

端粒保护蛋白

李卫国* 王坤英

(河南师范大学生命科学院, 新乡 453007)

摘要 端粒保护蛋白(Protection of telomere 1, POT1)是存在于人和裂殖酵母的端粒相关蛋白, 特异性地与端粒单链 DNA 相结合。人 *POT1* 基因位于 7 号染色体上, 由 22 个外显子组成, 其中 4 个外显子属于跳跃外显子, 可形成 5 个剪接变异体。POT1 的功能在于维持端粒的稳定, 通过 TRF1-TIN2-PIP1-POT1 通路调节端粒长度。

关键词 端粒保护蛋白; 端粒; 端粒酶

端粒是位于真核细胞线性染色体末端的 DNA-蛋白质复合体。人与哺乳动物细胞的端粒 DNA 主要由重复数百到数千次的简单序列 5'-TTAGGG/AATCCC-3' 组成, 其中大部分是双链 DNA, 但在每个端粒末端还具有一段短的富含 G 的单链 3' 悬突, 该悬突可作为端粒酶的底物; 端粒 DNA 的单链部分伸入到双链序列中形成 T 环(telomere loop)结构, 同时在其伸入处置换出一段与自身序列相同的单链后, 与互补链配对形成 D 环(displacement loop)结构^[1]。而端粒结合蛋白之间通过相互作用形成复杂的端体(telosome)^[2]与端粒 DNA 结合, 维持端粒的完整性、防止染色体的末端降解和末端-末端融合以及调节端粒的长度。

目前已有多种哺乳动物细胞端粒结合蛋白得到确认, 它们分别与端粒的双链或单链 DNA 直接或间接地结合。端粒重复序列结合因子(telomeric repeat binding factor-1/2, TRF1 and TRF2)直接与端粒双链 DNA 特异性地结合, 端粒保护蛋白(Protection of telomere 1, POT1)则直接与端粒单链 DNA 特异性地结合。此外, 一些哺乳动物细胞端粒相关蛋白 TIN2 (TRF1-interacting nuclear protein 2)、hRap1 (human repression and activation protein 1)和 PTOP (POT1 and TIN2 organizing protein), 与 DNA 修复、染色体稳定相关的端锚聚合酶(tankyrase, TANK-1/2), 以及参与 DNA 损伤修复的 Ku 蛋白和 RMN (RAD50、MRE11 和 NBS1)复合体等, 则通过 TRF1 和 TRF2 间接地定位于端粒上, 它们对于端粒结构的维持与稳定同样具有重要的作用^[3,4]。本文主要对近年来端粒保护蛋白的研究进展予以介绍。

1 POT1 的发现

与单链端粒 DNA 特异性结合的端粒结合蛋白首先在原生动物纤毛纲的尖毛虫(*Oxytricha nova*)和游仆虫(*Euplotes crassus*)中得到分离和纯化, 称之为端粒末端结合蛋白(telomere end-binding protein, TEBP)。尖毛虫的 TEBP 由 56 kDa 的 α 亚单位和 41 kDa 的 β 亚单位组成, 并与端粒末端的单链 DNA 悬突特异性地结合形成三元复合体^[5,6], 晶体结构分析表明该复合体含有 4 个寡核苷酸/寡糖结合(oligonucleotide/oligosaccharide-binding, OB)折叠, 其中 3 个 OB 折叠与端粒 DNA 结合具有识别功能, 1 个 OB 折叠与蛋白质间的相互作用有关^[7-9]; 而游仆虫的 TEBP 只有 α 亚单位没有 β 亚单位^[10]。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的 TEBP 为 Cdc13p^[11], 裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)的 TEBP 与尖毛虫和游仆虫 TEBP 的 α 亚单位之间具有部分相似性。进一步比较后发现, 裂殖酵母的 TEBP 靠近 N 端的大约 120 个氨基酸呈现出明显的保守性, 裂殖酵母与尖毛虫之间存在有 19% 的相同和 40% 的相似, 尖毛虫与游仆虫之间则有 42% 的相同和 61% 的相似, 鉴于在上述纤毛虫中发现的 TEBP 对巨核染色体末端起着保护帽的作用, 故将裂殖酵母中的 TEBP 特称为端粒保护蛋白(Protection of telomere 1, POT1), 编码该蛋白质的基因称为 *POT1* 基因^[12]。对酵母及一些真核细胞的 TEBP 结构进行的分析提示, TEBP

收稿日期: 2005-01-11 接受日期: 2005-04-20

河南省动物学重点学科、生物化学和分子生物学校级重点学科经费资助

* 通讯作者。Tel: 0373-3326340, E-mail: liwg0618@henannu.edu.cn

存在有多个 OB 折叠域,但在 POT1 和 Cdc13 却只发现了 1 个 OB 折叠^[13],这种差别有待进一步地研究。

2 POT1 的特性与基因结构

借助于裂殖酵母的 POT1 序列进一步发现了人的端粒保护蛋白(hPOT1),其分子量为 71 kDa、由 109 个氨基酸组成。hPOT1 只与端粒 DNA 富 G 链结合,不与端粒富 C 链或端粒双链 DNA 结合。将 hPOT1 与酵母和纤毛虫的 TEBP 序列对比分析后发现该蛋白质近 N 端部分具有较高的保守性,人与裂殖酵母之间存在 26% 的相同和 48% 的相似,而人与尖毛虫之间则有 23% 的相同和 39% 的相似^[12]。对 hPOT1 的 N 端晶体结构(分辨率 1.73Å)分析表明,该蛋白质与端粒单链 DNA 结合的最小序列为 10 个核苷酸 TTAGGGTTAG 序列,其末端含有 2 个 OB 折叠,其中 N 端的 OB 折叠结合前 6 个核苷酸,另 1 个 OB 折叠则具有结合与保护单链 DNA 3' 末端的作用^[14]。

对人和小鼠的 POT1 基因结构研究表明,人 POT1 基因位于 7 号染色体上,含有 22 个外显子,其中 5 个外显子组成了 5' 端非翻译区,起始密码子位于第 6 个外显子中;而小鼠 POT1 基因则位于 6 号染色体上,含有 18 个外显子,长约 70 kb,5' 端非翻译区由 3 个外显子组成。对人和小鼠的 POT1 基因比较后发现,前者除在起始密码子前多出两个外显子外,还分别在第 12~13 和 15~16 外显子之间各多出 1 个外显子。此外,在人 POT1 基因的 22 个外显子中,有 4 个外显子在某些转录子中属于跳跃外显子,可以产生 5 个大小分别为 71、38、58、5 和 52 kDa 的剪接变异体,它们可结合在端粒单链 DNA 末端的任何部位,但与端粒 DNA 的 3' 端结合能力差别极大。5 个剪接变异体中有 4 个是广泛表达的,只有第 5 个剪接变异体仅在白细胞中特异性的表达,具有组织特异性^[15]。

3 POT1 的功能

3.1 POT1 参与端粒的维持与稳定

将裂殖酵母 *pot1⁺/pot1⁻* 的杂合二倍体细胞株分离后培养,实验结果显示 *pot1⁻* 孢子形成的克隆较 *pot1⁺* 孢子形成的克隆要小的多。若将 *pot1⁻* 孢子的克隆表型与端粒酶催化亚单位缺陷型(*trt1⁻*)孢子的克隆表型进一步比较,则两者在生长发育方面呈现出明显的不同,后者(*trt1⁻*)孢子形成的克隆大小正常,只有端粒显著缩短时(约传代 75 次)才表现出生长缺

陷;而前者(*pot1⁻*)的孢子培养 10 代时,其克隆中即可出现大量的长条形细胞,这些长条形细胞中的大多数细胞不能进一步的分裂,原因是存在有较高的染色体错配率,甚至出现了姊妹细胞中的一个细胞内没有任何染色体 DNA 的现象^[12]。在人细胞中,若抑制 POT1 的表达,除了会引起端粒关联和分裂后期端粒桥的增加,以及间期细胞之间出现染色质桥等端粒不稳定现象之外,还会引起细胞凋亡或细胞衰老^[16]。这些现象说明 POT1 对染色体的维持与稳定是极为重要的。

此外,去除 *pot1⁺* 还会对细胞的生存产生明显的影响。对 *pot1⁻* 细胞株分析发现,其基因组 DNA 中几乎检测不出端粒序列和端粒相关序列,这表明 POT1 在防止染色体末端快速降解方面起着至关重要的作用。然而,这些 *pot1⁻* 细胞株中的部分菌株仍能够进一步地分裂并继续生存,究其原因是在这些丢失了端粒片段的 *pot1⁻* 细胞株中出现了染色体环化现象。

综合上述事实可以认为 POT1 的缺失将会立即导致染色体的不稳定,这与端粒酶功能缺失引起的后果是不同的,端粒酶功能缺失只会引起连续传代细胞的端粒渐进地缩短,而不会即刻对染色体稳定和细胞生存产生明显的影响^[12]。

3.2 POT1 对端粒长度的调节

已知人和哺乳动物细胞可以根据每个染色体端粒所结合的 TRF1 复合体数量来监测它的长度^[17,18],而端粒长度的维持又需要端粒酶的介导,可是 TRF1 并不直接影响端粒酶的活性;那么,位于端粒双链 DNA 上的 TRF1 复合体是通过何种方式影响结合于端粒单链 DNA 上的端粒酶活性呢?与端粒单链 DNA 特异性结合的 POT1 在调节端粒长度方面又起着什么作用呢?染色质免疫沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)分析表明 POT1 与其他的端粒相关蛋白之间存在相互作用,TRF1 复合体通过与 POT1 的相互作用,影响 POT1 控制端粒酶介导的端粒延伸^[19]。当端粒长度增加时,结合到端粒上的 TRF1 和 POT1 数量也相应增加;反之亦然,端粒长度缩短时,单链 DNA 的长度也将相应缩短,此时单链 DNA 上结合的 POT1 数量也就相应地减少^[18]。TRF1 复合体对 POT1 与单链端粒 DNA 结合的调节,不仅可以使 POT1 向端粒募集,而且可以增强 POT1 在单链端粒 DNA 上的积累。实验表明缺少 DNA 结合域的 POT1 突变体能够消除 TRF1 介导

的端粒长度调节, 诱导迅速而广泛的端粒延伸^[19]。

进一步的实验表明 TRF1 与 POT1 之间的相互作用, 还需要其他的端粒蛋白(如 TIN2、PTOP)介导。TIN2 是 Kim 等^[20]以 TRF1 为诱饵发现的一种端粒相关蛋白, 两者之间存在相互作用。缺失 N 端序列的 TIN2 突变体影响端粒延伸的事实说明 TIN2 在 TRF1 对端粒长度的控制中是一个非常重要的中介因子, 两者均为端粒长度的负调节因子^[20-23]。PTOP (也称 PIP1: POT1 interacting protein 1 或 TINT1: TIN2 interacting protein 1) 是最近从端粒 TRF1 蛋白复合体中发现的又一个新成员^[24-26], 它能与 TIN2 和 POT1 发生相互作用, 在 TIN2 和 POT1 之间起着桥梁的作用, 其主要功能是将 POT1 募集到端粒染色质上; 共免疫沉淀(coimmunoprecipitation)实验进一步表明 PTOPTOP 不能直接与 TRF1 相互作用, 由于 TIN2 与 TRF1 之间存在相互作用, 提示 TIN2 在 PTOPTOP 和 TRF1 之间起中介作用。利用 RNAi 技术的实验结果表明 PTOPTOP 和 POT1 也是端粒长度的负调节因子, 去掉 POT1 的 N 端 OB 折叠后将使 POT1 对端粒长度的控制作用消失, 而 PTOPTOP 的下调将导致端粒酶依赖性的端粒延伸^[25]。因此, 可以认为端粒双链 DNA 上的 TRF1 通过与端粒 DNA 结合因子 TRF1-TIN2-PTOPTOP-POT1 组成的通路相互作用将 POT1 募集到端粒上, 控制 POT1 在单链端粒 DNA 上的装配, 即端粒长度信息被端粒双链 DNA 上的 TRF1 复合体监测后, 通过与端粒单链 DNA 上 POT1 的相互作用, 将有关端粒长度的信息传递给端粒末端, 再由 POT1 调节端粒酶与端粒单链 DNA 的结合, 以控制端粒长度的延伸。对于 POT1 在端粒酶介导的端粒延伸作用中的机制, 推测可能与端粒的结构状态有关, 即当端粒结构处于“开”构象时 POT1 与端粒的 3' 单链 DNA 悬突结合起到稳定端粒的作用。

前文述及, POT1 是端粒长度的负调节因子^[25], 但在 HT1080 细胞上的实验结果却与此相悖, 提示 POT1 是端粒长度的正调节因子^[27]。Colgin 等^[27]发现将 hPOT1 的 3 个分别为 71、38 和 58 kDa 的剪接变异体在端粒酶阳性的 HT1080 细胞(来源于人纤维肉瘤)中过表达后, 与未转染 hPOT1 的 HT1080 细胞相比, 端粒出现不同程度地延长, 其中 71 kDa 的剪

接变异体最为有效, 三者之间的差别取决于 hPOT1 的结构域, 其中 C 端起着主要的作用; 但是将 hPOT1 的剪接变异体转染到端粒酶阴性的永生细胞株 GM847 后, 端粒长度未见改变, 而且转染 hPOT1 后 HT1080 细胞的端粒酶活性也未增加, 这些结果表明 hPOT1 诱导的端粒延伸效应是端粒酶依赖性的, 由于 hPOT1 不能使端粒酶阴性细胞的端粒延伸, 说明 hPOT1 不具备激活端粒酶活性的作用。然而, 将 hTERT 和 hPOT1 同时在 GM847 细胞中表达时, hPOT1 却能增强 GM847 细胞的 hTERT 诱导端粒延伸效应, 这进一步地说明 POT1 通过端粒酶介导端粒延伸, 是端粒长度的正调节因子。产生这种差异的机制还有待进一步的研究。

总之, 端粒保护蛋白 POT1 对染色体的稳定和端粒长度控制的调节具有重要的作用, 通过 TRF1-TIN2-PTOPTOP-POT1 通路调节端粒酶的募集, 从而实现端粒酶介导的端粒长度调节。

参考文献 (References)

- [1] Griffith JD *et al. Cell*, 1999, **97**: 503
- [2] Liu D *et al. J Biol Chem*, 2004, **279**: 51338
- [3] Kim SH *et al. Oncogen*, 2002, **21**: 503
- [4] Colgin L *et al. Curr Biol*, 2004, **14**: R901
- [5] Gray JT *et al. Cell*, 1991, **67**: 807
- [6] Fang G *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 6056
- [7] Horvath MP *et al. Cell*, 1998, **95**: 963
- [8] Classen S *et al. J Mol Biol*, 2001, **314**: 1113
- [9] Peersen OB *et al. Nat Struct Biol*, 2002, **9**: 182
- [10] Wang W *et al. Nucleic Acids Res*, 1992, **20**: 6621
- [11] Garvik B *et al. Mol Cell Biol*, 1995, **15**: 6128
- [12] Baumann P *et al. Science*, 2001, **292**: 1171
- [13] Theobald DL *et al. Structure (Camb)*, 2004, **12**: 1877
- [14] Lei M *et al. Nat Struct Mol Biol*, 2004, **11**: 1223
- [15] Baumann P *et al. Mol Cell Biol*, 2002, **22**: 8079
- [16] Veldman T *et al. Curr Biol*, 2004, **14**: 2264
- [17] van Steensel B *et al. Nature*, 1997, **385**: 740
- [18] Smogorzewska A *et al. Mol Cell Biol*, 2000, **20**: 1659
- [19] Loayza D *et al. Nature*, 2003, **423**: 1013
- [20] Kim SH *et al. Nat Genet*, 1999, **23**: 405
- [21] Ancelin K *et al. Mol Cell Biol*, 2002, **22**: 3474
- [22] Ye JZ *et al. Nat Genet*, 2004, **36**: 618
- [23] Smogorzewska A *et al. Annu Rev Biochem*, 2004, **73**: 177
- [24] Houghtaling BR *et al. Curr Biol*, 2004, **14**: 1621
- [25] Ye JZ *et al. Genes Dev*, 2004, **18**: 1649
- [26] Liu D *et al. Nat Cell Biol*, 2004, **6**: 673
- [27] Colgin LM *et al. Curr Biol*, 2003, **13**: 942

Protection of Telomere 1

Wei-Guo Li *, Kun-Ying Wang

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xixiang 453007, China)

Abstract Protection of telomere 1 (POT1) is a single-stranded telomeric DNA binding protein identified in fission yeast and human, which binds specifically to the G-rich telomere strand. Human *POT1* gene contains 22 exons, four of which are subject to exon skipping in some transcripts, giving rise to five splice variants. POT1 is proposed not only to participate in telomere maintenance, but also to recruit telomerase to the ends of chromosomes. POT1 plays functions in telomere maintenance and stability, through TRF1-TIN2-PTOP-POT1 pathway on control of telomere length by telomerase.

Key words protection of telomere 1; telomere; telomerase

Received: January 11, 2005 Accepted: April 20, 2005

This work was supported by the Key Subject (Zoology) Foundation of Henan Province and the Key Subject (Biochemistry and Molecular Biology) Foundation of Henan Normal University

*Corresponding author. Tel: 86-373-3326340, E-mail: liwg0618@henannu.edu.cn