

。 综述与编译。 。

端粒酶相关蛋白研究新进展

上海医科大学放射医学研究所(上海, 200032) 朱涵能 熊思东* 综述 程文英审校

摘要: 深入研究端粒酶蛋白对了解端粒酶的功能特性及相关机理, 促进肿瘤的早期诊断和治疗方法学的发展以及开拓分子放射生物学研究的新领域具有重要的指导意义。本文着重阐述了近年来报道的四膜虫端粒酶蛋白及其类似物(p80 p95 TLP1 TP1)、端粒酶的催化亚单位(p123 Est2和 hEST2)的生物学特性及相互联系。

关键词: 端粒酶 相关蛋白 生物学特性

在试图寻找细胞生长过程的末端复制问题机理中, 端粒酶是目前所知的在保持染色体末端中起重要作用的一种酶, 它属于逆转录酶家族成员, 含有 RNA 模板, 可特异地将端粒重复 DNA 加到染色体的 3端(G reider 和 Blackburn, 1985年; Blackburn, 1992年), 填补复制过程中新合成 DNA 链 5端留下的缺口^[1]。端粒酶对端粒缺损的这种修复作用, 为解释细胞的衰老、永生化和癌变机理提供了新的思路。在 60年代以前, 普遍认为体内进行复制的人细胞具有无限分裂的能力, 而 Hayflick 的实验证明这种观点是错误的, 新生儿的体细胞一般在培养中分裂 80至 90次, 而来自 70岁老人的体细胞则只分裂 20至 30次。Hastie 的研究小组发现, 在某些正常人组织内的端粒随着人的老化而缩短, 通过追踪人细胞失去的端粒重复数, 可计数它们的分裂次数, 这表明细胞染色体的衰老是由于染色体末端端粒在每次复制过程中的缺损所造成。1989年, 耶鲁大学的 Morin 首次在人的癌细胞系中发现了端粒酶。1997年, Shay^[2]对 3 500例肿瘤和正常对照中端粒酶检查结果的调查表明, 绝大多数肿瘤细胞含有端粒酶, 除少数生殖细胞和淋巴细胞之外的大多数正常细胞均呈阴性表达。从而认为: 活化的端粒酶稳定了肿瘤细胞严重缩短的端

粒, 使过度增殖的细胞变成永生化和, 而缺乏端粒酶的细胞则很快衰老死亡。随着“端粒酶-端粒假说”的建立^[3], 人们更深入地致力于端粒酶抑制剂的研制, 以及端粒酶活性、端粒长度与细胞周期调控及与凋亡的相关机理研究, 其中端粒酶的蛋白结构和功能是上述研究的重要基础, 本文对近年来有关端粒酶相关蛋白的最新报道作一概述。

1 端粒酶蛋白基本特征

1.1 四膜虫端粒酶蛋白

1995年, Collins 等^[4, 5]首次运用联合层析、免疫沉淀及紫外交联(UV Cross-linking)技术, 分离和克隆了四膜虫端粒酶蛋白基因, 该基因编码分别为 p80和 p95两个蛋白。四膜虫端粒酶由 p80 p95二个亚单位和 159nt端粒酶 RNA 及其它分子组成, 三者之间比例为 1: 1: 1, 抗 p80抗体可特异地免疫沉淀端粒酶活性。p80和 p95各具有独特的核酸结合特性, p80与端粒酶 RNA 特异性结合, 提示此亚单位可识别 RNA 二级结构部分; 而 p95与端粒 DNA 引物的结合主要位于“锚定”的位点。如果 p80和 p95相互作用, 则 RNA 的模板序列、引物 DNA 的 3'端以及活性位点都可聚集形成可塑性结构, 构成端粒酶稳定的核糖核蛋白(RNP),

* 上海医科大学卫生部分子病毒重点实验室(上海, 200032)

在活性中心,用模板合成新的 DNA 延长产物。虽然端粒酶是以 RNA 为模板合成 DNA,其结构应为逆转录酶,但 p80和 p95不是逆转录酶类似物,p95序列仅与二种病毒逆转录酶有微弱的相似之处^[6]。

1.2 端粒酶相关蛋白 1 (telomerase-associated protein 1, TP1)

Harrington 等^[7]最近报道,人 TP1由含 8 160bp 的开放式读码框架所编码,约含 2 629个氨基酸。其 N 端三分之一处的三个区域与四膜虫 p80蛋白类同,其中区域 2 包含 90多个氨基酸片段,与 p80的同源性高达 46%; TP1序列的 C 端含有 16个 WD40重复片段。人的组织中能广泛表达 TP1 mRNA,并常常含有 8kb 和 9.5kb 的二个转录物。TP1可特异地与端粒酶 RNA 结合,与端粒酶活性密切相关。TP1的 N 端与四膜虫 p80相似的区域是端粒酶 RNA 保守的结合功能区。与 p80不同,TP1不含有锌指结构。TP1含有一个或多个促进结构,调节与端粒酶及端粒连接蛋白的相互作用。

1.3 鼠端粒酶蛋白成分 1 基因 (rat telomerase protein component 1 gene, TLP1)^[8]

TLP1也是四膜虫 p80的类似物,TLP1 cDNA 编码 2 619个氨基酸序列,在 1~ 120氨基酸序列中,有 4个重叠、高保守性的氨基酸序列,每序列含 30个氨基酸。TLP1蛋白氨基酸序列可分为 3个功能区,其中 200~ 908氨基酸区域与四膜虫端粒酶 p80组成有较高的相似性;p80有一个金属连接小功能区 C××C(277)C××C,而 TLP1无此序列。在 TLP1的 C 端至少有 16个 WD40重复序列,这可能与蛋白之间相互作用有关。TLP1包含有三种蛋白成分:p240、p230和 p55。p55是 p240和 p230的降解产物,p240、p230可调节端粒酶活性,其中 p230由 p240衍化而来,是 p240的成熟形式。在端粒酶阴性组织中,p240占主导,p230则大量存在于端粒酶阳性组织中,提示 p230与激活的端粒酶有

关,p240可能是其非活性形式。实验证明,TLP1是端粒酶的蛋白成分:(1)TLP1蛋白 p240、p230的纯化过程与端粒酶的不同分离方法和不同纯化步骤一致;(2)TLP1与端粒酶活性相关;(3)对 TLP1蛋白的修饰可表现在端粒酶的活性上。

2 端粒酶的催化亚单位

2.1 Euplotes p123和酵母 Est2蛋白

Lingner 等^[9]报道了从纤毛虫原生动物 Euplotes 中纯化出的端粒酶亚单位 p123 以及酵母中的类似亚单位 Est2。

Euplotes 的滋养核中包含有数以百万计的 DNA 分子,每个细胞有 8×10^7 个端粒^[10]和 3×10^5 端粒酶分子^[11],端粒酶的活性主要存在于滋养核的提取物中,其活性复合物特异地与端粒的 DNA 底物作用,其中的 p123 由 3 279个碱基对编码。p123 的 14个肽链都已测序。

酵母中的 Est2为 p123类似物,与 p123 的同源性为 20%,Est2和酵母的端粒酶 RNA 基因 TLP1^[12]具有相同的端粒复制途径,当 Est2和 TLP1这二个编码蛋白基因同时突变,其表现型与二者单独突变所表现出的表现型是一致的^[6]。

Euplotes p123和酵母 Est2的结构相近,保守性强,功能区部分与逆转录酶(RT)极为相似。p123和 Est2中有 3个恒定的天冬氨酸(Asp)残基,其在逆转录酶中主要存在于 A 和 C 区域,直接参与酶的催化作用,与前者是一致的。推测 p123/Est2的三维结构可能与 HIV-1逆转录酶结构类似,为右手模型,存在手指、手掌和拇指三个部分,手指部分为模板连接区,手掌区可能是活性位点,如 Est2和 p123序列中处于功能区 A 中的第 536号 Asp 保守序列发生突变,可造成大量端粒缩短,形成衰老。相比之下,非保守区中第 632号谷氨酸(Glu)被置换成丙氨酸(Ala)后,功能并不发生变化。

p80/p95和 p123/Est2的关系尚不明确,可能的解释是:(1)四膜虫端粒酶有二种蛋白种类, p80/p95和 p123/Est2 p80/p95为活性位点, p123/Est2在纯化过程中被丢失;(2)p80/p95分工于端粒合成, p123/Est2分工于端粒复制;(3)四膜虫 p80-p95-RNA复合物无活性,需要 p123/Est2存在的情况下起作用

2.2 人端粒酶催化亚单位 hEST 2

在 Est2的 p123蛋白基因序列的基础上, Meyerson等^[13]克隆了人端粒酶催化亚单位 hEST 2基因,全长 4 030bp,为单拷贝基因, hEST 2有 1 132个氨基酸,定位于染色体 5p, 15 33区域,其起始位点为 CCCGC-GAUGC,这与 Kozak的翻译起始位点相似。hEST 2含有 7个小功能区,属于逆转录酶家族中的一员。hEST 2 mRNA 与端粒酶活性密切相关

hEST 2在原发癌、肿瘤细胞株和端粒酶阳性组织中高表达,但在端粒酶阴性细胞株和高分化端粒酶组织中不表达, hEST 2与端粒酶的活性水平保持一致,如正常组织中, hEST 2可在胸腺、睾丸、小肠中检测到,其中睾丸和小肠已被确认为端粒酶阳性,而胸腺还未见报道。对一些正常细胞的 hEST 2基因转导实验,可使细胞越过第二危机期(M 2),并表达端粒酶活性。

3 展望

端粒酶蛋白及相关分子的研究,对于肿瘤病人的早期诊断和治疗有着重要意义,端粒酶蛋白抑制剂是近年研究热点,随着端粒酶蛋白序列的报道,其特异性抗体制备研究已有所发展, p80抗体已应用于实验研究^[7]。文献还报道了端粒酶蛋白的活性部位存在于蛋白序列中的逆转录酶区域^[13],最新发现的人 hEST 2蛋白基因,为研究端粒酶的活化机理和调控过程提供了条件,目前国外文献较多引用 p123 Est2和 hEST 2的结构和序列。

对端粒酶相关分子的研究仍有不确定的地方^[14-17],如有人认为端粒酶相关蛋白 TP1/TLP 1的表达不能反映端粒酶的活性水平(Harrington 1997年; Nakayama 1997年);虽然人端粒酶 RNA 组分 hTR 和它在鼠中的类似物 mTR 水平随肿瘤的发生而增加,但 hTR 不能完全解释端粒酶活性的调节机理(Feng 1995年; Blarq 1997年; Soder 1997年), hTR 和 mTR 的转录物量并不一直与端粒酶活性一致。有报道发现, hTR 和 mTR 转录水平在端粒酶阴性细胞中高表达,甚至高于端粒酶阳性的肿瘤细胞株(Avilion, 1996年; Blasco, 1996年);在肿瘤细胞的永生过程中,端粒酶水平增加 100到 2 000倍,而 hTR 最多只增加 20倍(Avilion, 1996年)。

端粒酶是当前肿瘤学领域的研究热点,端粒酶与细胞的辐射损伤修复及辐射敏感性研究关系密切^[18],端粒酶具有保持端粒长度,解决端粒末端复制问题的功能,而端粒是细胞辐射的敏感部位,端粒的断裂直接影响染色体的稳定性,最终导致细胞变异或死亡,端粒酶蛋白在此过程中的功能有待进一步研究。肿瘤病人的放射治疗过程中,端粒酶对端粒的保护作用是否影响治疗效果,也是一个有意思的课题。随着端粒酶蛋白的分离和克隆技术的发展,必将在肿瘤的发生和发展及放射生物学等相关学科研究中发挥重要的作用。

参考文献

- Greider CW et al SciAm, 1996; 274(2): 92-97
- Shay JW et al Eur J Cancer, 1997; 33(5): 787
- Harlet CB et al Mutat Res, 1997; 256 271
- Collins K et al Cell, 1995; 81: 677-686
- Seachrist L. Science, 1995; 268 29-30
- Shore D. TIBS, 1997; 22 233-235
- Harrington L et al Science, 1997; 275 973-977
- Nakayama et al Cell, 1997; 88 875-884
- Lingner J et al Science, 1997; 276 561-567

- 10 Prescott DM. Microbiol Rev, 1994; 58: 233
- 11 Lingner J et al Proc Natl Acad Sci USA, 1996; 93: 10712
- 12 Singer MS et al Science, 1994; 266: 404
- 13 Meyerson M et al Cell, 1997; 90: 785-795
- 14 Nakamura TM et al Science, 1997; 277: 955-959
- 15 Avilón AA et al Cancer Res, 1996; 56: 645-650
- 16 Basco MA et al Nat Genet, 1996; 12: 200-204
- 17 Feng J et al Science, 1995; 269: 1236-1241
- 18 Crompton M EA. Cell Mol Life Sci, 1997; 53: 568-575

(收稿日期: 1998-01-12)

比较基因组杂交技术及其应用

北京放射医学研究所(北京, 100850) 周晓综述 程书钧* 吴德昌审校

摘要: 比较基因组杂交技术是一种研究细胞系或生物标本的整个基因组 DNA 获得与缺失的非常有应用前途的分子细胞遗传学方法, 本文详细介绍了该项技术的具体操作方法, 并深入讨论了其在乳腺癌、前列腺癌、肺癌等临床肿瘤的诊断、预后、分子遗传学特性分析等方面的研究, 以及在放射生物学研究领域的应用前景。

关键词: 比较基因组杂交 DNA 拷贝数 肿瘤

1968年染色体显带技术的发明, 为全面分析染色体组成提供了强有力的工具^[1], 但由于用临床标本和肿瘤标本很难制备出高质量的、能够用于分析的中期细胞分裂相, 肿瘤细胞的染色体变化通常又比较复杂, 从而使核型分析难度加大, 阻碍了有关研究的发展; 分子生物学技术的兴起促进了肿瘤的分子遗传学研究, 但由于所采用的探针或标记只针对某一特异染色体区域或基因, 这些方法一次只能检测某一特定的基因或染色体区域的等位缺失、突变或扩增, 而不能检测大部分基因组的变化。能否不经过肿瘤细胞核型的分析, 仍可了解到整个基因组 DNA 的变化? 1992年 Kallioniemi 及其同事^[2]发明了一种新的细胞遗传学方法——比较基因组杂交 (comparative genomic hybridization, CGH) 技术可以达到此目的。本文就 CGH 技术的概念、主要操作环节及其应用作一综述。

1 比较基因组杂交技术

CGH 是一种将消减杂交和荧光原位杂

交 (FISH) 相结合, 用于检测两个基因组间相对 DNA 拷贝数变化 (缺失、复制、扩增), 并将这些异常在染色体上定位的一种新的分子细胞遗传学方法, 也可以说它是一种 DNA “拷贝数核型” (copy number karyotype)。它主要是将被检组织 (通常为肿瘤组织) DNA 和正常对照组 DNA 分别用不同颜色的荧光标记, 以相同比例与正常淋巴细胞中期分裂相进行原位杂交, 再通过检测两种颜色的荧光强度, 根据两种颜色的比率情况来显示基因组的结构状况, 如发现两种颜色比率改变, 则说明该区域存在 DNA 序列的缺失或扩增。CGH 在一次实验中即可对整个基因组进行检测, 与需要分离 DNA 并且检测染色体上的等位基因缺失 (LOH)、突变、扩增等传统分子遗传学检测手段相比, 该方法既节省了操作步骤, 又能将检测出的异常 DNA 序列在染色体上定位, 便于进一步通过 FISH 分析和定位克隆等技术筛选出相关基因。CGH 能够检测数百 kb 至数 Mb 的 DNA 扩增或缺失, 但它不能显示出染色体易位、倒位

* 中国医学科学院肿瘤研究所病因室(北京, 100022)