

人端粒保护蛋白 1 的结构与功能

黄璐¹ 胡丽华^{1△} 李一荣^{1△}

[关键词] 人端粒保护蛋白 1;端粒;端粒酶 DNA

[中图分类号] R997.1 [文献标志码] A [文章编号] 1004-2806(2013)04-0283-04

Structure and function of human protection of telomere 1

Summary Human protection of telomere 1(hPOT1),including two domains binding oligonucleotide and one domain interacting with TPP1,is an important subunit of telosome. hPOT1 binds double strands DNA directly,furthermore,it is associated with single strand DNA indirectly by interaction with TPP1. hPOT1 is an important factor for protecting the ends of telomere from DNA damage reaction,and maintaining stability of telomeric DNA length,chromosome and telosome.

Key words human protection of telomere 1;telomere;telomerase;DNA

人类端粒 DNA 由富含 G 的短片段重复序列(TTAGGG)串联组成,包括双链和 3'端突出的单链两部分,不能编码蛋白质^[1-2]。通常认为端粒酶是调控端粒 DNA 长度最重要的因素,端粒酶活性的降低将导致端粒长度的下降,细胞分裂停滞。端粒酶活性通常由其催化亚单位(端粒酶逆转录酶)所决定^[3-4],但奇怪的是,端粒双链 DNA 结合蛋白 TRF1 与 TRF2,也能调控端粒酶活性,但它们并无直接联系。最近的研究显示人端粒保护蛋白 1(hPOT1)能将 TRF1-TRF2 复合物携带的端粒长度信息传递到端粒 DNA 的末端与端粒酶,从而维持端粒 DNA 长度的稳定^[5]。本文就端粒结构、hPOT1 的基因结构、hPOT1 的理化性质以及 hPOT1 的功能做一综述。

1 人类端粒结构

人类端粒位于染色体的末端,为一蛋白-DNA 复合体。端粒 DNA 由富含 G 的重复序列(TTAGGG)串联组成,包括双链 DNA 与 3'端突出的单链 DNA 两部分,它不编码蛋白质,也无内含子与外显子。细胞每分裂一次其 3'端突出的单链 DNA 就缩短并导致端粒 DNA 长度的缩短,称为复制性端粒缩短。当端粒缩短到一定程度时,细胞分裂停滞,出现端粒危机,导致衰老与死亡的发生。端粒的蛋白组分又称端粒庇护素或端粒体,包括 hPOT1、TRF1、TRF2、RAP1、TIN2 和 TPP1 等 6 种蛋白^[6-7]。TRF1 与 TRF2 均能与端粒双链 DNA 结合,而 hPOT1 则能与端粒单链 DNA 结合。除了能与 DNA 结合外,端粒体还存在多种蛋白质的相互作用,如 TIN2 与 TPP1,TIN2 与 TRF1 以

及 hPOT1 与 TPP1 等。借助上述相互作用,端粒以一个闭环的形式存在于染色体末端,并将突出的单链 DNA 包裹在中间,抑制端粒酶在端粒末端聚集,维持端粒稳定与染色体稳定^[8-9]。

2 hPOT1 的基因结构

2001 年首次在人卵巢和胸腺等标本中检测 hPOT1 mRNA,并成功从卵巢标本中克隆到 hPOT1 基因。hPOT1 位于人类 7q31.33,全长约 120 000 bp,含有 21 个外显子,编码约 71 000 的蛋白质。hPOT1 蛋白合成的起始位点为第 6 外显子的第 1 个 AUG,而不是真核细胞通常采用的第 1 外显子的第 1 个 AUG,小鼠和猕猴的 POT1 基因同样也存在此现象。通过基因测序发现 hPOT1 的 6~20 外显子之间还存在其他 4 种选择性剪切方式,分别称为 hPOT1 变异体 2、3、4 和 5:①变异体 2 在 12 与 13 外显子插入外显子 12a,由于外显子 12a 存在终止密码子,编码的蛋白转为 38 000;②变异体 3 缺失外显子 17,导致其开放阅读框的移码,终止密码子出现于 18 外显子,编码 58 000 的蛋白质;③变异体 4 缺失外显子 8,导致开放阅读框移码仅编码 5 000 的蛋白质;④变异体 5 在外显子 15 与 16 插入带有终止密码子的外显子 15a,编码的蛋白质转变为 52 000^[10]。

POT1 基因序列相对保守,尤其是其 5'端序列高度保守,Baumann 等^[11]采用 PSI-BLAST 搜寻发现,绿猴 *Macaca fascicularis* 的 POT1 与 hPOT1 的开放阅读框 98%相同,99%相似;人与鼠的 POT1 也有 75%相同,84%类似;另外 hPOT1 的 5'端与分裂期酵母以及纤毛原虫都具有一定的同源性,如 *Schizosaccharomyces pombe* 的 POT1 与 hPOT1 有 26%的基因序列相同和 48%的序列类似,而 *Oxytricha nova* 的 POT1 与 hPOT1 有 23%的序列

¹华中科技大学同济医学院附属协和医院检验科(武汉,430022)

[△]审校者

通信作者:胡丽华,E-mail:xhhlh@126.com

相同和 39% 的类似。

hPOT1 基因表达于多种组织与器官,其中脾脏、肝脏和睾丸组织表达量最高,在结肠与骨骼肌组织表达相对较低,同时在多种肿瘤组织也发现表达 hPOT1,如乳腺癌、肺癌、前列腺癌、卵巢癌以及胰腺癌等。hPOT1 及其变异体 2~4 存在所有组织,但是变异体 5 只存在外周血白细胞中^[10-11]。

3 hPOT1 的理化性质

hPOT1 由 634 个氨基酸组成,Baumann 和 Loayza 等分别运用间接免疫荧光和 ChIP 等方法发现该蛋白不仅定位于细胞核中,而且在细胞间期时位于染色体末端,与端粒所处位置一致^[5,10]。通常 hPOT1 与 TRF1 以及 TRF2 等其他蛋白形成帽状结构,保护染色体末端免受核酸外切酶的攻击,因此 hPOT1 被称为端粒保护蛋白 1。最近 Chen 等^[12]报道 HTC75 细胞中的 hPOT1 蛋白中存在胞核与胞质 2 种形式,而采用质谱分析,则发现 293T 细胞的部分胞质蛋白也能与 hPOT1 相互作用,提示 hPOT1 主要分布于细胞核、但仍有少量分布于细胞质中^[13]。

hPOT1 含有 2 个寡核苷酸/寡糖结合结构域(分别称为 OB1 和 OB2 结构域)和一个 TPP1 结合结构域。OB 结构域位于 hPOT1 的氨基端,通常由 126 个氨基酸组成,通过晶体结构分析发现 OB 结构域由 5 个反向平行的 β 片层组成,而且 β 片层和两个突出的环 L12、L45 形成 OB 特殊的凹槽样结构,象钳夹样紧密结合端粒单链 DNA^[14-15]。体外实验显示端粒单链 DNA 结合 OB 结构域的最小单元序列为 TTAGGGTTAG,其中结合 OB1 结构域的为 TTAGGG 6 个核苷酸,而结合 OB2 结构域的为 TTAG^[14]。但 Diego Loayza 等发现当 hPOT1 失去 OB 结构域(hPOT1 Δ OB)时,hPOT1 还能与端粒 DNA 结合,推测 hPOT1 Δ OB 可能通过与 TRF1(TRF1 能直接与端粒双链 DNA 结合)的相互作用,而间接结合到端粒 DNA 上^[16]。随后研究发现 hPOT1 蛋白具有 TPP1 结合结构域,能够与 TPP1 相互作用,后者再经过 TIN2 与 TRF1 和 TRF2 相互作用,从而揭示了 hPOT1 失去 OB 结构域后还能结合端粒 DNA 的幕后原因^[17-18]。因此 hPOT1 不仅能直接与端粒单链 DNA 结合,还能通过与 TPP1 的相互作用,从而间接地结合到端粒双链 DNA 上。

4 hPOT1 的功能

4.1 hPOT1 与端粒 DNA 长度的调节

Colgin 等^[19]将 hPOT1 基因转染端粒酶阳性的 HT1080 细胞,发现端粒酶平均水平并不增加,但端粒局部端粒酶的活性增加,采用放射自显影技术检测端粒平均长度,发现 hPOT1 基因转染成功的 HT1080 细胞端粒长度平均为 $(14 \pm 4) \times 10^3$ bp,

比阴性对照长 8 000 bp,同时杂交密度增加。进一步研究发现,变异体 1 有 5/10 个细胞克隆端粒 DNA 延长,变异体 3 有 2/10 个细胞克隆端粒 DNA 延长,而变异体 2 无细胞克隆端粒 DNA 延长。由于变异体 1、2、3 均能与端粒单链 DNA 直接结合,而变异体 2 缺失羧基端一半的氨基酸,因此 hPOT1 的羧基端是延长端粒 DNA 不可或缺的重要因素^[19]。端粒酶阴性的 GMC823 细胞转染 hPOT1 基因后端粒平均长度几乎没有变化,但在同时转染 hTERT 和 hPOT1 基因人为造成端粒酶阳性的环境,GMC823 细胞端粒长度明显延长,显示 hPOT1 表达水平上调能延长端粒酶阳性细胞的端粒 DNA 长度^[19]。

抑制 hPOT1 基因的表达水平同样能延长端粒 DNA 长度:①Possemato 等运用小干扰 RNA 技术抑制人纤维瘤细胞 hPOT1 表达的同时上调 hTERT,与单纯上调 hTERT 的细胞进行比较,则端粒 DNA 长度延长约 400 bp 左右^[20];②Ye 等同样采用小干扰 RNA 技术抑制 HTC75 细胞 hPOT1 的表达,与对照组比较,端粒 DNA 长度明显延长,而细胞的增值不受影响。对于其他脊椎动物的研究也出现相同的实验结果^[21];③采用小干扰 RNA 技术敲除鸡 DT40 细胞中的 POT1 后 12 h,则端粒 DNA 长度平均延长约 317 bp,进一步支持抑制 hPOT1 基因的表达水平同样能延长端粒 DNA 长度^[22]。

上调与抑制 hPOT1 基因的表达水平均能延长端粒 DNA 长度,意味端粒局部端粒酶的活性增加。一个合理的解释是上调与抑制 hPOT1 均能破坏端粒的封闭构象,导致端粒单链 DNA 暴露,端粒酶与端粒单链 DNA 结合,导致端粒 DNA 延长^[23-24]。但是其延长机制又存在细微差异:①上调 hPOT1 基因的表达水平,则部分与端粒单链 DNA 结合的 hPOT1,不能与 TPP1 结合,导致端粒庇护素的桥连作用被破坏,端粒单链 DNA 被暴露,但是此时暴露的端粒单链 DNA 通常与 hPOT1 结合;②抑制 hPOT1 基因的表达水平,则与端粒单链 DNA 结合的 hPOT1 显著减少,端粒单链 DNA 被暴露,但是此时暴露的端粒单链 DNA 通常不与 hPOT1 结合。

4.2 hPOT1 与端粒稳定以及端粒 DNA 损伤

端粒单链 DNA 在化学组成上与损伤的 DNA 极其相似,但通常并不诱发端粒 DNA 损伤反应,这得益于端粒的封闭构象。研究表明 hPOT1 和其同源物表达水平的改变诱导端粒 DNA 的损伤反应和破坏端粒稳定:①在人纤维瘤细胞株 NHF 和 WI-38,采用小干扰 RNA 技术抑制 hPOT1 的表达则诱导严重的 DNA 损伤反应, γ H2AX 的表达水平显著升高,且 γ H2AX 焦点大于或等于 10 的细胞比例显著增加且均大于 40%,另外对 HT1080 和

HCT 细胞的研究发现,抑制 hPOT1 的表达则分裂后期桥的数量显著增加,并且端粒 3' 端突出的 TTAGGG 重复序列减少,导致端粒不稳定^[25];②采用小干扰 RNA 技术抑制 HeLa 细胞的 hPOT1 的表达,则出现分裂间期桥的细胞比例增加约 4 倍,端粒彼此连接比例增加,导致端粒不稳定,细胞易于衰老与死亡,易于出现 Cut (cell untimely torn, 细胞不及时分裂) 样突变表型,另外采用小干扰 RNA 技术抑制 HT1080 细胞的 hPOT1 的表达,则易出现分裂后期染色体桥与微核,导致染色体不稳定^[26];③ Churikov 等^[22] 研究发现,抑制鸡 DT40 的 POT1 表达,则会导致急性的端粒 DNA 损伤反应,细胞周期 G2 期的阻滞与端粒单链 DNA 的延长,而且端粒 DNA 损伤反应通过 ATR 而不是 ATM 途径介导;④破坏鼠胚胎纤维瘤细胞的 POT1a 或 POT1b,会诱发严重的端粒 DNA 损伤反应,细胞增生降低,染色体重复复制和姐妹染色体重组率增加,同样端粒 DNA 损伤反应也是通过 ATR 途径介导^[27-28];⑤ Chebel 等研究发现, T 淋巴细胞长期培养并采用 PHA 刺激, PHA 刺激后一个星期, hPOT1 基因的表达水平轻度下降,同时 50% 的 T 淋巴细胞出现 γ H2AX 焦点与 DNA 损伤反应,进一步支持 hPOT1 的表达水平与 DNA 损伤反应密切相关。

总之 hPOT1 是端粒体中惟一能直接与端粒末端单链 DNA 结合的蛋白,是端粒形成闭合环状结构不可或缺的组分,借助端粒闭合环状结构,确保端粒单链 DNA 不被核酸外切酶所识别,不形成端粒 DNA 损伤反应,维持端粒长度的稳定与染色体的稳定。

参考文献

- [1] TUMPEL S, RUDOLPH K L. The role of telomere shortening in somatic stem cells and tissue aging: lessons from telomerase model systems [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2012, 1266: 28-39.
- [2] ZAKIAN V A. Telomeres: the beginnings and ends of eukaryotic chromosomes [J]. *Exp Cell Res*, 2012, 318: 1456-1460.
- [3] DANIEL M, PEEK G W, TOLLEFSBOL T O. Regulation of the human catalytic subunit of telomerase (hTERT) [J]. *Gene*, 2012, 498: 135-46.
- [4] AUTEXIER C, LUE N F. The structure and function of telomerase reverse transcriptase [J]. *Annu Rev Biochem*, 2006, 75: 493-517.
- [5] LOAYZA D, DE LANGE T. POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control [J]. *Nature*, 2003, 423: 1013-1018.
- [6] XIN H, LIU D, SONGYANG Z. The telosome/shelterin complex and its functions [J]. *Genome Biol*, 2008, 9: 232-232.
- [7] SFEIR A, DE LANGE T. Removal of shelterin reveals the telomere end-protection problem [J]. *Science*, 2012, 336: 593-597.
- [8] LONGHESE M P, ANBALAGAN S, MARTINA M, et al. The role of shelterin in maintaining telomere integrity [J]. *Front Biosci*, 2012, 17: 1715-28.
- [9] DIOTTI R, LOAYZA D. Shelterin complex and associated factors at human telomeres [J]. *Nucleus*, 2011, 2: 119-135.
- [10] BAUMANN P, PODELL E, CECH T R. Human pot1 (Protection of Telomeres) protein: cytolocalization, gene structure, and alternative splicing [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22: 8079-8087.
- [11] BAUMANN P, CECH T R. Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans [J]. *Science*, 2001, 292: 1171-1175.
- [12] CHEN L Y, LIU D, ZHOU S Y. Telomere maintenance through spatial control of telomeric proteins [J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27: 5898-5909.
- [13] GIANNONE R J, MCDONALD H W, HURST G B, et al. The protein network surrounding the human telomere repeat binding factors TRF1, TRF2, and POT1 [J]. *PLoS One*, 2010, 5: e12407-e12407.
- [14] 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: 1223-1229.
- [15] LEWIS K A, WUTTKE D S. Telomerase and telomere-associated proteins: structural insights into mechanism and evolution [J]. *Structure*, 2012, 20: 28-39.
- [16] LOAYZA D, PARSONS H, DONIGIAN J, et al. DNA binding features of human POT1: a nonamer 5'-TAGGGTTAG-3' minimal binding site, sequence specificity, and internal binding to multimeric sites [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 13241-13248.
- [17] XIN H, LIU D, WAN M, et al. TPP1 is a homologue of ciliate TEBP-beta and interacts with POT1 to recruit telomerase [J]. *Nature*, 2007, 445: 559-562.
- [18] LATRICK C M, CECH T R. POT1-TPP1 enhances telomerase processivity by slowing primer dissociation and aiding translocation [J]. *EMBO J*, 2010, 29: 924-933.
- [19] COLGIN L M, BARAN K, BAUMANN P, et al. Human POT1 facilitates telomere elongation by telomerase [J]. *Curr Biol*, 2003, 13: 942-946.
- [20] POSSEMATO R, TIMMONS J C, BAUERLEIN E L, et al. Suppression of hPOT1 in diploid human cells results in an hTERT-dependent alteration of telomere length dynamics [J]. *Mol Cancer Res*, 2008, 6: 1582-1593.
- [21] YE J Z, HOCKEMEYER D, KRUTCHINSKY A N, et al. POT1-interacting protein PIP1: a telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/

- TRF1 complex[J]. Genes Dev, 2004, 18: 1649–1654.
- [22] CHURIKOV D, WEI C, PRICE C M. Vertebrate POT1 restricts G-overhang length and prevents activation of a telomeric DNA damage checkpoint but is dispensable for overhang protection[J]. Mol Cell Biol, 2006, 26: 6971–6982.
- [23] CHURIKOV D, PRICE C M. Pot1 and cell cycle progression cooperate in telomere length regulation[J]. Nat Struct Mol Biol, 2008, 15: 79–84.
- [24] DE LANGE T. How telomeres solve the end-protection problem[J]. Science, 2009, 326: 948–952.
- [25] YANG Q, ZHANG R, HORIKAWA I, et al. Functional diversity of human protection of telomeres 1 isoforms in telomere protection and cellular senescence[J]. Cancer Res, 2007, 67: 11677–11686.
- [26] VELDMAN T, ETHERIDGE K T, COUNTER C M. Loss of hPot1 function leads to telomere instability and a cut-like phenotype[J]. Curr Biol, 2004, 14: 2264–2270.
- [27] WU L, MULTANI A S, HE H, et al. Pot1 deficiency initiates DNA damage checkpoint activation and aberrant homologous recombination at telomeres[J]. Cell, 2006, 126: 49–62.
- [28] HOCKEMEYER D, DANIELS J P, TAKAI H, et al. Recent expansion of the telomeric complex in rodents: Two distinct POT1 proteins protect mouse telomeres[J]. Cell, 2006, 126: 63–77.
- [29] CHEBEL A, BAUWENS S, GERLAND L M, et al. Telomere uncapping during in vitro T-lymphocyte senescence[J]. Aging Cell, 2009, 8: 52–64.

(收稿日期: 2012-09-09)

血清学指标检测对类风湿关节炎的诊断意义

李祚品¹ 崔显念¹ 吴波¹ 周燕¹ 李祚文¹

[关键词] 类风湿关节炎; 自身抗体; 细胞因子; 蛋白组学

[中图分类号] R593.22 [文献标志码] A [文章编号] 1004-2806(2013)04-0286-03

Diagnosis significance of serology index detection in rheumatoid arthritis

Summary Rheumatoid arthritis (RA) is a common systemic autoimmune diseases, which is lack of specific diagnostic and treatment currently, especially for early diagnosis and atypical cases are easy to misdiagnosis and wrong treatment. In recent years, immunology and molecular biology have been continuous improved. New markers such as osteopontin (OPN), anti-keratin antibodies (AKA), anti-SA antibodies, poly anti-fiber protein antibody (AFA), anti-perinuclear factor antibodies (APF) and anti-CCP antibodies were found which would improve RA diagnostic sensitivity and specificity. These detection of serology indexes combination could help to improve the early diagnosis of RA.

Key words rheumatoid arthritis; autoantibodies; cytokine; proteomics

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以慢性破坏性关节病变为特征的全身性自身免疫病^[1]。具有高发性、高致残性等特点,其病理特征为慢性滑膜炎,发病2年内即可发生不可逆性的关节损害,严重影响人们的生活质量,早期诊断和治疗是减少和阻止病情发展及防止致残的关键。因此,在临床中要有高敏感性、高特异性的实验室检测指标和诊断方法,有助于评价疾病的活动性及预后,为RA的早期诊断提供可靠依据。RA患者体内存在多种自身抗体、细胞因子及相关蛋白,现就上述相关血清学检测指标综述如下。

1 自身抗体检测

随着免疫学的不断发展,生物科学技术水平的

不断提高,近年相继发现抗角蛋白抗体(AKA)、抗Sa抗体、抗纤聚蛋白抗体(AFA)都对RA有较高的特异性,并可在疾病的早期出现^[2]。它们的共同抗原决定簇为环瓜氨酸肽(cyclic citiullinated peptide, CCP)由于特异性高,已成为RA新的血清学标志物,为临床早期诊断提供了理论基础^[3]。冯永清等^[4]采用ELISA法对137例RA患者血清抗CCP抗体进行检测,发现其特异性可高达96.1%。罗德梅等^[5]在实验中证实抗CCP抗体对RA的发病具有重要的预测价值,且AKA敏感性、阴性预测值低于抗CCP抗体,证实了AKA对RA也有很好的特异性,进一步说明了抗CCP抗体和AKA在RA诊断中的意义。朱晓红等^[6]对80例RA患者和56例非RA患者同时检测抗CCP抗体和RF进

¹恩施州中心医院检验科(湖北恩施, 445000)