

端粒酶调控研究进展

营孙阳, 熊加秀, 麦洪旭, 林佳佳, 姜丽娜, 程龙, 叶棋浓

军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850

摘要: 端粒酶主要包括催化组分端粒酶逆转录酶(Telomerase reverse transcriptase, TERT)和端粒酶 RNA 组分(Telomerase RNA component, TERC), 二者与其他端粒酶复合体亚基共同组装成具有延伸端粒末端功能的全酶, 在细胞衰老和肿瘤发生过程中发挥关键的作用。端粒酶调控的分子机制复杂, 调控过程包括组装前各组分的转录调节、转录后调控、翻译后修饰以及亚细胞定位的调控, 还包括组装过程中各组分的运输和装配的调控, 以及组装后募集到端粒末端的调控。本文从以上几个方面对端粒酶的调控机制进行了综述, 旨在为端粒酶相关领域的研究以及开发以端粒酶为靶点的药物奠定理论基础。

关键词: 端粒酶; 端粒; 调控

Advances on the regulation of telomerase

Sunyang Ying, Jiaxiu Xiong, Hongxu Mai, Jiajia Lin, Lina Jiang, Long Cheng, Qinong Ye

Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100850, China

Abstract: Telomerase is composed of the catalytic subunit TERT (Telomerase reverse transcriptase), RNA subunit TERC (Telomerase RNA component) and other telomerase associated proteins. These two compartments with other telomerase subunits can assemble a holoenzyme, which maintain the length of telomeres. Telomerase plays important roles in cell senescence and tumor formation. The molecular mechanisms of the regulation of telomerase are very complicated. These processes comprise the regulation of transcription, post-transcription, post-translation and subcellular localization. Trafficking and assemble of TERT and TERC, as well as recruitment to telomeres, are also involved in this process. Here we review the regulation mechanism of telomerase from these aspects, and aim to laid a foundation for telomerase associated research and the drug targeting the telomerase.

Keywords: telomerase; telomere; regulation

收稿日期: 2015-08-10; 修回日期: 2015-12-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81330053)和北京市科技新星计划项目(编号: Z131102000413034)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81330053) and Beijing Novo Program (No. Z131102000413034)]

作者简介: 营孙阳, 硕士研究生, 专业方向: 遗传学。Tel: 010-66931830; E-mail: 929661078@qq.com

通讯作者: 叶棋浓, 博士, 研究员, 研究方向: 肿瘤分子生物学。Tel: 010-66931830; E-mail: yeqn66@yahoo.com

程龙, 博士, 副研究员, 研究方向: 肿瘤分子生物学。Tel: 010-66931830; E-mail: flonic@163.com

DOI: 10.16288/j.ycz.15-356

网络出版时间: 2016/3/15 12:39:16

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20160315.1239.006.html>

端粒(Telomere)是真核细胞线性染色体末端的一小段 DNA 与蛋白质的复合体,这一小段 DNA 又称为端粒 DNA,由 TTAGGG 串联重复而成的寡核苷酸序列组成,同时端粒 DNA 也是一个 3'端富含鸟嘌呤的单链突出序列。研究表明,端粒末端通过 3'单链突出侵入到端粒的双链中,形成一个套锁样结构——T-loop,然后端粒结合蛋白与其结合以保持此结构稳定^[1]。“Shelterin”复合体由 6 个特异性结合端粒的蛋白构成,包括端粒重复序列结合因子 1(TRF1)、端粒重复序列结合因子 2(TRF2)、抑制/激活蛋白(RAP1)、端粒保护蛋白 1(POT1)、TRF1 相互作用核因子 2(TIN2)和 TPP1(POT1 和 TIN2 组织蛋白)^[1,2]。这些蛋白可以特异性结合端粒 DNA,具有维持端粒长度、促进 T-loop 形成、招募端粒酶(Telomerase)到端粒末端并且防止染色质末端作为 DNA 损伤灶被识别等功能^[1,3]。由于 DNA 的半不连续复制导致了染色质末端的不完整,以及端粒面临着核酸酶和其他有害因子的危害,因此在每一次细胞分裂后端

粒都会发生缩短,图 1 显示了端粒末端的结构。维持端粒长度的主要机制是通过端粒酶对端粒重复序列进行延伸,同时细胞中也存在一种不依赖端粒酶的端粒延伸机制,称为端粒的替代延伸途径(Alternative lengthening of telomeres, ALT),其主要机制是同源重组^[4]。大部分癌细胞都利用完整的 RNA 分子作为端粒 DNA 反转录合成的模板,通过端粒酶依赖途径进行染色体末端更新。通常情况下,正常细胞的端粒酶活性主要存在于胚胎细胞、精子细胞和干细胞中,而体细胞几乎完全缺乏,但是大部分癌细胞具有端粒酶活性,为癌症检测和治疗提供了重要靶标。

端粒酶最初在纤毛虫(*Tetrahymena thermophila*)中发现,是大多数哺乳动物体内负责端粒延伸的特异性反转录酶。端粒酶主要包含两个亚单位:端粒酶 RNA 模板(Telomerase RNA component, TERC)和具有催化性的反转录酶(Telomerase reverse transcriptase, TERT)。其中,TERC 包含一个与端粒互补的序列,是端粒重复序列 d(TTAGGG)复制的模板。而端



图 1 端粒末端的结构及功能

Fig. 1 The structure and function of the telomeric ends

A: 端粒末端保护结构及其功能; B: 端粒长度的动态平衡。

粒的延伸是通过其催化组分 TERT 完成的,另外一些端粒/端粒酶相关蛋白与这两个组分结合在一起调控端粒酶的发生和亚细胞定位。一些与端粒酶相互作用的蛋白也参与了活性端粒酶复合体的形成,如一些具有 H/ACA box 的 snoRNA 结合蛋白[dyskerin、核仁蛋白 10(NOP10)和非组蛋白 2(NHP2)等]以及甘氨酸-精氨酸富含蛋白 1(GAR1)^[5]。除此之外,与端粒酶复合体相关的蛋白还有 Potin/reptin 和端粒酶 Cajal body 蛋白 1(TCAB1)等^[6]。Potin/reptin 是两个 ATP 酶,以 TERT 依赖性的细胞周期调控方式起作用。这两个 ATP 酶在细胞周期的 S 期与 TERT 发生相互作用,参与了 TERT 的装配和重塑,进而形成一个有活性的端粒酶复合体,这个过程可能并非同时发生而是逐步发生的,Potin/reptin 在此过程中的功能可能是帮助 TERT 与 TR-dyskerin RNP 复合体的装配或者重构端粒酶复合体^[7]。TCAB1 是端粒酶全酶的一个亚单位,在 Cajal body[CB, 细胞核内 RNP(核糖核蛋白)加工的场所]里含量丰富,TCAB1 对端粒酶功能的发挥至关重要。TCAB1 可以与有活性的端粒酶、端粒酶相关组分以及小 Cajal body RNA(scaRNA,参与 RNA 剪接修饰)相互作用。利用 RNA 干扰技术将 TCAB1 敲除后,打断了 TERC 和 CB 的联系,进而造成端粒酶不能运输到端粒末端合成端粒。因此 TCAB1 参与了端粒酶的运输,对癌细胞中端粒的合成至关重要^[8]。

端粒酶调控的分子机制是多层次的,调控过程涉及蛋白和 RNA 合成、加工、端粒酶装配和亚细胞定位以及端粒酶到端粒的招募中的每一环节^[9]。本文从端粒酶表达水平的调控、端粒酶装配与运输的调控、端粒末端对端粒酶的调控等几个方面对端粒酶的调控机制进行了综述。

1 端粒酶表达水平的调控

1.1 TERT 的转录水平调控

研究表明,正常细胞、危机前细胞或者通过 ALT 途径延伸端粒的细胞,这些细胞的端粒酶活性不能被检测到,进一步研究表明在这些细胞中表达的是 TERT 的剪接变异体,因此认为在端粒酶复合体调控中 TERT 的转录控制起着至关重要的作用^[9]。

在许多细胞和组织中,TERT 基因的表达水平与

端粒酶活性呈正相关关系。人的 TERT 基因在发育早期表达。除增殖中的细胞与更新中的组织外,大多数正常体细胞缺乏端粒酶活性^[10]。瞬时转染 TERT 启动子后,利用荧光素酶实验发现启动子活性升高,这也表明端粒酶活性的增加是由于受到启动子调控所致^[11]。

目前有关 TERT 启动子的研究相当广泛,许多转录因子结合位点都涉及 TERT 表达量的调控^[12]。例如,TERT 的转录受到 Sp1 的调控(Sp1 是一个与 TATA 结合蛋白发生相互作用的通用转录因子),但是在 TERT 启动子中却没有发现明显的 TATA box,令人惊讶的是 Sp1 结合位点的突变却可以使 TERT 启动子活性完全丧失^[13]。端粒酶活性也被癌基因(如 *c-Myc*)和抑癌基因(如 *WT1*)所调控。*c-myc* 通过结合 TERT 启动子上的两个 E-boxes 而影响端粒酶表达,并且在癌细胞中可以观察到 *c-myc* 表达量的增加会引起端粒酶活性的增加^[13,14]。抑癌基因 *WT1* 和端粒酶启动子结合后,负调节 TERT 的表达,换言之,在肿瘤发生过程中,WT1 的失活与端粒酶激活相关。

在泌尿道上皮细胞癌(Urothelial carcinoma, UC)等多种癌症中,TERT 启动子以相当高的频率发生突变,但是它们对端粒酶功能的影响还不是很清楚。一项对 23 例病人 UC 细胞的研究发现这些发生在 TERT 启动子上的突变与 TERT 的 mRNA、蛋白以及端粒酶活性与端粒长度都呈现相关性,如某些位点突变的 TERT 的 mRNA、蛋白以及端粒酶活性与端粒长度呈现正相关关系而另一些位点的突变则会呈现负相关关系。在 Borah 之前没有人发现 TERT 启动子突变与 UC 病人预后具有相关性,Borah 等^[15]的研究指出在两组独立的 UC 病人群体中,TERT mRNA 的高表达与病人生存期的减少呈现密切的相关关系,其结果表明检测端粒酶活性的诊断方法可能比检测 TERT 启动子是否发生突变更加可靠^[5]。

转录因子 E2F 及其家族成员与 MZF-2(锌指转录因子)是细胞内一些抑制 TERT 转录的因子。TERT 可能在转录过程被这些因子抑制,当然 TERT 的转录抑制也可能是通过 TGF β /Smad 信号通路^[16]抑制潜在的激活子(如 *c-myc*)或者通过激活 BRCA1(与 DNA 修复相关的遗传性乳腺癌和卵巢癌抑制因子)

而完成的^[17]。也有研究表明大多数肿瘤都存在 p53 缺陷, p53 可能涉及了 TERT 表达的负性调控。图 2 展示了 TERT 启动子参与的转录水平的调控机制。

研究者在一些细胞中发现 TERT 的沉默受到表观遗传控制^[18]。首先 TERT 的启动子位于高度浓缩的染色质内, 与低乙酰化核心组蛋白存在相互作用^[19]; 其次, 甲基化能否调控癌细胞里 TERT 的表达这个问题虽然还存在争议^[20], 但是一些证据表明组蛋白和 CpG 甲基化涉及了 TERT 的调控^[21]。CTCF 是一个组织染色质结构域的隔离子^[22], 它与 TERT 的第一个外显子结合调控 TERT 的转录, 使细胞里 TERT 的表达受到抑制。最后, TERT 启动子的激活与周遭染色质环境的急剧变化也存在关系^[18]。

1.2 TERT 的翻译后修饰

支持端粒酶翻译后修饰调控的证据是观察到 TERT mRNA 水平与端粒酶活性不总是呈相关时发现的^[23], 而且并非所有有端粒酶活性的细胞都能够维持端粒长度, 这说明端粒酶 RNP 的发生和装配是

另一种调控方式, 关于这种方式将在下面详细讨论。图 3 描述了 TERT 的翻译后修饰以及它们如何影响蛋白稳定性、亚核定位以及端粒酶活性的。许多研究表明端粒酶活性的翻译后调控可能通过 TERT 催化亚单位上特异性的 Ser/Thr 或者是 Tyr 残基发生的可逆磷酸化修饰。从植物到哺乳动物的 TERT 推测都存在磷酸化位点。由于多种激酶、磷酸酶的激活子或者抑制子影响磷酸化状态, 所以端粒酶磷酸化状态可能影响其结构、定位或者是酶活性。TERT 蛋白中许多非特异的磷酸化位点已经被预测, 其中有一些位点至关重要, 这些位点的磷酸化影响了端粒酶活性(激活或者抑制)。TERT 上的特异性磷酸化位点存在于脯氨酸富含区域。研究表明至少有两种激酶涉及了 TERT 的磷酸化, 为了应对辐射损伤 c-Abl 酪氨酸激酶对 TERT 特异性酪氨酸残基位点磷酸化的作用导致了端粒酶活性的降低了 3 倍, 缺乏 c-Abl 的鼠表现出端粒酶活性的增加和端粒的延长。过表达 c-Abl 后诱导了细胞周期阻滞而抑制了细胞生长。因为在压力下 c-Abl 会应答 DNA 损伤, 所以当细胞

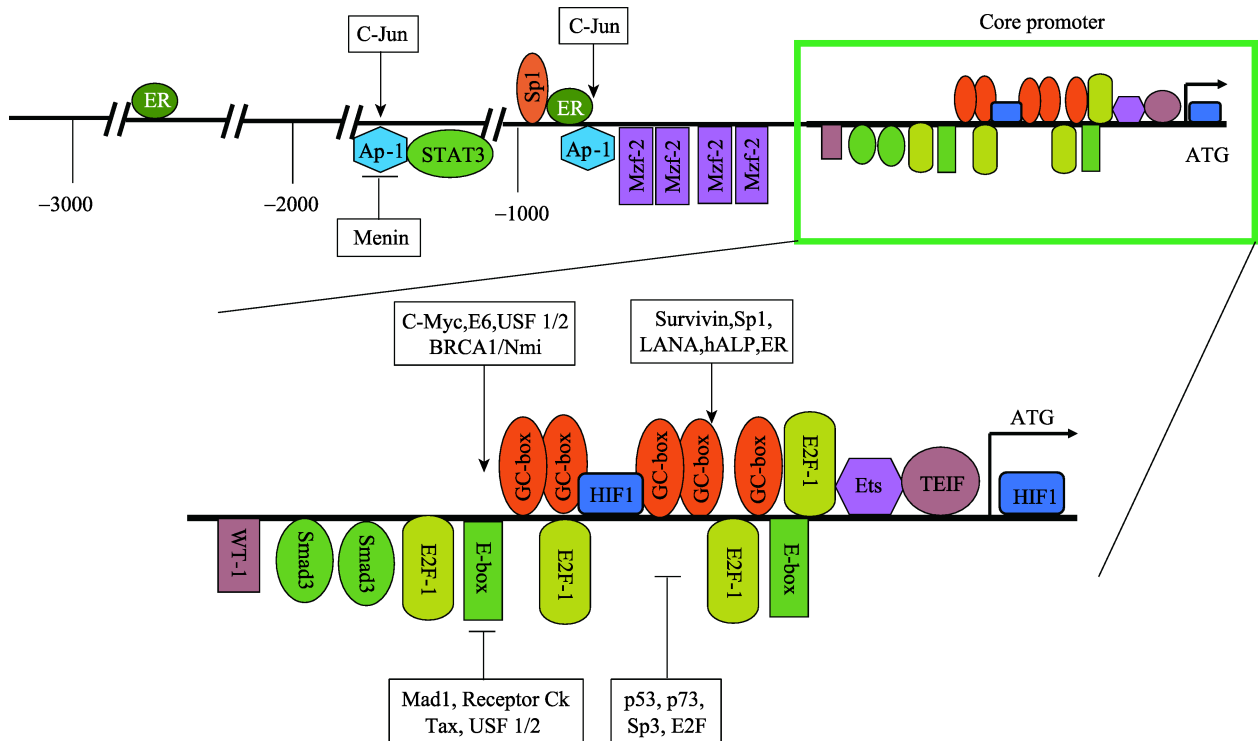


图 2 TERT 启动子的结构和转录调控

Fig. 2 The structure and transcription regulation of TERT promoter

黑线上方的是激活 TERT 的蛋白, 下方是抑制 TERT 的蛋白。黑线上是直接结合启动子的蛋白, 它们按一定的顺序分布在启动子上。方框里的蛋白是通过和直接结合在启动子上的蛋白的相互作用而间接行使功能的。

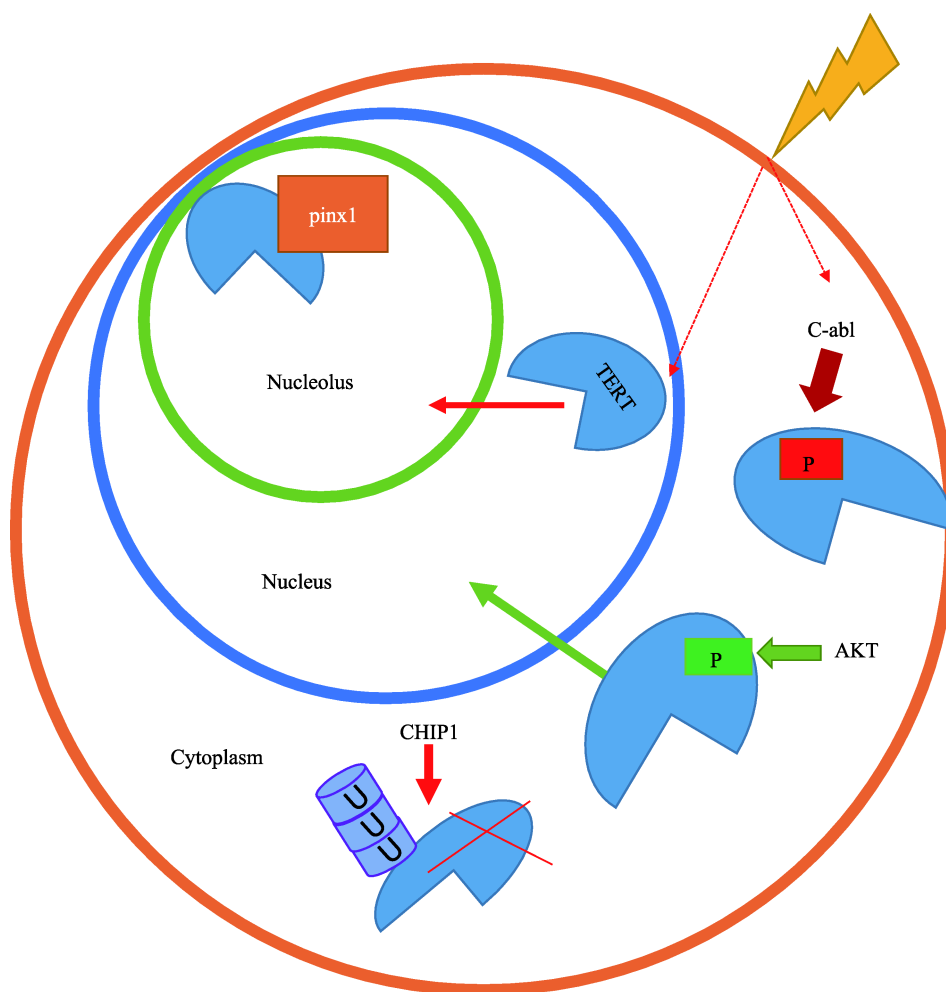


图 3 TERT 的翻译后修饰及对端粒酶活性的影响

Fig. 3 TERT's post-translation modification and its impact on the telomerase activity

红色箭头表示负调控, 绿色箭头表示正调控。

暴露在电离辐射之下就导致了 c-Abl 诱导的 TERT 磷酸化水平的显著增加, 这也表明了 c-Abl 通过磷酸化 TERT 导致端粒酶活性的抑制和端粒长度变短, 显示出在 c-Abl 和 TERT 之间存在直接的联系。因此, c-Abl 负调节端粒酶活性。相反, 通过 AKT 介导的 TERT 磷酸化与端粒酶活性的增加相关, 猜测这可能是 TERT 从细胞质易位到核仁而导致的。

泛素化作用也可能影响端粒酶活性, 通过酵母双杂交发现 MKRN1 泛素化连接酶与 TERT 存在相互作用^[24]。MKRN1 过表达会导致 TERT 的降解并且导致端粒酶活性的下降和端粒的缩短, 而且 TERT 半衰期大约为 24 h, 而 TR 的半衰期却非常长, 大约有 5 d, 这些发现表明 TERT 的稳定性也是调控端粒酶活性的重要因素。近期研究表明 CHIP(Hsc70

相互作用蛋白的 C 末端, 是 E3 泛素化连接酶的辅因子)控制细胞质中 TERT 的稳定性^[25], 其与 TERT 具有相互作用并且可以使 TERT 多聚泛素化, 使 TERT 不能进入细胞核, 最终使得蛋白发生降解。有趣的是 CHIP 和 TERT 的相互作用在 G₂/M 期达到峰值, 在端粒酶对端粒发挥作用的 S 期减少。因此, CHIP 在细胞周期中的作用可能是通过控制细胞内运输, 调节端粒酶活性和 TERT 稳定性^[25]。

综上所述, TERT 的表达在转录和翻译后水平都受到调控, 同时 TERT 可变剪接的过程也涉及了对端粒酶活性的调控。但是也有研究声称在不同细胞中端粒长度和端粒酶活性或者 TERT 表达量之间存在负相关关系, 而这可能是因为 TERT 的调控存在组织特异性。

1.3 TERC 的转录和转录后调控

在一些肿瘤细胞中缺少 TERT 会导致端粒酶的失活,说明 TERT 的量和端粒酶活性存在平行关系,与此相似,TERC 的量和端粒酶活性也有平行关系。TERC 的转录会被 Sp1 和 HIF-1 激活而被 Sp3 抑制,这在 MAPK 的信号级联通路与 TERC 启动子的沉默中都能找到依据^[26]。而且,TERT 和 TERC 的转录似乎会受到表观遗传控制,如 H3 和 H4 乙酰化水平降低会抑制 TERC 的表达^[21]。TERC 中至少有 6 个位点会受到假尿苷化修饰,有趣的是,这些位点中的两个都位于一个对端粒酶催化活性非常重要的高度保守结构域。利用假尿苷化 TERC 所做的端粒酶体外重构实验表明在假尿苷化后端粒酶的活性和持续合成端粒能力都发生改变,这进一步说明在体内,TERC 的修饰可能会调控端粒酶活性,但是这还需要确切的证据来证明^[27]。

2 端粒酶装配与运输的调控

2.1 端粒酶复合体的装配

在具有端粒酶活性的细胞内,端粒酶装配首先要保证 TERC 的稳定性,其次是端粒酶复合体各组分间存在直接或间接的相互作用,并且端粒酶各组分在装配成活性复合体的过程中需要消耗能量^[28]。但是在体外,不需要其他任何蛋白,仅仅需要 TERT 和 TERC 这两个组分的结合就可以发挥端粒酶活性。细胞内的端粒酶复合体要行使功能是需要多个蛋白的协助的。研究发现 TERT 运输到细胞核的过程是受到调控的,同样,在细胞周期进行过程中,端粒酶复合体的装配也可能受到了调节,端粒酶可能在细胞周期的 S 期进行装配,而在 M 期去装配^[29]。因此,为了让端粒酶远离其底物(端粒),就要使端粒酶的重要亚基(TERT 和 TERC)与其它蛋白不能发生相互作用,换言之就是将其重要亚基隔离在不同的位点,例如,在 S 期就可能有端粒酶的装配位点——端粒末端或者是 CBs。研究表明,存在于 CBs 里的一种 snoRNP 装配因子——运动神经元(SMN)复合体参与了端粒酶的发生,并且一种小核仁核糖核酸蛋白(SnoRNP)GAR1 的装配和修饰受到了 SMN 的调控,而 GAR1 是一个与 SMN 复合体发生相互作用

的蛋白,与 TERC 也具有相互作用,然而,要精确定位端粒酶装配发生的场所还需要进一步研究。最近的研究表明,TERC 在 CBs 中和端粒附近的定位依赖于 TERT,这表明 TERC 和 TERT 装配成复合体后它们才被运输到端粒末端。还有一种理论,认为 TERT 间接影响 TERC 的运输,或者是这两个组分短暂的相互作用影响了 TERC 的定位^[30]。

脊椎动物 TERC 的 3'末端含有两个被 Box H 和 Box ACA 模体所分开的茎环结构,即 H/ACA 结构域^[31]。在 TERC 的 H/ACA 结构域中,H motif 和 ACA motif 分别结合一个由 dyskerin、NOP10、NHP2 和 GAR1 蛋白所形成的复合体,此复合体对于 RNA 的成熟、3'端加工以及 RNP 发生具有重要作用^[32]。Dyskerin 是古细菌 H/ACA RNA 假尿苷合酶的哺乳动物同源物,它有 3 个结构域:RNA 修饰相关的催化性 TruB 结构域、假尿苷合酶结构域与 PUA(古嘌呤糖基转移酶)结构域,Dyskerin 及其相关蛋白对核糖体和端粒酶的发生至关重要^[33],但是其突变体似乎对人细胞核糖体成熟没有显著的负调控作用^[34]。Dyskerin 蛋白被 *DKC1* 基因编码,并且已经发现了许多相关的单一突变,其中一些突变在 *NOLA2*(编码 NHP2 蛋白)和 *NOLA3*(编码 NOP10 蛋白)中已经被报道,这些突变体在体外对端粒酶功能影响不大,而在体内则会降低活性端粒酶的数量,继而导致严重的疾病,如 X-射线相关的退行性先天角化不良(DC),而 *NOLA2* 和 *NOLA3* 上的突变常导致染色体 DC^[33, 34],令人惊讶的是,在 *NOLA1*(编码 GAR1 蛋白,参与了端粒酶介导的紊乱)里却未发现有突变的报道。GAR1,即富含甘氨酸-精氨酸结构域(Glycine and arginine rich)的蛋白,侧面与高度保守的核心结构域相连接,GAR1 不会直接结合 RNA,相反却直接结合 dyskerin,GAR1 对体内 H/ACA snoRNP 的稳定性或者体外 snoRNP 的装配并不必要。NOP10 是一个小的碱性蛋白,其 N-末端具有一个保守的锌指结构,与 GAR1 一样,它也不会直接结合 RNA,却直接结合 dyskerin。NHP2 是另一类小的碱性蛋白,它可以结合 RNA^[35]。TERC 的 CBs 定位依赖于结合了 TERC CAB(Cajal body box)结构域的 TCAB1 蛋白^[36],结合 H/ACA snoRNA 的 dyskerin 既可以定位到核仁也可以定位到 CBs,而结合 scaRNA 的 TCAB1 则会特异

性的定位到 CBs, 故 TCAB1 负责 TERC 到 CBs 的定位, 并且敲除 TCAB1 后使 TERC 不能定位到核仁^[36], 自从 TCAB1 及其基因 *WRD79* 被发现后, 人们就发现其与 DC 相关, 并且在 TCAB1 的突变体中发现 TERC 的运输出现了缺陷, 活性端粒酶的数量减少。

目前, 端粒酶复合体各组分的成熟过程与装配成活性复合体的具体步骤依旧还不清楚。*TERT* 基因在细胞内首先转录成 RNA, 然后 RNA 成熟为 mRNA, 最后进入细胞质进行翻译表达, *TERT* 表达和修饰完成后便被招募到核仁里, 接着从核仁迅速进入 CBs 进行 RNP 的装配^[37]。如果 *TERT* 在核仁中持续积累而不运输到 CBs, 则会降低活性端粒酶的水平, 这有可能是 *TERT* 和 TERC 被分开了, 而不能形成活性复合体^[38,39]。TERC 的前体最初是一个含有三甲基鸟苷(TMG)帽的 RNA 聚合酶 II 转录物^[40], 通过 RNA 解螺旋酶(RHAU)与 AU 富含元件相互作用而结合到其 5'末端, 解开 G-四联体结构, 同时 dyskerin 和其它相关蛋白结合到 3'末端, 从内部修饰剪接 RNA 最终形成成熟的 TERC^[41]。Dyskerin 最初是在一些 snoRNA H/ACA 家族数量累积 1(SHQ1)蛋白的帮助下与 TERC 以及含有 H/ACA 结构域的 snoRNA 结合, 接着核装配因子 1(NAF1)结合在 dyskerin 上, 继而发生 NAF1 与 GAR1 交换, 而 SHQ1 会在成熟的 TERC 在定位到 CBs 之前离开^[36,42], 然后 *TERT* 在 TCAB1 的帮助下定位到端粒酶 RNP 装配的场所 CBs 附近, 最终装配好的端粒酶定位到端粒上, 添加核苷酸到端粒上延伸端粒^[43]。所以端粒酶全酶的每一组分的积累对于细胞内活性端粒酶累积都是有意义的^[44]。

pontin 与 reptin 既是 ATP 酶又是 DNA 解螺旋酶, 这两个酶揭示了端粒酶装配重要步骤。当 *TERT* 结合 pontin 和 reptin 后, 含量会在 S 期达到峰值。当这两个重要的端粒酶亚基被辅助蛋白稳定并结合时, *TERT* 和 TERC 就会发生二聚化。TERC 有两个结构域对结合 *TERT* 是必要的: 模板结构域(第 44~186 个核苷酸)和在 H/ACA 结构域的双发夹元件, TERC 在此起着稳定 H/ACA 蛋白结合的作用(在核苷酸第 243~326 位置)。

2.2 TERC 的细胞核运输

TERC 和 *TERT* 的易位是通过调节实现的。在细

胞内有多个亚核结构参与了端粒酶的装配和运输, 这些亚核结构同时还是 RNP 装配和 RNA 修饰的普遍位点^[45]。TERC 在大部分细胞周期中都定位在 CBs, CBs 的功能主要是 TERC 到端粒的运输装置^[46]。与 TERC 相反, *TERT* 主要在核质有明显的焦点样定位, 因此端粒酶的两个主要亚单位 TERC 和 *TERT* 在整个细胞周期几乎都是分离状态, 在 S 期早期, *TERT* 易位到核仁, 同时含有 TERC 的 CBs 在核仁的边缘聚集, 当 CBs 在 S 期中期把端粒酶运输到端粒过程中, TERC 先是聚集在 CBs 的一极, 然后再定位到端粒。而且有研究表明在 S 期发挥功能的激酶和磷酸酶这两种酶可能修饰了端粒酶亚单位^[47]。然而, 涉及 TERC 靶向和聚集的机制还不是很明确^[29]。目前, 已经发现端粒酶 RNA 分子结构——CAB box 和 H/ACA motif 影响了 TERC 到 CBs 与核仁的易位^[31], 同时 *TERT* 的一个重要结构域被发现介导了 *TERT* 到核仁的易位。

3 端粒末端对端粒酶的调控

端粒酶活性调控的另一种形式是间接调控, 即端粒酶与可能影响端粒酶活性的端粒结合蛋白(TBP)发生相互作用, 这些 TBP 结合到端粒上后阻碍了端粒酶接近染色体末端^[48]。研究发现这种间接调控端粒长度的方式是通过一种三态模型^[49]发挥作用的: 第一, POT1 直接结合在端粒的 3'末端, 并且和 TPP1 相互作用, 这种 POT1-TPP1 的位置关系限制了端粒酶结合到染色体末端, 防止端粒不受调控而延伸; 第二, POT1-TPP1 之间的相互作用增强了 POT1 对端粒 DNA 的亲合, 也增强了 POT1 和端粒酶的相互作用, 这拉近了端粒酶和 Shelterin 复合体之间的物理联系^[50]。接着, 这些蛋白可能会通过转录后修饰或者破坏 Shelterin 复合体的方式从其结合位点脱落, 但是具体的过程还未知晓; 第三, 在端粒延伸期间, 释放的 POT1-TPP1 可能作为端粒酶激活子而起作用, 使得端粒延伸, 但是当端粒延伸到达某个阈值时, Shelterin 复合体与新合成的端粒重复序列结合, 并且 3'突出末端会重新被 POT1-TPP1 结合, 导致端粒酶受到抑制, 端粒又回到第一个状态, 所以 POT1-TPP1 是端粒上兼具正、负调控性的双功能分

子。TRF1 和 TRF2 在哺乳动物中可能是负责端粒酶负反馈控制的主要蛋白, 当它们结合 T-loop 的双链 DNA 时, 端粒就会处于关闭状态使端粒酶不能进入, 因此不能延伸端粒末端^[50], 总之 TRF1 和 TRF2 作为端粒长度的负调节因子的根本原因就是它们参与了 T-loop 的形成^[51]。TRF1 和 TRF2 通过顺式作用抑制端粒延伸, 据报道 TRF1 可以抑制定位在端粒上的端粒酶活性, 然而, TRF2 似乎是激活端粒的降解但是却没有显示出对端粒酶的影响。在细胞内也发现了其它负反馈调节端粒长度蛋白: 与 TRF1 相互作用的蛋白——端锚聚合酶 1、2(TANK1、TANK2), TIN2, Pinx1; 与 TRF2 相互作用的蛋白 hRAP1(人抑制激活蛋白 1, 被认为是和 TRF2 有特异性相互作用的蛋白并且在体内负性调节端粒长度), 这些蛋白对 TRF1 功能的发挥起了至关重要的作用(图 4)。Pinx1 可以通过与端粒酶的催化亚单位以及 TRF1 分

子形成稳定复合体而抑制端粒酶的功能, 并通过其 C 末端 74 个氨基酸的端粒酶抑制结构域(TID)与 TERT 结合。

然而端粒酶招募的精确机制还不清楚, 一个可能的原因是结合在端粒上的 Shelterin 构成了负反馈环而对端粒酶延伸端粒发挥了负调控作用。Shelterin 介导端粒长度调控的普遍理论认为端粒长度越长招募的 Shelterin 复合体越多, 但是在 Shelterin 招募到端粒上的同时也限制了端粒酶到端粒的招募, 进而抑制了端粒的延伸。负反馈环负责稳定端粒长度, 这已经在癌细胞中得到证实, 但是人们认为在端粒酶阳性的生殖细胞和其他干细胞样细胞中, 负反馈环可能也维持了端粒长度的动态平衡。因此, 非常有可能还存在着其他未发现的机制调控了端粒酶的招募以及端粒的持续合成, 但是究竟哪种机制起作用主要取决于细胞是处于平衡条件还是非平衡条件。

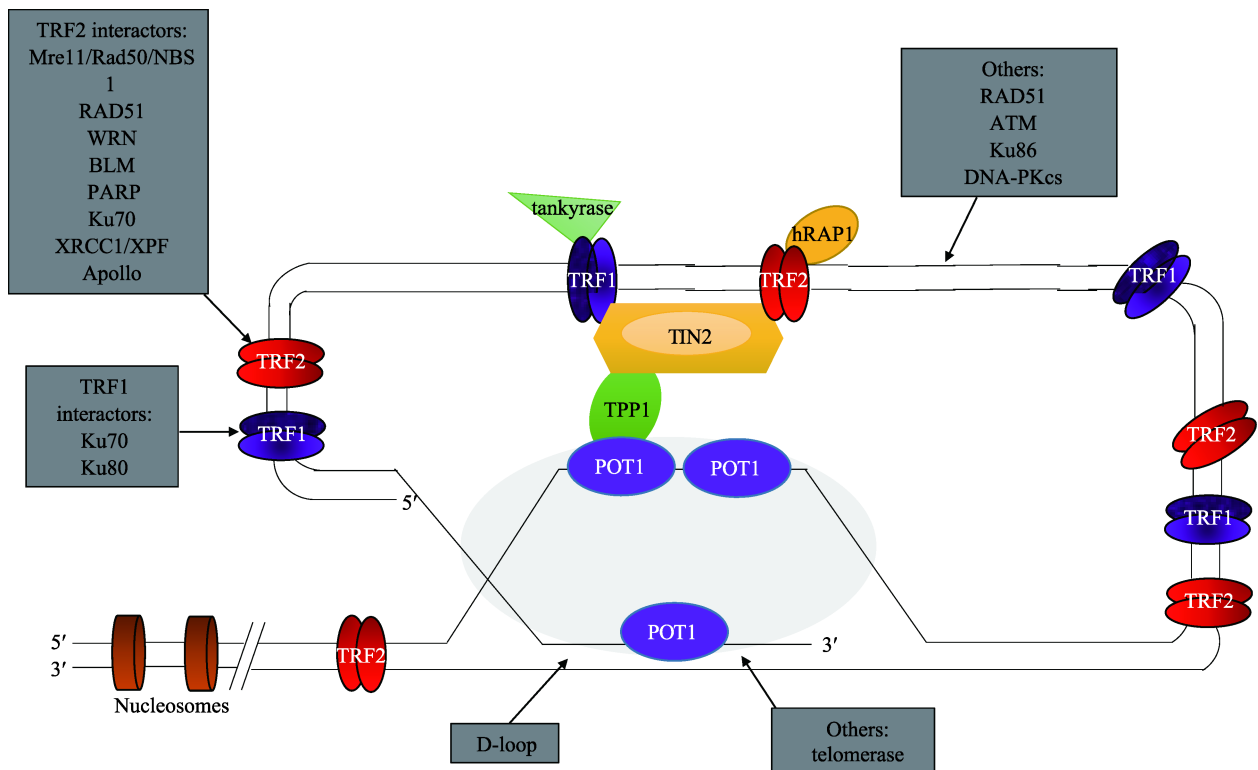


图 4 定位到端粒末端的蛋白

Fig. 4 Proteins localized to the end of telomeres

T 环和 D 环的形成需要端粒结合蛋白的帮助, 这些蛋白包括 shelterin 复合体, 其由 TRF1、TRF2、TIN2、TPP1、RAP1 和 POT1 构成, 一共包含 5 个 DNA 结合结构域(TRF1 和 TRF2 各 2 个, POT1 有 1 个), 可以专一的识别 DNA 位点。其他端粒相关蛋白在同源重组或者非同源末端插入表明 DNA 损伤信号的传导和修复与端粒生物学功能密切相关。

4 展 望

对端粒酶的深入研究逐渐揭示了肿瘤细胞的端粒酶活性与细胞衰老之间的联系,如正常细胞可以通过遗传操作转入 TERT 亚基使其获得端粒酶活性而发生永生化逃避衰老等。近期关于端粒酶的研究逐渐揭示了辅助蛋白在维持端粒酶复合体活性和功能方面的重要作用,对这些辅助蛋白的深入研究开创了靶向端粒酶辅助蛋白而间接抑制端粒酶活性治疗癌症的新方法。总之,端粒酶活性的调节包含多个调控因素:TERT 水平的调控、转录后修饰、运输、定位、最终构象的调控以及在端粒酶复合体装配过程中与辅助蛋白的相互作用的调控,这些端粒酶调控研究为癌症的治疗提供了许多值得探索的重要靶标。目前端粒酶调控的许多内容都已被详细的研究探讨,为进一步发现调控端粒酶活性的分子奠定了基础^[52]。如伊美司他(Imetelstat)是一个合成分子,在端粒酶的活性位点区域结合端粒酶 RNA 组分并降低了端粒酶活性^[53,54]。姜黄素(Curcumin)被证明在某些类型的癌症中可以抑制端粒酶活性,这种抑制可能是使从 TERT 上解离的 HSP-90 和 p23 伴侣蛋白不能易位到细胞核^[55]。莱菔硫烷(Sulforaphane)已经被证明可以导致 TERT 的表达水平和磷酸化水平降低,阻止了向细胞核的易位^[56]。然而,鲜有证据表明我们可以通过靶向 Dyskerin、GAR1、Nop10 和 NHP2 等端粒酶复合体的其他组分而改变端粒酶活性,这些问题在间接应用抗端粒治疗癌症的道路上给我们留下了探索的机会^[57]。

参考文献(References):

- [1] Palm W, de Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet*, 2008, 42: 301–334. [DOI]
- [2] O'Sullivan RJ, Karlseder J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(3): 171–181. [DOI]
- [3] Kabir S, Hockemeyer D, de Lange T. TALEN gene knockouts reveal no requirement for the conserved human shelterin protein Rap1 in telomere protection and length regulation. *Cell Rep*, 2014, 9(4): 1273–1280. [DOI]
- [4] Aebys E, Lingner J. ALT telomeres get together with nuclear receptors. *Cell*, 2015, 160(5): 811–813. [DOI]
- [5] Ly H. Genetic and environmental factors influencing human diseases with telomere dysfunction. *Clin Exp Med*, 2009, 2(2): 114–130. [DOI]
- [6] Fu D, Collins K. Purification of human telomerase complexes identifies factors involved in telomerase biogenesis and telomere length regulation. *Mol Cell*, 2007, 28(5): 773–785. [DOI]
- [7] Venteicher AS, Meng ZJ, Mason PJ, Veenstra TD, Artandi SE. Identification of ATPases pontin and reptin as telomerase components essential for holoenzyme assembly. *Cell*, 2008, 132(6): 945–957. [DOI]
- [8] Zhong F, Savage SA, Shkreli M, Giri N, Jessop L, Myers T, Chen R, Alter BP, Artandi SE. Disruption of telomerase trafficking by TCAB1 mutation causes dyskeratosis congenita. *Gene Dev*, 2011, 25(1): 11–16. [DOI]
- [9] Trochet D, Mergui X, Ivkovic I, Porreca RM, Gerbault-Seureau M, Sidibe A, Richard F, Londono-Vallejo A, Perret M, Aujard F, Riou JF. Telomere regulation during ageing and tumorigenesis of the grey mouse lemur. *Biochimie*, 2015, 113: 100–110. [DOI]
- [10] Shay JW, Wright WE. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis*, 2005, 26(5): 867–874. [DOI]
- [11] Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao YC, Bettegowda C, Agrawal N, Diaz LA, Jr., Friedman AH, Friedman H, Gallia GL, Giovannella BC, Grollman AP, He TC, He YP, Hruban RH, Jallo GI, Mandahl N, Meeker AK, Mertens F, Netto GJ, Ahmed Rasheed B, Riggins GJ, Rosenquist TA, Schiffman M, Shih IM, Theodorescu D, Torbenson MS, Velculescu VE, Wang TL, Wentzensen N, Wood LD, Zhang M, McLendon RE, Bigner DD, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N, Yan H. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(15): 6021–6026. [DOI]
- [12] Horn S, Figl A, Sivaramakrishna Rachakonda P, Fischer C, Sucker A, Gast A, Kadel S, Moll I, Nagore E, Hemminki K, Schandendorf D, Kumar R. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science*, 2013, 339(6122): 959–961. [DOI]
- [13] Kyo S, Takakura M, Fujiwara T, Inoue M. Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers. *Cancer Sci*, 2008, 99(8): 1528–1538. [DOI]
- [14] Greenberg RA. Telomeres, crisis and cancer. *Curr Mol Med*, 2005, 5(2): 213–218. [DOI]

- [15] Borah S, Xi LH, Zaug AJ, Powell NM, Dancik GM, Cohen SB, Costello JC, Theodorescu D, Cech TR. *TERT* promoter mutations and telomerase reactivation in urothelial cancer. *Science*, 2015, 347(6225): 1006–1010. [DOI]
- [16] Lacerte A, Korah J, Roy M, Yang XJ, Lemay S, Lebrun JJ. Transforming growth factor- β inhibits telomerase through SMAD3 and E2F transcription factors. *Cell Signal*, 2008, 20(1): 50–59. [DOI]
- [17] Ballal RD, Saha T, Fan SJ, Haddad BR, Rosen EM. BRCA1 localization to the telomere and its loss from the telomere in response to DNA damage. *J Biol Chem*, 2009, 284(52): 36083–36098. [DOI]
- [18] Zhu JY, Zhao YJ, Wang SW. Chromatin and epigenetic regulation of the telomerase reverse transcriptase gene. *Protein Cell*, 2010, 1(1): 22–32. [DOI]
- [19] Wang SW, Hu CG, Zhu JY. Transcriptional silencing of a novel *hTERT* reporter locus during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *Mol Biol Cell*, 2007, 18(2): 669–677. [DOI]
- [20] Zhang ZX, Wang Y, Tao ZZ, Chen SM, Xiao BK, Zhou T. Subtelomeric demethylation deregulated *hTERT* expression, telomerase activity, and telomere length in four nasopharyngeal carcinoma cell lines. *Cancer Biother Radiopharm*, 2014, 29(7): 289–294. [DOI]
- [21] Atkinson SP, Hoare SF, Glasspool RM, Keith WN. Lack of telomerase gene expression in alternative lengthening of telomere cells is associated with chromatin remodeling of the *hTR* and *hTERT* gene promoters. *Cancer Res*, 2005, 65(17): 7585–7590. [DOI]
- [22] Renaud S, Loukinov D, Bosman FT, Lobanenko V, Benhattar J. CTCF binds the proximal exonic region of *hTERT* and inhibits its transcription. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(21): 6850–6860. [DOI]
- [23] Zhang Y, Chen LY, Han X, Xie W, Kim H, Yang D, Liu D, Zhou SY. Phosphorylation of TPP1 regulates cell cycle-dependent telomerase recruitment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(14): 5457–5462. [DOI]
- [24] Kim JH, Park SM, Kang MR, Oh SY, Lee TH, Muller MT, Chung IK. Ubiquitin ligase MKRN1 modulates telomere length homeostasis through a proteolysis of hTERT. *Gene Dev*, 2005, 19(7): 776–781. [DOI]
- [25] Lee JH, Khadka P, Baek SH, Chung IK. CHIP promotes human telomerase reverse transcriptase degradation and negatively regulates telomerase activity. *J Biol Chem*, 2010, 285(53): 42033–42045. [DOI]
- [26] Cairney CJ, Keith WN. Telomerase redefined: integrated regulation of *hTR* and *hTERT* for telomere maintenance and telomerase activity. *Biochimie*, 2008, 90(1): 13–23. [DOI]
- [27] Kim NK, Theimer CA, Mitchell JR, Collins K, Feigon J. Effect of pseudouridylation on the structure and activity of the catalytically essential P6.1 hairpin in human telomerase RNA. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(19): 6746–6756. [DOI]
- [28] Collins K. Physiological assembly and activity of human telomerase complexes. *Mech Ageing Dev*, 2008, 129(1/2): 91–98. [DOI]
- [29] Wojtyla A, Gladych M, Rubis B. Human telomerase activity regulation. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(5): 3339–3349. [DOI]
- [30] Tomlinson RL, Abreu EB, Ziegler T, Ly H, Counter CM, Terns RM, Terns MP. Telomerase reverse transcriptase is required for the localization of telomerase RNA foci and telomeres in human cancer cells. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(9): 3793–3800. [DOI]
- [31] Jády BE, Bertrand E, Kiss T. Human telomerase RNA and box H/ACA scaRNAs share a common Cajal body-specific localization signal. *J Cell Biol*, 2004, 164(5): 647–652. [DOI]
- [32] Li H. Unveiling substrate RNA binding to H/ACA RNPs: one side fits all. *Curr Opin Struct Biol*, 2008, 18(1): 78–85. [DOI]
- [33] Thomas Meier U. The many facets of H/ACA ribonucleoproteins. *Chromosoma*, 2005, 114(1): 1–14. [DOI]
- [34] Parry EM, Alder JK, Lee SS, Phillips JA, III, Loyd JE, Duggal P, Armanios M. Decreased dyskerin levels as a mechanism of telomere shortening in X-linked dyskeratosis congenita. *J Med Genet*, 2011, 48(5): 327–333. [DOI]
- [35] Hamma T, Reichow SL, Varani G, Ferré-D'Amaré AR. The Cbf5–Nop10 complex is a molecular bracket that organizes box H/ACA RNPs. *Nat Struct Mol Biol*, 2005, 12(12): 1101–1107. [DOI]
- [36] Venteicher AS, Abreu EB, Meng ZJ, McCann KE, Terns RM, Veenstra TD, Terns MP, Artandi SE. A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. *Science*, 2009, 323(5914): 644–648. [DOI]
- [37] Tomlinson RL, Li J, Culp BR, Terns RM, Terns MP. A Cajal body-independent pathway for telomerase trafficking in mice. *Exp Cell Res*, 2010, 316(17): 2797–2809. [DOI]
- [38] Lin J, Jin R, Zhang B, Chen H, Bai YX, Yang PX, Han SW, Xie YH, Huang PT, Huang CF, Huang JJ. Nucleolar localization of TERT is unrelated to telomerase function in

- human cells. *J Cell Sci*, 2008, 121(Pt 13): 2169–2176. [DOI]
- [39] Wong JMY, Kyasa MJ, Hutchins L, Collins K. Telomerase RNA deficiency in peripheral blood mononuclear cells in X-linked dyskeratosis congenita. *Hum Genet*, 2004, 115(5): 448–455. [DOI]
- [40] Gallardo F, Chartrand P. Telomerase biogenesis: The long road before getting to the end. *RNA Biol*, 2008, 5(4): 212–215. [DOI]
- [41] Collins K. The biogenesis and regulation of telomerase holoenzymes. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2006, 7(7): 484–494. [DOI]
- [42] Grozdanov PN, Roy S, Kittur N, Thomas Meier U. SHQ1 is required prior to NAF1 for assembly of H/ACA small nucleolar and telomerase RNPs. *RNA*, 2009, 15(6): 1188–1197. [DOI]
- [43] Abreu E, Arionovska E, Reichenbach P, Cristofari G, Culp B, Terns RM, Lingner J, Terns MP. TIN2-tethered TPP1 recruits human telomerase to telomeres *in vivo*. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(12): 2971–2982. [DOI]
- [44] Cifuentes-Rojas C, Shippen DE. Telomerase regulation. *Mutat Res*, 2012, 730(1/2): 20–27. [DOI]
- [45] Cioce M, Lamond AI. Cajal bodies: a long history of discovery. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005, 21: 105–131. [DOI]
- [46] Jady BE, Richard P, Bertrand E, Kiss T. Cell cycle-dependent recruitment of telomerase RNA and Cajal bodies to human telomeres. *Mol Biol Cell*, 2006, 17(2): 944–954. [DOI]
- [47] Tomlinson RL, Ziegler TD, Supakorndej T, Terns RM, Terns MP. Cell cycle-regulated trafficking of human telomerase to telomeres. *Mol Biol Cell*, 2006, 17(2): 955–965. [DOI]
- [48] Venteicher AS, Artandi SE. TCAB1: driving telomerase to Cajal bodies. *Cell Cycle*, 2009, 8(9): 1329–1331. [DOI]
- [49] Wang F, Podell ER, Zaug AJ, Yang YT, Baciu P, Cech TR, Lei M. The POT1–TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature*, 2007, 445(7127): 506–510. [DOI]
- [50] Xin HW, Liu D, Wan M, Safari A, Kim H, Sun W, O'Connor MS, Zhou SY. TPP1 is a homologue of ciliate TEBP- β and interacts with POT1 to recruit telomerase. *Nature*, 2007, 445(7127): 559–562. [DOI]
- [51] Shore D, Bianchi A. Telomere length regulation: coupling DNA end processing to feedback regulation of telomerase. *EMBO J*, 2009, 28(16): 2309–2322. [DOI]
- [52] Roth A, Harley CB, Baerlocher GM. Imetelstat (GRN163L)-telomerase-based cancer therapy. *Recent Results Cancer Res*, 2010, 184: 221–234. [DOI]
- [53] Chakraborty S, Ghosh U, Bhattacharyya NP, Bhattacharya RK, Roy M. Inhibition of telomerase activity and induction of apoptosis by curcumin in K-562 cells. *Mutat Res*, 2006, 596(1/2): 81–90. [DOI]
- [54] Mukherjee Nee Chakraborty S, Ghosh U, Bhattacharyya NP, Bhattacharya RK, Dey S, Roy M. Curcumin-induced apoptosis in human leukemia cell HL-60 is associated with inhibition of telomerase activity. *Mol Cell Biochem*, 2007, 297(1/2): 31–39. [DOI]
- [55] Lee JH, Chung IK. Curcumin inhibits nuclear localization of telomerase by dissociating the Hsp90 co-chaperone p23 from hTERT. *Cancer Lett*, 2010, 290(1): 76–86. [DOI]
- [56] Moon DO, Kang SH, Kim KC, Kim MO, Choi YH, Kim GY. Sulforaphane decreases viability and telomerase activity in hepatocellular carcinoma Hep3B cells through the reactive oxygen species-dependent pathway. *Cancer Lett*, 2010, 295(2): 260–266. [DOI]
- [57] Zhang XF, Tang WR, Luo Y. Aging or tumor: the crosstalk between telomerase and p53. *Hereditas (Beijing)*, 2009, 31(5): 451–456.
- 张秀峰, 唐文如, 罗瑛. 衰老或肿瘤: 端粒酶和 p53 的相互作用. *遗传*, 2009, 31(5): 451–456. [DOI]

(责任编辑: 朱卫国)