

卡哈尔体——功能复杂的核内细胞器

岳志霞^{1,2} 张晨光² 丁卫^{2*}

(¹首都医科大学附属北京儿童医院血液肿瘤中心, 北京 100045; ²首都医科大学医学遗传学系, 北京 100069)

摘要 卡哈尔体(Cajal body, CB)的发现可以溯源至100多年前,而直到近10年的研究取得突破性进展,才逐渐揭示了其复杂的分子组成及生理功能。作为当前备受关注的核内小体之一, CB是细胞核质中处于动态变化的细胞器,广泛存在于高等真核生物的细胞核内,在电镜下表现为球形小体样结构,其中p80 Coilin蛋白是CB最为明确的特异性标志物。CB的分子构成十分复杂,主要包括参与mRNA剪接所需、称为snRNP的核酸与蛋白质复合体的各种组分,以及snoRNAs、scaRNAs和其他相关蛋白质。此外,一些基因活化中不可或缺的转录因子、mRNA修饰的必需蛋白因子以及与细胞增殖和细胞周期功能相关的功能分子等,也被发现存在于CB之中或周边。其中,snRNAs、snoRNAs与scaRNAs等低分子量RNAs在CB中完成自身的成熟并且参与RNP的组装。染色体端粒长度的维持以及组蛋白基因簇的表观遗传修饰依赖于CB的形成与功能发挥。由此可见, CB与细胞周期、细胞增殖、应激和老化等一系列重要的细胞生物学过程存在密切的联系,同时其功能和表现的异常往往也提示与肿瘤的发生相关。该文在归纳CB相关研究最新进展的同时,着重讨论CB的结构与功能及其与疾病的潜在联系。

关键词 卡哈尔体; 核内小体; Coilin; snRNP; 端粒酶

Cajal Body—A Nuclear Organelle with Sophisticate Functions

Yue Zhixia^{1,2}, Zhang Chenguang², Ding Wei^{2*}

(¹Hematology Oncology Center at Beijing Children's Hospital in affiliation of Capital Medical University, Beijing 100045, China;

²Department of Medical Genetics, School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract Cajal body (CB) has been discovered more than a century. Nonetheless, it was only lately identified for its complex molecular components and sophisticated functions with the research breakthroughs of the past decade. As an interesting and dynamic organelle in the nucleoplasm, CB widely exist in a vast spectrum of higher eukaryotes and is characterized as the globular structures under the electro-microscope, in which the protein of p80 Coilin is a distinguishable molecular marker. Various components have been identified in CB, including the nucleic acids and snRNP complex needed for mRNA splicing, snoRNAs and scaRNAs with their associated proteins, certain transcription factors required for gene activation, protein factors for mRNA modification, as well as the key molecules to regulate cell proliferation and cell cycle. CB is known as the exact site for snRNAs, snoRNAs, and scaRNAs maturation, and it is also responsible for maintaining the length of telomeres. Hence, CB is believed to re-

收稿日期: 2013-04-17 接受日期: 2013-07-25

国家自然科学基金(批准号: 30970161、81201816)、北京市人才强教创新人才项目(批准号: PHR201006111)、北京市教委科技发展计划(批准号: KM201010025001)和儿童白血病的国际化新药临床评价研究技术平台建设项目(批准号: 2011ZX09302-007-01)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-83911472, E-mail: weiding@ccmu.edu.cn

Received: April 17, 2013 Received: July 25, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30970161, 81201816), Beijing Municipal Fund for the Reinforcement of Higher Education (Grant No.PHR201006111), and the Science and Technology Development Project from Beijing Education Committee (Grant No.KM201010025001)

*Corresponding author. Tel: +86-10-83911472, E-mail: weiding@ccmu.edu.cn

网络出版时间: 2013-09-11 14:36 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130911.1436.008.html>

late closely with cell cycle and the proliferation, stress and aging of cells. The abnormal function of CB is suggested to associate with disease processes, such as tumorigenesis. This review summarizes the latest advances of CB-related research, and discusses mainly about the structure and function of the Cajal body in connection with diseases.

Key words Cajal body; nuclear bodies; Coilin; snRNP; telomerase

细胞核是非常重要的亚细胞结构, 存贮了真核细胞几乎全部的遗传信息。经过近两个世纪来无数科学家的不懈努力, 特别是将形态学的研究结果和生物化学的分析技术完美结合之后, 细胞核被证实是DNA复制、RNA转录、mRNA剪接和核糖体亚单位装配等一系列重要生命活动进行的场所。虽然人们对细胞核的基本结构与主要功能已经有了比较深入的了解, 然而长期以来的研究发现, 细胞核中事实上还含有很多微小的细胞器样结构, 对于这些细胞核内部结构的动态变化及其相互间的作用和联系仍困扰着很多当代的科学家。这些细胞核内的亚细胞结构通常被称为核内小体或核体(nuclear body, NB), 由成分复杂的蛋白质和RNA及其复合体组成。与胞浆中的各种形态的细胞器有所不同, 这些核体没有外膜, 但以高度动态的细胞器结构形式广泛存在于动物和植物细胞的核基质中。荧光显微镜的出现和荧光蛋白标签等关键技术的快速发展为核体的研究带来了极大的便利, 使研究人员能够迅速鉴定出其中发挥功能的生物大分子, 并对它们之间的相互作用和彼此联系进行动态的深入研究。而近年来, 卡哈尔体(Cajal body, CB)成为核体中最受关注并且研究进展最快的结构之一。

1 Cajal body的发现

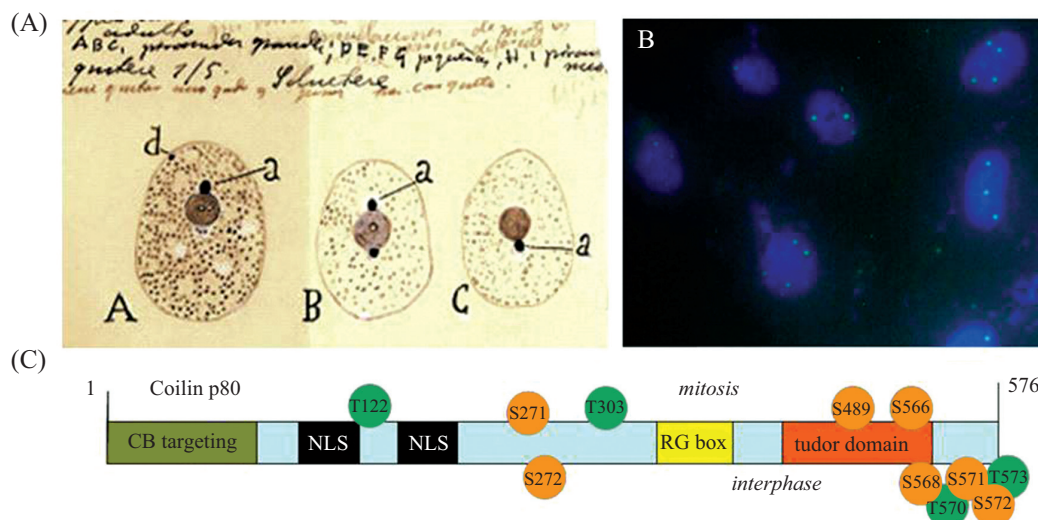
Ramony Cajal是卡哈尔体的最初发现者。1903年, 当Cajal用硝酸银染液染色神经细胞时, 发现细胞核中出现一些深染的结构, 往往会与核仁连在一起, 因而他把这种结构称为核仁的辅助体(图1a)。由于当时的技术限制和对生物学认识的缺乏, 对于这种新发现的辅助体具有怎样的生理功能, 则始终未能明确。半个世纪以后, 1954年美国人Gall在研究蝗虫卵细胞与细胞核的基因表现时, 也观察到卵细胞核中存在一种类似的球状结构, 并称之为球体。之后又有人发现在哺乳动物细胞系的胞核中存在有缠卷体(coiled body)的构造, 在电子显微镜下会呈现一团缠绕卷曲的样态。对于所有这些未知的形态学结构, 长期以来一直没有人能够回答它们在细胞中所

起的生物学作用。人类科学知识的拓展经常得益于关键技术的突破, 在随后的研究中, 人们从一些自身免疫性疾病患者所分离出的血清, 发现一种能够特异性识别缠卷体的抗体。借助于这种抗体的发现, 研究人员成功地鉴定出这种抗体所识别的蛋白质抗原, 并且将之命名为Coilin。令人惊奇的是, 研究表明此前Cajal、Gall及其他人所发现的细胞核内结构, 均含有高丰度的Coilin, 在本质上可认为是由类似物质所组成的特殊结构。自此, 为避免不同名称而带来的混乱, 同时为纪念其最初的发现者, 于是Cajal body (CB)被正式定为统一的命名^[1-2]。

2 Cajal body的形态

CB广泛存在于高等真核生物的细胞核内, 在电镜下表现为球形的小体, 直径约0.5~1 μm , 有时可以更大。应用荧光显微镜分别观察标记后的固定细胞或活细胞, CB均可呈现为明亮的核内聚点(图1b)。CB的数量和大小会因物种、组织以及细胞分化阶段的不同而出现改变。一般说来, 早期胚胎的CB数量要多于晚期胚胎, 并随着细胞的分化而数量逐渐减少。在分化组织的体细胞中, 一些代谢活性较高的细胞, 如肌肉、神经元和肿瘤细胞等, CB的数量则较多。CB的数量和大小同时受到细胞周期的影响而发生改变, 在G₁/S期可达到最大值。CB一般会在M期发生解聚, 其再组装过程则依赖于细胞的基因转录水平和增殖的速率。有趣的是, CB的细胞核定位也并非完全静止的, 其在细胞分裂间期可以出现非常大的位移, 甚至能够以1 $\mu\text{m}/\text{min}$ 的速率穿越整个细胞核。某些情况下, 个别的CB还可显示出更为复杂的行为, 包括成簇的聚集, 在核质中发生融合, 或者分裂为两个姐妹小体, 甚至以细胞核为中心进行往复运动等^[3]。

作为CB的主要成分, p80 Coilin蛋白是其中含量丰度最高的蛋白质, 被公认为CB鉴定的标志物^[4]。正是由于Coilin的发现, 使得关于CB蛋白质组的研究得以迅速发展。目前在CB中所发现的蛋白质成分多达几十种, 这些蛋白质通过相互招募和聚集形



A: Ramon y Cajal最初发现Cajal body的手稿; B: HeLa细胞Coilin抗体(绿色)免疫荧光染色(40×), DAPI染细胞核(图片来自丁卫教授实验室, 2013); C: Coilin的功能结构域及磷酸化位点(根据参考文献[6]修改)。

A: the original drawing scheme of Cajal body by Ramon y Cajal; B: immunofluorescent staining of Coilin (green) in HeLa cells (40×). The nuclei were stained with DAPI (from Dr. Ding laboratory, 2013); C: the functional domains with known phosphorylation sites of Coilin (adapted from reference [6]).

图1 卡哈尔体的形态与标志性组成分子

Fig.1 The morphology and marker component molecule of Cajal Bodies

成丰富的蛋白质与蛋白质相互作用网络, 进而作为一个整体结构在细胞核中生成并发挥生物学作用。由于缺乏磷脂膜的屏障作用, CB中的各种分子与周围的核浆物质处于经常性的交换流动状态。同时, 由于各组成分子间存在的相互作用较弱, 使缓慢的物质扩散可发生在不同的CB之间, 从而维持大多数CB在物质组成上的动态平衡。有人提出, 这些弱相互作用类似于水环境中脂质分子间的疏水作用, 疏水作用使脂质分子与水分离, 但却不足以维持脂滴形态。电镜下观察, CB可呈现缠卷体的构造, 其多孔结构可以允许分子量达15 MDa的葡聚糖颗粒通过, 在蛋白质的绝对浓度、黏滞度、密度等方面均与核浆表现相似^[5]。

3 Cajal body的分子组成

Coilin是卡哈尔体中含量最丰富的组成蛋白之一, 也是用于鉴定CB的最为明确的标志物(图1C)。人类的Coilin蛋白由576个氨基酸组成, 分子量为62.6 kDa。Coilin的磷酸化是影响其活性的主要翻译后修饰类型, 其氨基酸序列中至少包含17个能够被磷酸化的氨基酸残基。研究发现, 与富含CB的分化细胞相比, 原代细胞核内的CB数量较少, 且Coilin常表现为高度磷酸化的状态。CB在M期会发生解聚, 而当CB解聚后, Coilin的磷酸化程度有所增加。

最新研究发现, Coilin的蛋白氨基酸序列中存在一个Tudor样结构域(460~560 aa)。Tudor结构域是由约100个氨基酸残基构成的保守性序列, 多由5条高度弯曲的反向平行 β -折叠肽段组成, 所形成的桶型结构可结合双甲基化的精氨酸。Tudor结构域是介导蛋白质-蛋白质相互作用的常见结构域之一, 可以特异性识别并结合一些甲基化的蛋白质, 多个串联重复的Tudor结构域可见于TopBP2、53BP1等重要分子。而运动神经元生存基因蛋白(survival motor neuron, SMN)同样存在类似的Tudor结构域, 并且与snRNP生物合成过程中Sm蛋白中的精氨酸残基的对称性双甲基化修饰相关。然而, Coilin的Tudor结构域则未发现与甲基化的精氨酸发生相互作用, 提示Coilin的Tudor结构域与SMN的Tudor结构域在功能上可能有所不同。有趣的是, 位于Coilin的Tudor结构域上游存在一个RG盒(RG box), 其中含有对称双甲基化的精氨酸残基, 这些精氨酸残基可以影响Coilin与SMN的相互作用^[6]。

Coilin对CB的形成、稳定其分子组成, 以及介导其功能的发挥至关重要。基因敲除实验显示, coilin基因缺失的斑马鱼胚胎发生CB的缺陷, 不能完成胚胎的发生, 伴随有RNA剪接的缺陷和成熟snRNP的数量减少; coilin基因敲除的小鼠出现严重的生殖能力缺陷, 包括宫内死胎数量的增加和生殖

器官的发育成熟障碍等。研究表明, Coilin壳结合SMN以及各种Sm和Lsm蛋白, 提示其可能在snRNP的组装或修饰中发挥重要的功能^[7-8]。体外研究显示, Coilin显著抑制非同源性DNA的末端连接, 进而影响DNA损伤后的细胞活力。此外, Coilin可被发现沉积在病毒感染后受损的着丝粒区, 并在UV-C照射后形成微小聚点, 结果提示了Coilin也极有可能在DNA损伤等应激反应通路中具有某些作用。

4 CB在RNP组装中的功能

4.1 snRNP的生物发生

Coilin的发现使CB能通过免疫染色的方法进行观察。很快科学家们就发现, CB含有核内小分子RNA (small nuclear RNA, snRNA), snRNA是含有100~300碱基的RNA, 由RNA聚合酶II或III催化合成, 像mRNA一样可被加帽, 参与真核生物细胞核RNA的加工。在天然状态下, snRNA和许多蛋白质结合成为核内小分子核糖核蛋白(small nuclear ribonucleoprotein, snRNP), 参与mRNA前体(pre-mRNA)的剪接, 生成成熟的mRNA。snRNP的加工成熟过程非常复杂, 期间多次穿越CB。snRNA与CB的结合在转录阶段就已经发生, CB和U2基因座的联系依赖于该基因位点的转录活性, 并受到pre-U2 RNA的调节, 而且U2基因3'端半缺失可以完全破坏这种联系。新转录的snRNA可能会进入CB, 并适量装载输出因子PHAX和CRM1, 然后将snRNA输送到细胞浆。在细胞浆中, snRNA发生3'端修饰和5'帽结构超甲基化, 获得Sm环, 以上修饰对snRNA再重新进入细胞核是不可或缺的。这些新输入的不成熟snRNP将再次进入CB, 并在此结合snRNP特异性蛋白质, 通过scaRNP(small Cajal body-associated RNP)完成snRNA修饰, 指导特定核苷酸甲基化和假尿苷化, 最终加工成熟^[9-10]。

U6 snRNA的加工过程则多有不同, 是由RNA聚合酶III转录生成, 并不输出到细胞浆中。U6 snRNA基因座附近不存在CB的聚集, 这可能是因为U6基因不发生串联重复, 不能形成CB。另一方面, 其他单拷贝snRNA基因, 如U4、U11、U12也与CB相关, 提示RNA聚合酶和产物序列的差别这两方面因素都很重要。U6 snRNP借助SART3蛋白进入CB, 并组装成有功能的U4/U6。U5 tri-snRNP为有效的剪接反应所必需^[11]。首先, U6通过SART3与U4连接, 形成U4/U6 di-snRNP中间物, 随后U5通过Prp31集

合因子与之相连, 最终形成tri-snRNP, 为剪接做好准备^[12]。在剪接过程中, snRNP发生戏剧性重组, 导致U4、U5和U6 snRNP的分离, 它们将重新进入CB, 并再次聚集形成tri-snRNP, 以完成下一剪接过程。U2 snRNP的加工成熟也同样可以在CB中完成而被观察到。因此, CB是snRNP装配和再循环利用的场所^[13]。

4.2 snoRNP和scaRNP的生物发生

CB中含量比较丰富的其他RNP为核仁小核糖核蛋白体颗粒(small nucleolar ribonucleoproteins particle, snoRNP)和scaRNP, 两者的结构和功能比较接近。snoRNA可以含有C/D盒或者H/ACA盒序列元件, 这两者决定着snoRNP的蛋白组成及其所执行的功能。C/D盒snoRNP指导靶向RNA的甲基化, H/ACA盒snoRNP指导rRNA和U6 snRNA特定核苷酸的假尿苷化。scaRNA(small Cajal body-associated RNA)能单独或同时含有上述两个盒的序列元件。scaRNA在CB中聚集, 并在最后的成熟过程中修饰剪接体的snRNA, 这一修饰过程也在CB内完成。scaRNA含有一保守的CAB盒序列, 可作为其在CB的定位信号, 帮助scaRNA在CB的适当定位^[14]。另外, 此序列可以被端粒酶卡哈尔体蛋白(WRAP53/WDR79/TCAB1)特异识别, 而此蛋白又是scaRNA在CB中堆积所必需的^[15-16]。

snoRNA和scaRNA都可以从独立的pol II启动子区启动转录。与snRNA相似, 内含子中那些携带和含有snoRNA转录序列的基因与细胞核中的CB联系紧密。研究发现, snoRNA、scaRNA以及它们相关的蛋白质在CB中存在共定位, 因此CB可能在这种类型RNP的成熟过程中发挥作用。从独立启动子区转录的snoRNA, m7G帽被CBC和PHAX蛋白绑定, 并被转运到CB, 在CB中经历几个成熟过程, 包括特定蛋白的装载、3'末端修饰以及Tgs1调节的5'帽超甲基化。然后CRM1取代Tgs1, 并释放成熟的snoRNP以转运到核仁^[17-18]。除此之外, 内含子来源的C/D和H/ACA盒snoRNA被发现与Tgs1相关, 并在CB中被检测到, 提示没有帽结构的snoRNA可能也在CB中经历成熟阶段。然而, 由于它们缺乏5' m7G帽结构, 其在CB中转运的方式仍不清楚。scaRNA可能也在CB中成熟, 它们在CB中的定位由WDR79/WRAP53/TCAB1蛋白调节。

4.3 端粒酶的成熟和端粒的维持

端粒酶是RNP并具有维持端粒长度的功能, 在

衰老过程中发挥作用, 具有多种作用潜能。成熟的端粒酶RNP包括端粒酶RNA(telomerase RNA, TR)、端粒酶反转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)和其他相关蛋白质。尽管在干细胞研究中最受到关注, 但在人类肿瘤细胞中, TR被发现可定位于CB。TR的mRNA由Pol II转录, 具有m⁷G帽结构并被PHAX蛋白绑定, 因此, 与snoRNA类似, TR也被运输到CB。此外, 脊椎动物端粒酶RNA 3'末端含有一个保守的snoRNA样H/ACA结构域, 这提示TR的成熟与snoRNA一样, 也发生在CB中^[19]。由于成熟端粒酶RNP的RNA含有TMG帽结构, 因此推测此修饰由Tgs1甲基转移酶完成。事实上, 对非洲爪蟾卵的研究发现, 荧光标记的TR首先在CB中堆积, 然后进入核仁, 提示TR在这些区域完成成熟过程^[20]。而且, 由于CAB盒和WDR79/WRAP53蛋白的出现, 在整个细胞周期中, 成熟的TR都定位于CB^[21]。因此, 脊椎动物TR实际上是一种scaRNA, 但由于它的靶序列与任何已知的RNA都不发生互补, 因而并不具有指导RNA修饰的功能。有趣的是, TR在CB的定位在细胞周期的S期表现最明显, 届时TERT也在S期被招募回CB。邻近CB不同区域的所有分子相互作用, 形成有功能的端粒酶, 然后再重新分布于端粒上, 完成端粒的延长^[22-23]。

CB对端粒酶RNP的组装具有决定性作用还是仅仅起催化剂的作用, 仍不明确。然而, TR如果不能定位于CB, 则不能回到端粒, 导致人体细胞端粒延长受损。根据最新的报道, 这可能为人类端粒酶RNA所独有, 而鼠的TR似乎并不需要CB来完成端粒的延长^[24-25]。

可以预期, 进一步的研究将逐渐解析CB及其组成分子之间的相互作用, 并且发现并明确其在多种遗传或环境因素作用下的改变。这些结果, 将会使人们对CB的生物学功能及其发挥作用的分子基础有更为深入和全面的了解。

4.4 CB与HLB的关系

2006年, Liu和他的同事^[26]研究果蝇的CB时发现在一个细胞核内存在两个独立的核体, 由于当时还没有标记果蝇的Coilin, 因此他们用U7 snRNP和U85 scaRNA标记。已知, U7 snRNP是检测CB的良好标志物; U85 scaRNA可用于标记果蝇S2细胞的CB。有趣的是, 在果蝇的各种组织中U7 snRNP和U85 scaRNA均被检测到存在于核内两个独立的细

胞器。基于以往的研究, 含有U85 scaRNA的细胞器被认为是CB, 而含有U7 snRNP的细胞器总是和位于2号染色体的组蛋白基因相关, 因此称它为组蛋白基因座体(histone locus body, HLB)。果蝇细胞核中, CB和HLB存在共定位, 提示两者存在未知的功能联系。很快, Bongiorno-Borbone等^[27]和Darzacq等^[28]研究发现, CB和HLB在哺乳动物细胞中是两个不同的细胞器。

HLB与CB存在共同的分子组成成分, 那么两者的关系如何呢? HLB中含有组蛋白基因表达的必需分子, 如U7 snRNP, 而Coilin是CB的主要成分, 在两栖类动物胚泡中, CB内含有U7 snRNP。因此, 目前认为HLB和CB内的分子存在融合和共定位。体外细胞培养发现, 这种共定位的发生受细胞周期调节, 在组蛋白基因转录发生的S期, 共定位现象明显。Coilin缺失并不影响HLB, 而如果HLB中的分子NPAT或FLASH(Casp8AP2)等缺失, 则Coilin定位会出现改变。HLB和CB的共定位有何生理意义目前仍不得而知^[29]。

4.5 CB的形成及动力学研究

细胞核染色图像中, CB看似是核浆中静止的结构。而活细胞动态成像观察则发现CB处于动态变化状态, 甚至能够以1 $\mu\text{m}/\text{min}$ 的速率穿越整个细胞核。CB的大小和数量也是可变的, 可随细胞周期而改变。在细胞分裂的M期, CB完全分解, 有丝分裂完成后, 在G₁期的早期又重新出现, 表现为许多小的聚点^[30]。同时, 在细胞分化过程中也可以形成CB, 而在应激状态下CB可以消失。转录抑制剂或DNA损伤试剂处理细胞, 引起转录抑制后, CB消失, 说明CB的形成依赖于持续进行的转录状态^[31], 抑制细胞内转录, 使CB内循环的snRNP减少, 剪接水平下降, 通过CB的snRNP减少, 导致CB解聚。研究提示, 体内RNA在转录活性位点具有促进CB成核作用, 由于许多RNA及多种类型的RNA都能作为CB合成的起源, 因此推测, CB核体的形成可以由许多特定RNA合成的蛋白质来调节, 而不是仅由单一的RNA结合蛋白调节。

在整个细胞周期及细胞形成和分化过程中观察CB的动力学, 提示CB的组装和维持受严格调控。Coilin在维持CB完整性中发挥关键性作用, 而CB中多种分子的相互作用对维持CB的完整性也至关重要, 比如SMN、Tgs1、WRAP53和USPL1 SUMO异

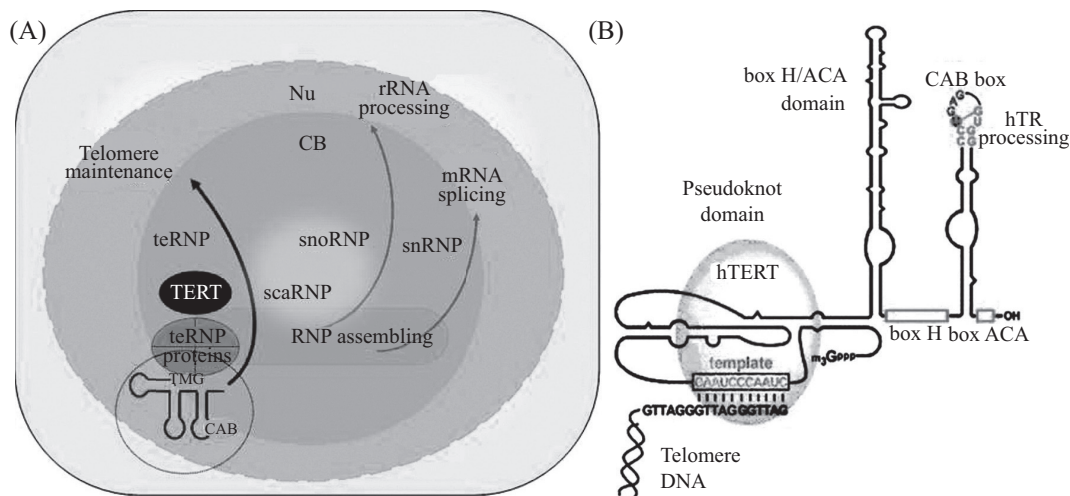
肽酶敲除均会引起Coilin定位异常^[32-33]。Coilin可以通过甲基化和磷酸化方式进行转录后修饰。Coilin精氨酸残基可以发生对称性二甲基化,这是与SMN蛋白相互作用的前提。在Coilin甲基化水平低的细胞中,SMN并不定位于CB,而是出现在独立的亚CB区,称为gems。gems在特定细胞系和胎儿组织中是独立的核体,但在成人组织中则与CB成为一个整体,这提示Coilin在体内完全甲基化,至少在细胞分裂间期是这样的,但仍需实验进一步验证^[34]。在整个细胞周期中,Coilin的磷酸化水平变化活跃,M期磷酸化程度最高,与此期CB的解聚有关。与分化细胞相比,原代细胞中丝氨酸/苏氨酸磷酸酶PPM1G低表达而Coilin呈现高度磷酸化,CB数量少^[35]。同时,Coilin的磷酸化状态也会影响其与CB内其他分子的相互作用。综上所述,Coilin通过精氨酸的二甲基化和磷酸化修饰或许是细胞调节CB形成及其结构维持的重要机制。

5 CB与疾病的联系

脊髓性肌肉萎缩症(spinal muscular atrophy, SMA)是一种常染色体隐性遗传病,由运动神经元生存基因1(SMN1)的纯合性缺失或突变引起,导致全长SMN蛋白的显著下降。典型临床表现是四肢和躯干随意肌的进行性萎缩,根据残留SMN蛋白水平不同,肌肉萎缩的程度不一^[36]。免疫荧光证实,细胞浆和细胞核内均存在SMN蛋白。细胞浆内的SMN和

许多蛋白发生稳定的相互作用(如Gemins 2-8),形成SMN复合体,其对snRNP的生物合成至关重要。细胞核内的SMN复合体主要集中在两类核体结构中,即CB和“gems”,值得注意的是,运动神经元中gems即CB^[37]。研究发现,*coilin*^{-/-}小鼠不出现SMA典型的表型特征。观察I型SMA胎儿的脊髓发现,SMN水平降低与含有SMN的gems的缺失相关,而运动神经元gems缺失与核内coilin的大量凝集有关,提示运动神经元CB结构异常是导致I型SMA发生的病理基础,CB依赖性的snRNP生物发生异常以及由此引发的运动神经元pre-mRNA剪接异常,是SMA的主要发病机理。

在肿瘤细胞中,TR存在于CB,并且依赖于TERT的活性。TERT缺失的情况下,TR不发生在CB的沉积于,而正常细胞中TERT的表达,能够诱导TR定位于CB。研究发现,端粒酶的组装可能被SMN复合体调节,SMN可以和功能性端粒酶如TERT相互作用。提示CB与端粒酶的生物发生存在密切联系。突变分析显示,TR的CAB盒对其在CB的定位至关重要,TERT缺失的情况下,TR不能沉积于CB,提示CAB盒发挥功能依赖于TERT蛋白^[19]。CAB盒突变减少TR与CB及端粒的作用,导致端粒变短。正常情况下,未分化细胞的端粒会随细胞周期的进行而缩短,这造成了基因组的不稳定性增加。端粒进行性缩短是细胞老化的主要表现,因为伴有端粒缩短的衰老细胞最终会凋亡,从而在生理情况下避免突变



A: 卡哈尔体的主要功能; B: 图A中卡哈尔体参与端粒长度维持的详细图解(根据参考文献[38]修改)。

A: major functions of Cajal bodies; B: detailed illustration of the shaded circular region in Fig.2A (adapted from reference [38]).

图2 卡哈尔体在细胞核内参与mRNA剪接、RNP组装以及端粒长度的维持

Fig.2 Cajal body is involved in mRNA splicing, RNP assembling and telomere maintenance inside the nucleus

的累积和染色体畸变。肿瘤细胞中端粒调节破坏, 端粒酶活性增强, 致使端粒不发生生理性缩短, 导致肿瘤细胞的永生化。

随着新一代外显子测序工作的广泛展开, 特别是其在各种疾病模型中的研究进展, 将使人们对RNA剪接过程与疾病的联系这一领域的发现和认识获得前所未有的拓展。而CB与各种疾病的病因或表现之间的联系将会在逐渐受到重视的同时, 出现更多明确的案例, 甚至有望成为新型药物或干预手段的设计或作用靶点。

6 结语

虽然许多研究显示, snRNP和snoRNP的产生过程大多发生在CB, 但这并非意味着CB对于任何RNP分子的生物发生都是必需的。最新的实验结果显示, Coilin为小鼠和斑马鱼胚胎发育所必需; Coilin的沉默引起斑马鱼胚胎的死亡; Coilin缺失细胞中的CB完全消失, 造成snRNP的生物发生障碍以及RNA的剪接受损。这些发现有力支持了RNP主要在CB完成组装的观点。一个非常重要的发现是, 端粒长度的维持极大程度上也依赖于CB的作用(图2)。snRNA、snoRNA以及scaRNA等存在于CB中的小RNA如果不经正常的加工、修饰、组装并组成相应的RNP, 则不能发挥相应的生物学功能。由于CB的形成和维持同样依赖于其各种小RNA组分, 而这些小RNA通常也是在CB中完成成熟并且与RNP成分的完成拼装, 因此CB的形成及其所发挥的功能可以被推断是细胞确保转录后功能性RNP表达的重要机制。然而, CB究竟如何整合多种RNP的生物发生过程以及CB之间是否存在互动调节机制仍是需要进一步探讨的前沿课题。

随着近年来关于卡哈尔体研究的迅速进展和一些重要的突破, CB作为一种作用和表现丰富的细胞核内结构, 其正常的细胞生物学功能以及在病理状态下的结构和数量改变, 日益受到广泛的重视并且引起越来越多研究者的兴趣。CB在高等真核生物的细胞核内普遍存在, 具有明确的形态和特征性的标志分子; CB参与和介导包括mRNA剪接、多种RNA及其结合蛋白的成熟和定位过程, 与细胞周期、细胞增殖、应激和老化等一系列重要的细胞生物学过程存在密切的联系。CB的分子构成所表现出的复杂性, 及其在细胞核质中所具有的动态变化特征,

提示了其存在和功能发挥与细胞核内重要生物学过程存在互动关系。综上所述, 卡哈尔体具备了与其他人们熟知的细胞浆内的细胞器十分相似的特征和表现, 因此, 有学者提出CB可以被认定为一种细胞核内的典型细胞器。这一观点不仅为人们深入认识和探讨细胞核内的复杂动态的生物学过程开辟了新的视角, 也使得包括CB在内的一系列新型核内细胞器在今后被陆续发现和报道变得非常令人期待。随着组学技术(特别是蛋白质组学技术)的发展, 以及超分辨率细胞显微成像技术的进步和推广应用, 未来关于卡哈尔体的功能性研究有望取得迅速的进展和突破。此外, 关于Coilin及其相互作用蛋白的结构生物学分析无疑会起到重要的推动作用。

参考文献 (References)

- 1 Tuma RS, Stolk JA, Roth MB. Identification and characterization of a sphere organelle protein. *J Cell Biol* 1993; 122(4): 767-73.
- 2 Strzelecka M, Oates AC, Neugebauer KM. Dynamic control of Cajal body number during zebrafish embryogenesis. *Nucleus* 2010; 1(1): 96-108.
- 3 Cioce M, Lamond AI. Cajal bodies: A long history of discovery. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; 21: 105-31.
- 4 Velma V, Broome HJ, Hebert MD. Regulated specific proteolysis of the Cajal body marker protein coilin. *Chromosoma* 2012; 121(6): 629-42.
- 5 Pena E, Berciano MT, Fernandez R, Ojeda JL, Lafarga M. Neuronal body size correlates with the number of nucleoli and Cajal bodies, and with the organization of the splicing machinery in rat trigeminal ganglion neurons. *J Comp Neurol* 2001; 430(2): 250-63.
- 6 Carrero ZI, Velma V, Douglas HE, Hebert MD. Coilin phosphomutants disrupt Cajal body formation, reduce cell proliferation and produce a distinct coilin degradation product. *PLoS One* 2011; 6(10): p. e25743.
- 7 Hebert MD, Szymczyk PW, Shpargel KB, Matera AG. Coilin forms the bridge between Cajal bodies and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Genes Dev* 2001; 15(20): 2720-9.
- 8 Xu H, Pillai RS, Azzouz TN, Shpargel KB, Kambach C, Hebert MD, *et al.* The C-terminal domain of coilin interacts with Sm proteins and U snRNPs. *Chromosoma* 2005; 114(3): 155-66.
- 9 Morris GE. The Cajal body. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783(11): 2108-15.
- 10 Nesic, D, Tanackovic G, and Kramer A. A role for Cajal bodies in the final steps of U2 snRNP biogenesis. *J Cell Sci* 2004; 117(pt 19): 4423-33.
- 11 Staněk D, Rader SD, Klingauf M, Neugebauer KM. Targeting of U4/U6 small nuclear RNP assembly factor SART3/p110 to Cajal bodies. *J Cell Biol* 2003; 160(4): 505-16.
- 12 Schaffert N, Hossbach M, Heintzmann R, Achsel T, Lührmann R. RNAi knockdown of hPrp31 leads to an accumulation of U4/U6 di-snRNPs in Cajal bodies. *EMBO J* 2004; 23(15): 3000-9.
- 13 Stanek D, Pridalová-Hnilicová J, Novotný I, Huranová M, Blazík-

- ová M, Wen X, *et al.* Spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particles repeatedly cycle through Cajal bodies. *Mol Biol Cell* 2008; 19(6): 2534-43.
- 14 Richard P, Darzacq X, Bertrand E, Jdy BE, Verheggen C, Kiss T. A common sequence motif determines the Cajal body-specific localization of box H/ACA scaRNAs. *EMBO J* 2003; 22(16): 4283-93.
- 15 Mahmoudi S, Henriksson S, Weibrecht I, Smith S, Soderberg O, Stromblad S, *et al.* WRAP53 is essential for Cajal body formation and for targeting the survival of motor neuron complex to Cajal bodies. *PLoS Biol* 2010; 8(11): p.e1000521.
- 16 Tycowski KT, Shu MD, Kukoyi A, Steitz JA. A conserved WD40 protein binds the Cajal body localization signal of scaRNP particles. *Mol Cell* 2009; 34(1): 47-57.
- 17 Boulon S, Verheggen C, Jady BE, Girard C, Pescia C, Paul C, *et al.* PHAX and CRM1 are required sequentially to transport U3 snoRNA to nucleoli. *Mol Cell* 2004; 16(5): 777-87.
- 18 Pradet-Balade B, Girard C, Boulon S, Paul C, Azzag K, Bordonne R, *et al.* CRM1 controls the composition of nucleoplasmic pre-snoRNA complexes to licence them for nucleolar transport. *EMBO J* 2011; 30(11): 2205-18.
- 19 Theimer CA, Jdy BE, Chim N, Richard P, Breece KE, Kiss T, *et al.* Structural and functional characterization of human telomerase RNA processing and cajal body localization signals. *Mol Cell* 2007; 27(6): 869-81.
- 20 Lukowiak AA, Narayanan A, Li ZH, Terns RM, Terns MP. The snoRNA domain of vertebrate telomerase RNA functions to localize the RNA within the nucleus. *RNA* 2001; 7(12): 1833-44.
- 21 Venteicher AS, Abreu EB, Meng Z, McCann KE, Terns RM, Veenstra TD, *et al.* A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. *Science* 2009; 323(5914): 644-8.
- 22 Jdy 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): 944-54.
- 23 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): 2797-809.
- 24 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): 955-65.
- 25 Batista LF, Pech MF, Zhong FL, Nguyen HN, Xie KT, Zaug AJ, *et al.* Telomere shortening and loss of self-renewal in dyskeratosis congenita induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; 474(7351): 399-402.
- 26 Liu JL, Murphy C, Buszczak M, Clatterbuck S, Goodman R, Gall JG. The *Drosophila melanogaster* Cajal body. *J Cell Biol* 2006; 172(6): 875-84.
- 27 Bongiorno-Borbone L, de Cola A, Vernole P, Finos L, Barcaroli D, Knight RA, *et al.* FLASH and NPAT positive but not Coilin positive Cajal Bodies correlate with cell ploidy. *Cell Cycle* 2008; 7(15): 2357-67.
- 28 Darzacq X, Jdy BE, Verheggen C, Kiss AM, Bertrand E, Kiss T. Cajal body-specific small nuclear RNAs: A novel class of 2'-O-methylation and pseudouridylation guide RNAs. *EMBO J* 2002; 21(11): 2746-56.
- 29 Ye X, Wei Y, Nalepa G, Harper JW. The cyclin E/Cdk2 substrate p220(NPAT) is required for S-phase entry, histone gene expression, and Cajal body maintenance in human somatic cells. *Mol Cell Biol* 2003; 23(23): 8586-600.
- 30 Platani M, Goldberg I, Lamond AI, Swedlow JR. Cajal body dynamics and association with chromatin are ATP-dependent. *Nat Cell Biol* 2002; 4(7): 502-8.
- 31 Baltanas FC, Casafont I, Weruaga E, Alonso JR, Berciano MT, Lafarga M. Nucleolar disruption and Cajal body disassembly are nuclear hallmarks of DNA damage-induced neurodegeneration in purkinje cells. *Brain Pathol* 2011; 21(4): 374-88.
- 32 Matera AG, Izaguirre-Sierra M, Praveen K, Rajendra TK. Nuclear bodies: Random aggregates of sticky proteins or crucibles of macromolecular assembly? *Dev Cell* 2009; 17(5): 639-47.
- 33 Girard C, Neel H, Bertrand E, Bordonne R. Depletion of SMN by RNA interference in HeLa cells induces defects in Cajal body formation. *Nucleic Acids Res* 2006; 34(10): 2925-32.
- 34 Young PJ, Le TT, Duncley M, Nguyen TM, Burghes AH, Morris GE. Nuclear gems and Cajal (coiled) bodies in fetal tissues: Nucleolar distribution of the spinal muscular atrophy protein, SMN. *Exp Cell Res* 2001; 265(2): 252-61.
- 35 Hearst SM, Gilder AS, Negi SS, Davis MD, George EM, Whitton AA. Cajal-body formation correlates with differential coilin phosphorylation in primary and transformed cell lines. *J Cell Sci* 2009; 122(Pt 11): 1872-81.
- 36 Kolb SJ, Kissel JT. Spinal muscular atrophy: A timely review. *Arch Neurol* 2011; 68(8): 979-84.
- 37 Matera AG, Shpargel KB. Pumping RNA: Nuclear bodybuilding along the RNP pipeline. *Curr Opin Cell Biol* 2006; 18(3): 317-24.
- 38 Beata EJ, Edouard B, Tamas K. Human telomerase RNA and box H/ACA scaRNAs share a common Cajal body-specific localization signal. *J Cell Biol* 2004; 5(164): 647-52.