

단 보

효모에서 텔로미어 재조합을 관찰하기 위한 새로운 유전학적 연구방법의 개발

김민규 · 배성호*

인하대학교 자연과학대학 생명과학과

Development of a novel genetic assay for telomere recombination in *Saccharomyces cerevisiae*

Min-Kyu Kim and Sung-Ho Bae*

Department of Biological Sciences, College of Natural Science, Inha University, Incheon 22212, Republic of Korea

(Received December 23, 2015; Revised February 24, 2016; Accepted March 7, 2016)

ABSTRACT: Stable maintenance of telomere is required for cell proliferation and survival. Although telomerase is the primary means for telomere maintenance, recombination is another important pathway to maintain telomeres. In this study, we developed a genetic assay for telomere recombination using the internal TG₁₋₃ repeats present in subtelomeric regions of yeast. The recombination frequencies were dependent on the presence of the internal TG₁₋₃ repeats. PCR amplification of the regions near *URA3* and *CAN1* markers using genomic DNA isolated from FOA^r Can^r colonies indicated that each isolate had lost the chromosome end including the markers. In addition, the recombination frequencies increased with longer internal TG₁₋₃ repeats. Our results suggest that the FOA^r Can^r colony formation is the consequence of recombination between the internal and terminal TG₁₋₃ repeats.

Key words: assay for telomere recombination, telomere, telomere recombination, yeast telomere

텔로미어(telomere)는 염색체 말단부분의 DNA 복제가 완결되도록 할 뿐만 아니라 염색체 말단이 분해되거나 서로 융합되는 것을 방지함으로써 진핵생물의 염색체를 안정적으로 유지하는데 필수적인 역할을 한다. 텔로미어의 이러한 기능, 특히 염색체 말단을 보호하는 기능은 거의 전적으로 텔로미어 결합단백질들에 의해 발휘된다(Webb *et al.*, 2013). 만약 텔로미어 결합단백질들이 없다면 DNA 손상에 의한 double-stranded DNA break (DSB)와 정상적인 텔로미어 말단의 구분이 어려워져 DSB 수선 기구가 텔로미어 말단을 수선하게 되면 염색체 융합이 일어나게 될 것이다. 진핵생물에서 DSB의 수선은 주로 상동재조합(homologous recombination, HR)이나 nonhomologous end joining (NHEJ)에 의해 일어나게 되는데(Paques and Haber, 1999), 텔로미어 결합단백질들이 이러한 DSB 수선으로부터 텔로미어 말단을 보호하고는 있지만, 텔로미어에서 상동재조합이나 NHEJ가 전혀 일어나지 않는 것은 아니다(Doksani and

de Lange, 2014). 예를 들어, 많은 인간의 암세포는 telomerase 활성을 회복하여 텔로미어 길이를 유지한다. 그러나 약 10% 정도의 암세포에는 telomerase 활성이 결핍되어 있는데, 이러한 세포들은 상동재조합을 이용한 alternative lengthening of telomeres (ALT) 과정을 통해 텔로미어를 유지한다(Draskovic and Londono-Vallejo, 2014). 발아효모에서도 텔로미어 재조합이 관찰된다. 효모에서 telomerase 활성에 필요한 유전자를 결손 시키면 텔로미어 길이는 점진적으로 짧아지게 되고 대부분의 세포는 죽게 된다. 그러나 일부 세포들은 텔로미어 재조합 과정을 통하여 텔로미어를 유지함으로써 살아남게 된다(Teng and Zakian, 1999). 한편, 텔로미어 길이가 짧아지게 되는 텔로미어 재조합도 효모에서 포유동물 세포에 이르기까지 널리 관찰된다. Telomere rapid deletion (TRD)이라고 알려진 이 과정은 단일 텔로미어 내에서 telomere-loop (t-loop)과 동일한 구조를 형성한 후 상동재조합 효소들에 의해 Holliday junction이 분리됨으로써 일어난다(Lustig, 2003).

대부분의 진핵생물에서 텔로미어 반복서열은 guanosine 잔기가 반복적으로 풍부하게 존재한다. 인간 텔로미어는 GGGTTA

*For correspondence. E-mail: sbae@inha.ac.kr;
Tel.: +82-32-860-7712; Fax: +82-32-874-6737

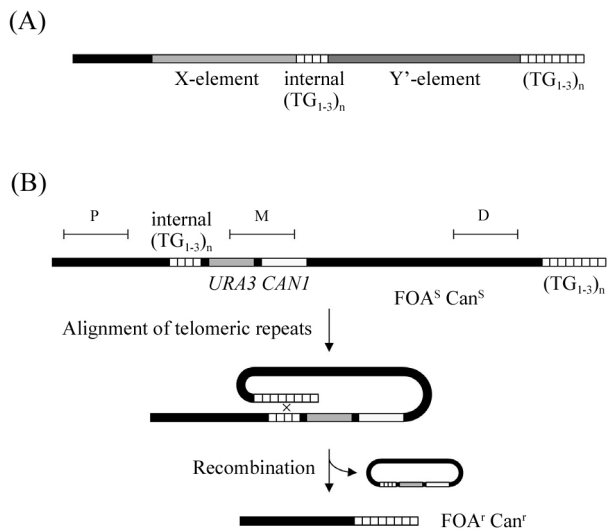


Fig. 1. DNA structure of yeast telomeres and assay for telomere recombination. (A) Schematic representation of the subtelomeric X and Y' elements as well as the terminal and internal TG₁₋₃ repeat sequences. (B) The internal TG₁₋₃ repeat sequence and URA3 marker were inserted into the upstream region of CAN1, and the resulting strains became FOA^S Can^S. Recombination between the internal and terminal telomeric repeats results in deletion of both URA3 and CAN1 markers, and the recombinants become FOA⁺ Can^r. P (proximal), M (marker), and D (distal) indicate the regions amplified by PCR in Fig. 2B.

가 규칙적으로 반복되는 서열을 갖는 반면, 효모의 경우 TG₁₋₃가 불규칙적으로 반복되는 특징이 있다(Wellinger and Zakian, 2012). 즉, 반복되는 G가 1-3개로 불규칙하다. 그리고 말단의 텔로미어 반복서열에 인접하여 내부에 존재하는 잘 보존된 Y' 과 X 인자(element)가 나타난다. Y' 인자는 0-4개가 반복되는 데, 32개의 효모 텔로미어 말단 중 약 절반 정도는 Y' 인자를 가지고 있지 않다. 그러나 X 인자는 모든 텔로미어에 존재한다. 그리고 특이하게도 일부 효모 텔로미어에는 Y' 과 X 사이 또는 Y' 과 Y' 사이에 내부 TG₁₋₃ 반복서열이 나타나기도 한다(Fig. 1A).

텔로미어 재조합을 관찰할 수 있는 수단은 매우 제한적이다. 염색체 말단에 존재하는 동일한 텔로미어 반복서열 사이

의 재조합 결과로 특정 유전적 marker의 변화를 일으키는 것이 불가능하기 때문에, 염색체 내부에 삽입한 텔로미어 반복서열 근처에 인위적인 DSB를 일으켜 재조합을 관찰하거나 telomerase 유전자를 결손 시킨 후 텔로미어가 재생되는 것을 관찰하는 것이 일반적인 방법이다. 그러나 정상적인 효모 텔로미어의 재조합을 관찰할 수 있는 유전학적 방법은 아직 개발되어 있지 않다.

본 연구에서는 효모의 텔로미어 내부에 TG₁₋₃ 반복서열이 존재한다는 것에 착안하여 내부 TG₁₋₃ 반복서열과 말단 TG₁₋₃ 반복서열 사이에 TRD와 유사한 과정으로 상동재조합이 일어날 수 있을 것으로 예상하고 이를 관찰할 수 있는 방법을 고안하였다(Fig. 1B). 이를 위하여 URA3와 CAN1 두 가지 marker를 사용하여 gross chromosomal rearrangement 빈도를 측정하는 기존의 방법(Chen and Kolodner, 1999)을 응용하였다. 만약 자연발생적인 돌연변이 빈도가 재조합 빈도보다 더 높으면 한 개의 marker만을 사용하였을 때 실험이 불가능하기 때문에 두 가지 marker를 사용하였다. 효모의 5번 염색체 왼쪽 말단에 위치한 CAN1 유전자 근처에 URA3 marker와 TG₁₋₃ 반복서열을 삽입한 균주를 제조하였다. URA3와 CAN1의 돌연변이는 각각 5-fluoroorotic acid (FOA)와 canavanine에 내성을 갖게 하기 때문에 효모에서 매우 유용한 marker로 사용되는데, 자연발생적인 돌연변이가 이 두 marker에 동시에 생길 확률은 매우 낮지만 텔로미어 재조합에 의해 내부와 말단 TG₁₋₃ 반복서열 사이에 광범위한 결손이 일어나면 FOA와 canavanine에 동시에 내성을 갖는 콜로니가 비교적 높은 빈도로 나타날 수 있을 것이다(Fig. 1B).

실험에 사용한 모든 효모 균주는 YPH499 (MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1) (Sikorski and Hieter, 1989)에서 유래되었으며 Table 1에 나타내었다. 효모 배양에 사용한 완전배지(YPD)와 최소배지(synthetic complete, SC)는 Chris 등(1994)의 방법을 따랐다. 염색체의 특정 위치에 유전자 marker를 삽입하기 위해서는 one-step gene replacement 방법(Baudin et al., 1993)을 사용하였다. 제조한 모든 균주는

Table 1. Yeast strains used in this study

Strain	Genotype	References
YPH499	MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1	Sikorski and Hieter (1989)
YMK17	MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1 chr V::(TG ₁₋₃) ₂₆ ^a -URA3-CAN1	This study
YMK18	MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1 chr V::URA3-CAN1	This study
YMK31	MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1 chr V::(TG ₁₋₃) ₁₂ -URA3-CAN1	This study
YMK33	MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1 chr V::(TG ₁₋₃) ₄₇ -URA3-CAN1	This study

^a The lengths of (TG₁₋₃)₁₂, (TG₁₋₃)₂₆, and (TG₁₋₃)₄₇ repeats are 30-, 70-, and 123-bp, respectively.

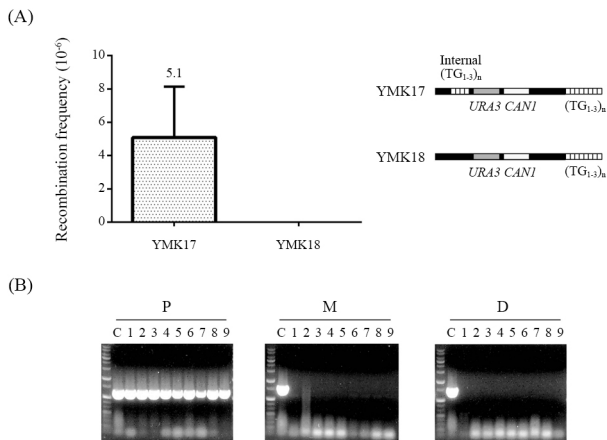


Fig. 2. Telomere recombination is dependent on the presence of internal telomeric repeats. (A) Measurement of the internal TG_{1-3} repeat-dependent telomere recombination frequencies. The recombination frequencies in the presence (YMK17) or absence (YMK18) of the internal TG_{1-3} repeat are shown in the left. Schematic representations of the $(TG_{1-3})_n$ - $URA3$ - $CAN1$ region of YMK17 and YMK18 are shown in the right. The average and standard deviations from ten independent experiments are presented. (B) PCR amplification of P, M, and D regions indicated in Fig. 1B using genomic DNA isolated from the FOA^+ Can^+ colonies. C denotes the FOA^+ Can^+ strain, YMK17.

marker가 정확한 위치에 삽입되었는지 PCR 방법으로 확인하였다.

Fig. 1B와 같은 염색체 구조를 가진 균주들은 다음과 같은 방법으로 제조되었다. 우선 다양한 길이의 TG_{1-3} 반복서열 (30-, 70-, 123-nt)을 갖는 oligonucleotide와 이에 상보적인 oligonucleotide를 합성하고 이들을 서로 annealing하여 이중 가닥 DNA를 얻었다. 그리고 $URA3$ 유전자를 plasmid pRS314의 $SpeI$ - $NotI$ 자리에 클로닝하여 pRS314- URA 를 제조한 후, 합성한 TG_{1-3} 반복서열 DNA를 pRS314- URA 의 $EcoRI$ - $BamHI$ 자리에 클로닝하여 pRS314- $(TG_{1-3})_n$ - URA 를 얻었다. 이렇게 제조한 plasmid의 $(TG_{1-3})_n$ - URA 부위를 PCR 증폭하고, one-step gene replacement 방법으로 $CAN1$ 유전자와 인접한 부위에 삽입하여 YMK17, YMK31, YMK33 균주를 얻었다(Table 1).

$URA3$ 와 $CAN1$ marker만을 가진 균주 YMK18과 70 bp의 내부 TG_{1-3} 반복서열을 가진 YMK17을 uracil을 포함한 SC 배지에서 24시간 배양한 후 FOA 와 $canavanine$ 을 포함한 SC 배지에 도말하여 생성되는 콜로니 수를 측정하였다. 배양접시 1개당 약 10^8 개의 효모 세포를 도말하였으며 총 10번의 실험을 독립적으로 수행하였다. 내부 TG_{1-3} 반복서열을 가진 YMK17의 경우 약 5×10^{-6} 의 비교적 높은 빈도로 FOA 와 $canavanine$ 모두에 내성이 있는 콜로니(FOA^+ Can^+)가 생성되는 반면, 내부 TG_{1-3} 반복서열이 없는 YMK18에서는 콜로니가 전혀 생성되

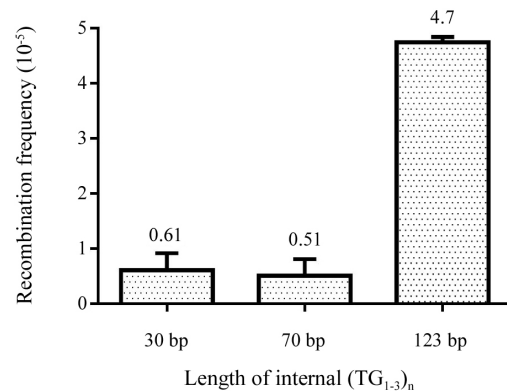


Fig. 3. Effect of the internal TG_{1-3} repeat length on telomere recombination. The telomere recombination frequencies were compared between the strains containing different lengths of internal TG_{1-3} repeats. The strains YMK33, YMK17, and YMK31 contain the internal TG_{1-3} repeats of 30, 70, and 123 bp in length, respectively. The average and standard deviations from ten independent experiments are presented ($P < 0.001$).

지 않았다(Fig. 2A). FOA^+ Can^+ 콜로니가 생성되기 위해서 내부 TG_{1-3} 반복서열이 필요하다는 것은 Fig. 1B에서 제안한 것과 같은 방식의 텔로미어 재조합에 의해 FOA^+ Can^+ 콜로니가 생성된다는 것을 암시하는 결과이다. Fig. 1B와 같은 재조합이 일어나면 $URA3$ $CAN1$ 유전자 부위에 광범위한 결손이 일어나야 하므로 이를 확인하기 위하여 PCR 방법을 사용하였다. 각각의 FOA^+ Can^+ 콜로니들을 액체 배지에서 배양하여 DNA를 추출한 후 Fig. 1B에 표시된 지역(P, M, D)을 증폭할 수 있는 primer들을 사용하여 PCR을 수행하였다(Fig. 2B). 대조군으로 FOA^+ Can^+ 인 YMK17 DNA를 사용하였을 때는 P, M, D 지역 모두 PCR 산물이 관찰되었으나, FOA^+ Can^+ 콜로니에서 추출한 DNA를 사용하였을 때는 P 지역에서만이 PCR 산물이 생성되고 나머지 지역에는 PCR이 전혀 일어나지 않았다. 이는 앞에서 예상한 대로 $URA3$ $CAN1$ 유전자 부위를 포함한 염색체 말단이 결손 되었다는 것을 뒷받침하는 결과이다.

일반적으로 상동인 DNA 부분이 길수록 상동재조합이 더 잘 일어나므로, FOA^+ Can^+ 콜로니 생성이 텔로미어 재조합에 의한 결과라면 내부 TG_{1-3} 반복서열의 길이가 FOA^+ Can^+ 콜로니 생성 빈도에 영향을 주어야 할 것이다. 이를 검증하기 위하여 내부 TG_{1-3} 반복서열의 길이가 서로 다른 균주를 제조하여 FOA^+ Can^+ 콜로니 생성 빈도를 측정하였다. 그 결과, 반복서열의 길이가 30 bp일 때와 70 bp일 때는 큰 차이가 없었으나 123 bp로 길어졌을 때는 거의 10배 가까이 재조합 빈도가 증가하는 것을 관찰하였다(Fig. 3). 상동재조합을 위해서는 보통 상동인 부분이 수백 bp 이상 필요하다(Heyer, 2015). 따라서 텔로미어 재조합 빈도가 반복서열 길이에 비례하지 않는 것은 아

마도 30 bp와 70 bp의 반복서열이 안정적인 상동재조합을 매개하기에는 너무 짧기 때문에 추측된다. 반면, 123 bp의 반복서열은 텔로미어 재조합에 비교적 충분한 상동성을 제공하기 때문에 재조합 빈도가 급격히 증가한 것으로 생각된다. 따라서 Fig. 3은 본 연구에서 관찰한 FOA^r Can^r 콜로니 생성이 텔로미어 재조합에 의한 것이라는 예상에 부합하는 결과이다.

본 연구에서는 효모 텔로미어의 독특한 구조적 특성인 내부 TG₁₋₃ 반복서열을 이용하여 텔로미어 재조합을 관찰할 수 있는 유전학적 방법을 개발하였다. 본 연구결과는 정상적인 텔로미어 DNA에서도 재조합이 일어난다는 것을 보여주고 있으며, 텔로미어 재조합에 영향을 주는 새로운 유전자들을 탐색하고 연구할 수 있는 좋은 수단을 제공할 것이다. 효모 텔로미어의 TG₁₋₃ 반복서열은 반복되는 guanosine 잔기의 개수가 불규칙하기 때문에 재조합을 위해 텔로미어 서열을 배열하면 mismatch가 많이 생기게 된다. 그럼에도 불구하고 비교적 높은 빈도로 재조합이 관찰되는 것은 예상 밖의 결과이며, 기존의 상동재조합과는 다른 새로운 재조합 과정이 존재할 가능성을 배제할 수 없다. 따라서 본 연구에서 개발한 텔로미어 재조합이 구체적으로 어떤 기전으로 일어나는지를 연구함으로써 새로운 유전자들의 기능을 밝히고 재조합에 대한 우리의 이해를 넓혀줄 것으로 기대한다.

적 요

텔로미어를 안정적으로 유지하는 것은 세포의 증식과 생존에 필수적이다. 비록 텔로미어 유지에는 telomerase가 가장 중요한 수단이지만 재조합도 텔로미어 유지를 위한 또 다른 중요한 과정으로 작용한다. 본 연구에서는 효모의 텔로미어 내부에 존재하는 TG₁₋₃ 반복서열을 이용하여 텔로미어 재조합을 관찰할 수 있는 유전학적 방법을 개발하였다. 관찰된 재조합 빈도는 내부 TG₁₋₃ 반복서열의 존재 여부에 영향을 받았으며, 생성된 FOA^r Can^r 콜로니로부터 추출한 유전체 DNA를 사용하여 URA3와 CAN1 marker 근처 부위를 PCR 증폭한 결과, 각 콜로니들은 marker를 포함한 염색체 말단 부위가 결손된 것으로 나타났다. 뿐만 아니라, 더 긴 내부 TG₁₋₃ 반복서열을 사용하였을 때 재조합 빈도는 더 증가하였다. 이러한 결과는 FOA^r Can^r 콜로니 형성이 내부와 말단의 TG₁₋₃ 반복서열 사이의 재조합에 기인한다는 것을 의미한다.

감사의 말

이 논문은 한국연구재단(NRF-2015R1D1A1A01057298)의 연구비로 수행되었음.

References

- Baudin, A., Ozier-Kalogeropoulos, O., Denouel, A., Lacroute, F., and Cullin, C. 1993. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **21**, 3329-3330.
- Chen, C. and Kolodner, R.D. 1999. Gross chromosomal rearrangements in *Saccharomyces cerevisiae* replication and recombination defective mutants. *Nat. Genet.* **23**, 81-85.
- Chris, K., Michaelis, S., and Mitchell, A. 1994. Methods in yeast genetics. pp. 207-217. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, N.Y., USA.
- Doksani, Y. and de Lange, T. 2014. The role of double-strand break repair pathways at functional and dysfunctional telomeres. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, a016576.
- Draskovic, I. and Londono-Vallejo, A. 2014. Telomere recombination and the ALT pathway: a therapeutic perspective for cancer. *Curr. Pharm. Des.* **20**, 6466-6471.
- Heyer, W.D. 2015. Regulation of recombination and genomic maintenance. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, a016501.
- Lustig, A.J. 2003. Clues to catastrophic telomere loss in mammals from yeast telomere rapid deletion. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 916-923.
- Paques, F. and Haber, J.E. 1999. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 349-404.
- Sikorski, R.S. and Hieter, P. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19-27.
- Teng, S.C. and Zakian, V.A. 1999. Telomere-telomere recombination is an efficient bypass pathway for telomere maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **19**, 8083-8093.
- Webb, C.J., Wu, Y., and Zakian, V.A. 2013. DNA repair at telomeres: keeping the ends intact. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, pii: a012666.
- Wellinger, R.J. and Zakian, V.A. 2012. Everything you ever wanted to know about *Saccharomyces cerevisiae* telomeres: beginning to end. *Genetics* **191**, 1073-1105.