贵的理论依据。但是到目前为止, 由于 Shelterin 复合物分子量巨大, 并且在结构上具有高度的可变性, 所以尚未有完整的复合物的结构被解析出来。而 Shelterin 复合物行使调控端粒异染色质形成<sup>[33]</sup>以及端粒酶结合等功能<sup>[34]</sup>, 都要依赖于复合物的正确组装。所以, 对 Shelterin 复合物整体结构的解析, 将会更全面地阐明其与端粒 DNA 结合的情况, 解释 Shelterin 整体复合物的组装机制, 从而便于从整体上来认识 Shelterin 复合物的功能。

我们之前的工作解析了裂殖酵母 Shelterin 三元复

合物 (Rap1-Poz1-Tpz1) 的晶体结构<sup>[19]</sup>, 本研究在此基础上采用在体外表达并重组裂殖酵母 Shelterin 复合物的方法, 首次获得了一个裂殖酵母 Shelterin 五元复合物 (Rap1-Poz1-Tpz1-Ccq1-Pot1) 的低分辨率结构。我们对已有的高分辨率复合物组装方式进行分析, 并将这些高分辨率结构与我们获得的重构模型进行分子对接, 大致确定了各组分在整个复合物中的分布情况。另外, 我们的凝胶过滤层析结果与结构模型直接说明了该复合物是一个二聚体, 这对复

合物高分辨率结构的解析和组装机制的揭示有重要的意义, 也对理解 Shelterin 复合物发挥功能的分子机制提供了重要线索。但为了解析复合物组分间具体的相互作用情况, 我们还需要获得更高分辨率的结构信息。接下来, 我们还需要着手筛选适合冷冻观察 Shelterin 复合物的条件, 用冷冻电镜来分析裂殖酵母 Shelterin 复合物的结构, 获得复合物的高分辨率信息, 以更加精细地揭示 Shelterin 复合物发挥各项调节作用的结构基础。

## 参·考·文·献

- [1] CECH T R. Beginning to understand the end of the chromosome[J]. Cell, 2004, 116(2): 273-279.
- [2] DE LANGE T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres[J]. Genes Dev, 2005, 19(18): 2100-2110.
- [3] DE LANGE T. Shelterin-mediated telomere protection[J]. Annu Rev Genet, 2018, 52: 223-247.
- [4] CICCONE A, CHANG S. Shelterin and the replisome: at the intersection of telomere repair and replication[J]. Curr Opin Genet Dev, 2020, 60: 77-84.
- [5] BHARI V K, KUMAR D, KUMAR S, et al. Shelterin complex gene: prognosis and therapeutic vulnerability in cancer[J]. Biochem Biophys Rep, 2021, 26: 100937.
- [6] LIM C J, CECH T R. Shaping human telomeres: from shelterin and CST complexes to telomeric chromatin organization[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021, 22(4): 283-298.
- [7] PATEL T N, VASAN R, GUPTA D, et al. Shelterin proteins and cancer[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(8): 3085-3090.
- [8] AUGEREAU A, TKINT DE ROODENBEKE C, SIMONET T, et al. Telomeric damage in early stage of chronic lymphocytic leukemia correlates with shelterin dysregulation[J]. Blood, 2011, 118(5): 1316-1322.
- [9] SASA G S, RIBES-ZAMORA A, NELSON N D, et al. Three novel truncating *TINF2* mutations causing severe dyskeratosis congenita in early childhood[J]. Clin Genet, 2012, 81(5): 470-478.
- [10] SMITH E M, PENDLEBURY D F, NANDAKUMAR J. Structural biology of telomeres and telomerase[J]. Cell Mol Life Sci, 2020, 77(1): 61-79.
- [11] CHEN Y. The structural biology of the shelterin complex[J]. Biol Chem, 2019, 400(4): 457-466.
- [12] CHEN Y, YANG Y T, VAN OVERBEEK M, et al. A shared docking motif in TRF1 and TRF2 used for differential recruitment of telomeric proteins[J]. Science, 2008, 319(5866): 1092-1096.
- [13] HOFFMAN C S, WOOD V, FANTES P A. An ancient yeast for young geneticists: a primer on the *Schizosaccharomyces pombe* model system[J]. Genetics, 2015, 201(2): 403-423.
- [14] ALLSHIRE R C, EKWALL K. Epigenetic regulation of chromatin states in *Schizosaccharomyces pombe*[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015, 7(7): a018770.
- [15] KANO H, ISHIKAWA F. Composition and conservation of the telomeric complex[J]. Cell Mol Life Sci, 2003, 60(11): 2295-2302.
- [16] LIU J Q, YU C, HU X C, et al. Dissecting fission yeast shelterin interactions via MICRO-MS links disruption of shelterin bridge to tumorigenesis[J]. Cell Rep, 2015, 12(12): 2169-2180.
- [17] ALTSCHULER S E, CROY J E, WUTTKE D S. A small molecule inhibitor of Pot1 binding to telomeric DNA[J]. Biochemistry, 2012, 51(40): 7833-7845.
- [18] BEREI J, ECKBURG A, MILIAVSKI E, et al. Potential telomere-related pharmacological targets[J]. Curr Top Med Chem, 2020, 20(6): 458-484.
- [19] XUE J, CHEN H W, WU J, et al. Structure of the fission yeast *S. pombe* telomeric Tpz1-Poz1-Rap1 complex[J]. Cell Res, 2017, 27(12): 1503-1520.
- [20] LEI M, PODELL E R, BAUMANN P, et al. DNA self-recognition in the structure of Pot1 bound to telomeric single-stranded DNA[J]. Nature, 2003, 426(6963): 198-203.
- [21] KIM J K, LIU J Q, HU X C, et al. Structural basis for shelterin bridge assembly[J]. Mol Cell, 2017, 68(4): 698-714. e5.
- [22] FAIRALL L, CHAPMAN L, MOSS H, et al. Structure of the TRFH dimerization domain of the human telomeric proteins TRF1 and TRF2[J]. Mol Cell, 2001, 8(2): 351-361.
- [23] LEI M, PODELL E R, CECH T R. Structure of human POT1 bound to telomeric single-stranded DNA provides a model for chromosome end-protection[J]. Nat Struct Mol Biol, 2004, 11(12): 1223-1229.
- [24] CHEN C, GU P L, WU J, et al. Structural insights into POT1-TPP1 interaction and POT1 C-terminal mutations in human cancer[J]. Nat Commun, 2017, 8: 14929.
- [25] KIM S H, DAVALOS A R, HEO S J, et al. Telomere dysfunction and cell survival: roles for distinct TIN2-containing complexes[J]. J Cell Biol, 2008, 181(3): 447-460.
- [26] TANG G, PENG L W, BALDWIN P R, et al. EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy[J]. J Struct Biol, 2007, 157(1): 38-46.
- [27] SCHERES S H W. RELION: implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination[J]. J Struct Biol, 2012, 180(3): 519-530.
- [28] PETERSEN E F, GODDARD T D, HUANG C C, et al. UCSF Chimera: a visualization system for exploratory research and analysis[J]. J Comput Chem, 2004, 25(13): 1605-1612.
- [29] BURLEY S K, BERMAN H M, KLEYWEGT G J, et al. Protein data bank (PDB): the single global macromolecular structure archive[J]. Methods Mol Biol, 2017, 1607: 627-641.
- [30] SCOTT H, KIM J K, YU C, et al. Spatial organization and molecular interactions of the *Schizosaccharomyces pombe* Ccq1-Tpz1-Poz1 shelterin complex[J]. J Mol Biol, 2017, 429(19): 2863-2872.
- [31] SAVAGE S A, GIRI N, BAERLOCHER G M, et al. TINF2, a component of the shelterin telomere protection complex, is mutated in dyskeratosis congenita[J]. Am J Hum Genet, 2008, 82(2): 501-509.
- [32] MYLER L R, KINZIG C G, SASI N K, et al. The evolution of metazoan shelterin[J]. Genes Dev, 2021, 35(23/24): 1625-1641.
- [33] WANG J Y, COHEN A L, LETIAN A, et al. The proper connection between shelterin components is required for telomeric heterochromatin assembly[J]. Genes Dev, 2016, 30(7): 827-839.
- [34] LIU J Q, HU X C, BAO K H, et al. The cooperative assembly of shelterin bridge provides a kinetic gateway that controls telomere length homeostasis[J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(14): 8110-8119.

[收稿日期] 2021-12-27

[本文编辑] 瞿麟平

