

- by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, 1998, **279** (5349): 349~ 352
- 18 Hoos A, Hepp H H, Kaul S, *et al.* Telomerase activity correlates with tumor aggressiveness and reflects therapy effect in breast cancer. *Int J Cancer*, 1998, **79** (1): 8~ 12
- 19 Kyo S, Takaura M, Tanaka M, *et al.* Telomerase activity in cervical cancer is quantitatively distinct from that in its precursor lesions. *Int J Cancer*, 1998, **79** (1): 66~ 70
- 20 Hoos A, Hepp H H, Kaul S, *et al.* Telomerase activity correlates with tumor aggressiveness and reflects therapy effect in breast cancer. *Int J Cancer*, 1998, **79** (1): 8~ 12
- 21 Vansteensel B, Delange T. Control of telomere length by the human telomeric protein Trf1. *Nature*, 1997, **385** (6618): 740 ~ 743
- 22 Cooper J P, Nimmo E R, Allshire R C, *et al.* Regulation of telomere length and function by a Myb domain protein in fission yeast. *Nature*, 1997, **385** (6618): 744~ 747
- 23 Shore D. Telomeres-different means to common ends. *Nature*, 1997, **385** (6618): 676~ 677

Progress in the Studies of Telomere and Telomerase.

REN Jiar-Guo, ZHOU Jun, DAI Yao-Ren
(Department of Biological Science and

Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China).

Abstract Telomeres are unique DNA-protein complexes at the terminals of chromosomes that play a critical role in protecting chromosomal integrity and in maintaining cellular replicative potential. Telomerase is a specialized reverse transcriptase, composed of both RNA and protein subunits, that elongates telomeric repeats. The changes in telomere length and telomerase activity are closely linked to cell aging and carcinogenesis. Telomere binding-protein may regulate telomere length by regulating telomerase activity, and then control cell aging, immortalization and carcinogenesis. The development of specific telomerase inhibitors will have broad prospect in the aspect of tumor therapy.

Key words telomere, telomerase, aging, immortalization, carcinogenesis

端粒结合蛋白与端粒长度调控

陈 耿 周建新 董燕麟

(第三军医大学生物化学教研室, 重庆 400038)

摘要 真核细胞端粒 DNA 序列的丢失与细胞的衰老及凋亡有关。端粒酶的激活可维持端粒长度并使细胞获得无限增殖的能力。端粒结合蛋白则可能通过调节端粒酶或其他相关因子的行为参与对端粒长度的调控。近年有关端粒结合蛋白的研究取得了突破性进展并在此基础上建立了端粒长度调控模型。

关键词 端粒, 端粒结合蛋白, 长度调控

学科分类号 Q51

端粒 (telomere) 是真核生物线形染色体末端的一种特殊的异质化结构, 在稳定染色体及防止染色体在复制时缩短方面有重要作用。其行为的异常被认为同细胞衰老及肿瘤的发生发展有密切关系。端粒酶 (telomerase) 是一种特殊的逆转录酶, 它的存在及活化一定程度上解决了长期困扰人们的“末端复制问题”^[1]。然而, 虽然端粒酶活性存在于胚系细胞、某些体细胞、许多癌细胞和所有单细胞真核生物中, 但这些细胞的端粒长度并不会持续不停地增长, 相反却维持在一定的范围内。这说明细胞中除端粒酶外, 还存在一种端粒长度的负性调控机制。近年的研究表明, 端粒结合蛋白 (telomere-binding proteins, TBP) 在该机制中可

能扮演着关键角色^[2]。本文将综述有关这方面研究的新进展。

1 TBP 概述

早在 1986 年, 人们就从尖毛虫属 (*Oxytricha*) 的巨核 DNA 中分离出了两种分子质量分别为 55 ku 和 26 ku 的端粒特异性蛋白质。迄今为止, 已经从包括人在内的多种生物中分离提纯了数十种 TBP。按照其结合部位, 一般将其分为两类: 双链 TBP (double-strand TBP, DS-TBP) 和单链 TBP (single-strand TBP, SS-TBP)。前者

与双链端粒 DNA 重复序列相结合, 后者与端粒的富 G₃' 突出单链末端结合, 故又被称为端粒末端结合蛋白 (telomere end binding proteins). 目前认为, TBP 至少有两种主要功能: a. TBP 为端粒末端提供了一个保护性的“帽”, 使其免遭化学变化和核酸酶的破坏; b. TBP 参与对端粒长度的调控, 可能通过调节某些因子 (如端粒酶) 的行为来维持端粒的稳定. 此外, 有资料表明 TBP 可能参与染色体的其他代谢过程. 不同物种的 TBP 在功能上也可能有所不同^[2,3].

2 DS-TBP 与端粒长度调控

1987 年, Shore 等^[4]通过 DNA 亲和层析法首次克隆了酵母抑制子/激活子位点结合蛋白 1 (repressor/activator site binding protein 1, RAP1), 并发现 RAP1 是一种转录调节因子. Conrad 等^[5]发现 RAP1 在体外能与酵母端粒重复序列 C₂-₃A (CA)₁₋₆结合, 在体内能与端粒相互作用. 尤其令人吃惊的是, 过量的 RAP1 反而会大大降低染色体的稳定性, 这提示 RAP1 的功能并不只局限于转录调节和保护端粒. 现已清楚, RAP1 是酵母端粒主要且必需的双链 DNA 结合蛋白, 的确与端粒长度调控有关. 酵母 *K. latis* 的 RAP1 同源物亦已分离成功.

1995 年 Chong 等^[6]首次从人 HeLa 细胞中提纯了人端粒重复序列结合因子 1 (telomeric repeat binding factor 1, TRF1), 并利用基因交互杂交 (cross hybridization) 分离了小鼠 TRF1 同源物的 cDNA. TRF1 分子质量约为 60 ku, 在细胞分裂间期特异结合端粒 DNA, 在分裂中期位于染色体末端. 序列分析发现 TRF1 含有一个 Myb 型 DNA 结合重复序列和一个氨基末端嗜酸性结构域. van Steensel 和 de Lange^[7]发现在端粒酶呈阳性的肿瘤细胞株 HT1080 中的 TRF1 的长期过度表达会导致端粒逐渐缩短. 相反, 阻止内源 TRF1 与端粒结合的显性负突变体的表达会诱导端粒延伸, 提示 TRF1 是端粒延伸的抑制者并参与维持端粒长度稳定的负反馈机制. 进一步研究表明, TRF1 对端粒酶的表达和活性没有影响. 由此推测 TRF1 通过阻止端粒酶在端粒末端的作用来控制端粒长度.

不久前 Cooper 等^[8]通过单杂交筛选法在裂殖酵母 *S. pombe* 中发现一种新的 DS-TBP: Taz1p. DNA 分析揭示其由 663 个氨基酸组成、分子质量约为 74.6 ku. 该蛋白质的羧基末端包含一个与人

TRF1 的 Myb 相关性 DNA 结合结构域同源的、由 57 个氨基酸组成的区域. taz⁺ 基因的破坏和缺失均会导致端粒长度急剧增加. 这一结果进一步证实了端粒长度负性调控机制的存在.

从结构上看, 尽管以上三种 DS-TBP 在 DNA 序列上的相似性极其有限, 但三者均在羧基末端含有与原癌基因 *c-Myb* DNA 结合基本单元 (motif) 相似的 DNA 结合结构域. 在其他一些 DS-TBP, 如酵母端粒结合因子 1 (TBF1), 部分纯化的 TRF2 和几种植物 TBP 中也发现了类似的结构域. Bilaud 等^[9]将这类特殊的 Myb 相关性基本单元称为“端粒盒子” (telobox). 推测由于 TBP 识别具有高度的序列特异性和组织上的普遍保守性, 因此 TBP 有可能采用同一类蛋白质折叠用于端粒 DNA 的识别与结合.

3 SS-TBP 与端粒长度调控

Lendvey 等^[10]在酵母 *S. cerevisiae* 中发现了 EST1 基因, 其编码一个 82 ku 的蛋白: Est1p. 研究表明 Est1p 能特异性的与酵母端粒酶 RNA 共沉淀, 且 Est1p 免疫沉淀物有类似端粒酶的活性, EST1 无效株的端粒序列逐渐丢失且出现衰老表型, 推测 Est1p 可能为酵母端粒酶的组分之一. Virta Pearlman 等也发现 EST1 基因的丢失会导致类似端粒酶 RNA 丢失的表型, 认为 EST1 对端粒酶的功能维持是必需的. 进一步实验表明 Est1p 在体外可结合于酵母端粒的富 G₃' 寡核苷酸区, 这种结合要求特异性的单链底物, 可见 Est1p 是一种端粒末端结合蛋白, 可能是端粒酶与端粒末端结合的识别位点.

酵母 CDC13 基因已被证明在端粒完整性的维持上有重要作用. Lin 和 Zakian^[11]发现 CDC13 蛋白是一种 SS-TBP 且通过直接与端粒 DNA 结合来保护染色体末端. Nugent 等^[12]进一步研究发现, 酵母 *S. cerevisiae* 中 Cdc13p 普遍与其他 SS-TBP (如 Est1p) 相互作用. Cdc13-2^{est} 突变扰乱了体内所需的端粒酶调控功能, 使得端粒酶无法接近端粒, 提示 Cdc13p 是端粒酶的正性调控因子, 可能与 Est1p 共同为端粒酶提供一个停泊位点 (docking site) 以介导端粒酶接近端粒末端.

最近 Grandin 等^[13]报告了一种与 CDC13 相关且参与端粒长度调控的基因: STN1. 双杂交分析表明 Stn1p 与 Cdc13p 存在物理性的相互作用. STN1 突变可导致端粒长度增加, 其功能丧失会激

活 RAD9 和 MEC3 G₂/M 检查点, 从而导致 DNA 被破坏. STN1 可能在 S 期晚期与 CDC13 协同调节端粒代谢.

4 端粒长度调控的负反馈模型

近 20 年来, 端粒生物学领域的一系列突破性进展使得研究者们有可能从分子水平上来探讨端粒长度的调控机制. McEachern 和 Blackburn^[14] 在深入研究酵母端粒酶 RNA 模板区突变所导致的端粒延伸失控后, 首次提出了端粒长度调控模型. 在该模型中, 序列特异性的 DS-TBP 与端粒序列直接或间接的相互作用抑制了端粒酶对端粒的延伸. 在野生型细胞中, 相对较长的端粒的末端会比较短的端粒结合更多的 DS-TBP 分子, 因而将更有可能处于一种对端粒酶作用的不应答状态. 相反, 较短的端粒比较长的端粒更容易受到端粒酶的作用. DS-TBP 可能是通过与 SS-TBP 的相互作用来阻止端粒进一步延伸的. 该模型提供了在端粒 DNA-蛋白质复合体自身水平上的端粒长度稳态调控作用的基础. Shore^[2] 对该模型作了补充. 他推测在染色体末端可能存在测定 DS-TBP 数量的装置. 当这个数量达到某个阈值时, 便产生抑制端粒酶的负反馈信号, 从而终止端粒的延伸. 当端粒缩短, DS-TBP 减少至该阈值时, 端粒酶将被重新激活, 从而导致端粒延伸 (图 1).

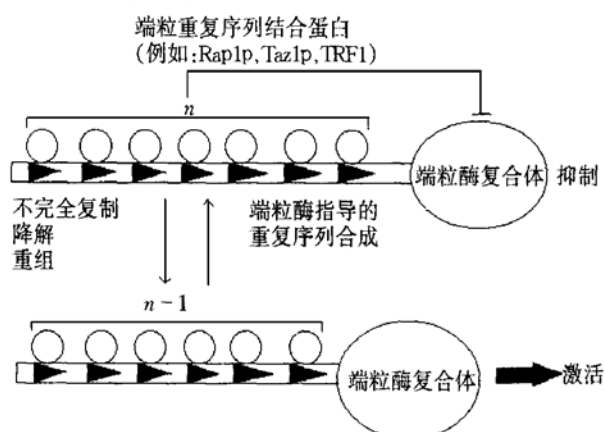


图 1 端粒长度调控的负反馈模型

这样一个简单的负反馈模型能够解释端粒长度为何能保持稳定. 但该模型成立的一个必要条件就是: 端粒长度能够被某种装置“感受”到, 并且该装置能够分辨出与端粒结合的 DS-TBP 分子的精确数目. 端粒酶本身已被排除了具有这种功能的可能. Shore 等^[15] 在 *S. cerevisiae* 中获得了证明这

种装置存在的直接证据. 他们制造了一种能与由非端粒 DNA 组成的人工位点相结合的工程 RAP1 蛋白, 首先将这些位点插入到染色体和端粒之间, 随后加入工程 RAP1 蛋白使其与人工位点结合. 结果发现端粒序列缩短并且缩短的数量和添加的相等. Shore 等还提示, 结合大约 15 个 RAP1 蛋白会改变端粒形状, 导致端粒酶无法与染色体末端结合. 当所结合的 RAP1 蛋白少于 15 个时, 端粒酶则重新结合并延长端粒. 在人类细胞中也发现了由 TRF1 构成的类似的计数机制.

进一步研究表明, 对 DS-TBP 的计数似乎还需要其他蛋白参与. Shore 等^[16] 发现了两种蛋白, 他们称之为 RAP1 相互作用因子 (Rap1 interacting factors, Rifs). 这两种蛋白与 Rap1p 结合并参与端粒调控, 去除其中任何一种均会使端粒增长. 如果两种都丧失了, 端粒的生长就会完全失控.

5 问题与展望

端粒长度调控负反馈模型的提出无疑是生物医学领域的一项重大突破, 但这一模型本身尚不完善, 有许多问题亟待解决, 着重体现在以下几个方面:

a. DS-TBP 的调控目标依然令人难以捉摸, 目前认为可能是 SS-TBP 和端粒酶. 但不久前 Blasco 等^[17, 18] 在研究“敲除”编码端粒酶 RNA 组分基因的小鼠时发现, 缺乏端粒酶活性的小鼠仍然能存活和传代, 且肿瘤的发生率无明显降低, 提示端粒酶并非细胞永生所必需, 存在端粒复制的端粒酶非依赖机制.

b. 端粒长度调控是一个多层次的、极其复杂的过程. 在这一过程中, 各种调控因子相互作用的机理是什么呢? Nakayama 等^[19] 提示在新近纯化的大鼠端粒酶蛋白组分 TLP1 中大量存在的 WD40 重复序列可能具有一定意义. 他们认为 WD40 重复序列是端粒酶与端体 (telosome) 蛋白质成员交互作用的界面, 可以产生有意义的蛋白质诱导的构象改变.

c. 该模型是普遍适用的吗? 目前尚无定论. 一般认为该模型的基本原理可能是普遍适用的, 但在某些生物中确实存在完全不同的调控机制. 即使在酵母中, 也有人^[20] 发现了一种可以快速将极度延伸的端粒缩短至正常水平的不同途径. 可见, 要彻底搞清端粒长度调控机制还有很长的一段路要走.

参 考 文 献

- 1 Dahse R, Fiedler W, Ernst G. Telomeres and telomerase:

- biological and clinical importance. *Clin Chem*, 1997, **43** (5): 708~ 714
- 2 Shore D. Telomerase and telomere-binding proteins: controlling the endgame. *TiBS*, 1997, **22** (7): 233~ 235
 - 3 Lundblad V, Wright W E. Telomeres and telomerase: a simple picture becomes complex. *Cell*, 1996, **87** (3): 396~ 375
 - 4 Shore D, Nasmyth K. Purification and cloning of a DNA binding protein from yeast that binds to both silencer and activator elements. *Cell*, 1987, **51**: 721~ 732
 - 5 Conrad M N, Wright J H, Wolf A J, *et al.* RAP1 protein interacts with yeast telomeres *in vivo*: overproduction alters telomere structure and decreases chromosome stability. *Cell*, 1990, **63** (4): 739~ 750
 - 6 Chong L, van Steensel B, Broccoli D, *et al.* A human telomeric protein. *Science*, 1995, **270**: 1663~ 1667
 - 7 van Steensel B, de Lange T. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature*, 1997, **385** (6618): 740~ 743
 - 8 Cooper J P, Nimmo E R, Allshire R C, *et al.* Regulation of telomere length and function by a Myb domain protein in fission yeast. *Nature*, 1997, **385** (6618): 744~ 747
 - 9 Billaud T, Koering C E, Binet-Brasselet E, *et al.* The telobox, a Myb-related telomeric DNA binding motif found in proteins from yeast, plants and human. *Nucleic Acids Res*, 1996, **24**: 1294~ 1303
 - 10 Lendvey T S, Morris D K, Sah J, *et al.* Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication identify three additional EST genes. *Genetics*, 1996, **144** (4): 1399~ 1412
 - 11 Lin J J, Zakian V A. The *Saccharomyces* CDC13 proteins is a single-strand TG₁₋₃ telomeric DNA-binding protein *in vitro* that affects telomere behavior *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (24): 13760~ 13765
 - 12 Nugent C I, Hughes T R, Lue N F, *et al.* Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science*, 1996, **274** (5285): 249~ 251
 - 13 Grandin N, Nathalie, Steven I, *et al.* STN1, a new *Saccharomyces cerevisiae* gene, is implicated in telomere size regulation in association with CDC13. *Genes Dev*, 1997, **11** (4): 512~ 527
 - 14 McEachern M J, Blackburn E H. Runaway telomere elongation caused by telomerase RNA gene mutations. *Nature*, 1995, **376** (6539): 403~ 409
 - 15 Marcand S, Gilson E, Shore D. A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast. *Science*, 1997, **275** (5302): 986~ 990
 - 16 Shore D. Different means to common ends. *Nature*, 1997, **385**: 676~ 677
 - 17 Blasco M A, Har-Woong L, Prakash Hande M, *et al.* Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell*, 1997, **91**: 25~ 3423
 - 18 Greider C W. Telomerase activity, cell proliferation, and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (1): 90~ 92
 - 19 Nakayama J, Saito M, Nakamura H, *et al.* TLP1: a gene encoding a protein component of mammalian telomerase is a novel member of WD repeats family. *Cell*, 1997, **88** (6): 875~ 884
 - 20 van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell*, 1998, **92** (3): 401~ 413

Telomere-binding Proteins and Telomere Length Regulation. CHEN Geng, ZHOU Jian-Xin, DONG Yan-Lin (The Biochemical Department, Third Military Medical College, Chongqing 400038, China).

Abstract Loss of telomere DNA repeats in eukaryotic cells is associated with senescence and apoptosis. Activation of telomerase can maintain telomere length stability and make cells immortal. Telomere-binding proteins might regulate the length of telomere by means of regulating telomerase or other relative factors. The progress in study of telomere-binding proteins and the model of telomere length regulation based on it are reviewed.

Key words telomere, telomere-binding proteins, length regulation

锤头型核酶作用机理的研究进展*

邓文生 杨希才¹⁾ 彭毅 康良仪
(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 概述了锤头型核酶的二级结构特征, 动力学反应的特点以及核酶切割反应的催化机制, 提出了锤头型核酶作用机理有待于深入研究的问题。

关键词 锤头型核酶, 动力学反应, 催化机制

学科分类号 Q52

核酶 (ribozyme) 是 80 年代初期发现的具有催化功能的 RNA 分子。它具有高度专一内切核酸酶的活性。经过科学家十多年的研究, 核酶已被发展成为一项新型技术并广泛应用于动植物抗病、人类疾病防治等领域的研究^[1,2], 显示出了广阔的应

用前景。迄今为止, 人们已经发现和研究的核酶类型较多, 而且其结构和作用方式也各不相同, 其中

* 国家 863 计划资助项目 (863-101-01-0204)。

¹⁾ 通讯联系人。

收稿日期: 1998-08-21, 修回日期: 1998-12-25