

端粒酶基因突变与癌症发生

郭晓强^{①②}, 黄卫人^①, 蔡志明^{①*}

① 深圳大学第一附属医院/深圳市第二人民医院, 国家地方联合医学合成生物学临床应用关键技术工程实验室, 深圳市医学重编程技术重点实验室, 深圳 518035;

② 河北师范大学生命科学学院, 石家庄 050016

* 联系人, E-mail: caizhiming2000@163.com

2015-07-06 收稿, 2015-08-24 接受

国家重点基础研究发展计划(2014CB745201)和河北省自然科学基金(H2014205082)资助

摘要 端粒是染色体末端一段特殊的重复核苷酸结构, 可防止染色体降解或融合. 端粒功能异常可导致衰老和癌症等多种疾病. 端粒酶逆转录酶(TERT)是端粒酶的催化亚基, 可有效保持端粒结构完整性. 在黑色素瘤、神经胶质瘤、膀胱癌和肝癌等多种癌症中鉴定出存在高频 *TERT* 基因启动子区-124 C>T 和-146 C>T 突变, 并且这种突变可导致 *TERT* 的 mRNA、蛋白和酶活性增加, 从而增加端粒长度. *TERT* 基因启动子突变可增加转录因子 GABP 结合而激活基因转录. 这些发现将为癌症诊断和治疗提供新的靶点.

关键词

端粒酶逆转录酶
启动子
突变
癌症发生

端粒(telomere)是染色体末端一种特殊结构, 一方面可减少末端缩短, 另一方面还可避免相邻染色体末端融合, 在细胞增殖和衰老等过程发挥着关键作用.

1 端粒研究简史

早在 20 世纪 30 年代, 美国遗传学家穆勒(Hermann Muller)和麦克林托克(Barbara McClintock)就分别在果蝇和玉米中观察到端粒结构并推测其生物学功能, 但对这种结构的详细特征却知之甚少. 1968 年, 华裔科学家吴瑞(Ray Woo)首先发明短片段 DNA 测序, 而 1977 年英国科学家桑格(Frederick Sanger)进一步提出双脱氧链终止法测序(又称桑格测序), 从而为端粒结构研究打开了一扇大门. 1978 年, 桑格博士生美国分子生物学家布莱克本(Elizabeth Blachburn)首次利用测序检测出四膜虫端粒序列结构, 一种独特的 CCCCTT 六碱基重复. 布莱克本进一步和吴瑞学生绍斯塔克(Jack Szostak)合作, 一方面证明该结构从酵母到高等哺乳动物具有普遍性和保守性(人端粒重复序列为 TTAGGG), 另一方面还证实这种重复序列具有防止染色体末端缩短的作用. 布莱克本又与学

生格雷德(Carol Greider)于 1985 年证实端粒酶的存在, 从而进一步理解了端粒形成机制. 随着端粒研究的深入和重要性体现, 3 位科学家布莱克本、绍斯塔克和格雷德分享 2009 年诺贝尔生理学或医学奖^[1].

2 端粒酶构成和生物学作用

端粒酶是一种负责端粒末端重复序列生成、避免端粒缩短的核糖核蛋白, 由多组分组成, 最关键两组分是作为催化亚基的端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)和作为模板的端粒酶 RNA, TERT 在其他因子辅助下以 RNA 为模板利用逆转录方式合成 DNA 链来延长端粒, 是决定端粒长度的关键因素^[2]. 20 世纪 90 年代, 研究发现端粒酶活性与细胞寿命密切相关. 随着细胞分裂次数的增加, 端粒酶活性出现降低, 从而导致端粒长度持续缩短, 细胞开始衰老并最终死亡; 而干细胞由于可保持相对稳定端粒酶活性, 因此拥有较长寿命. 此外还发现体细胞癌变过程中存在端粒酶重新激活, 从而跨越细胞衰老障碍, 最终细胞出现恶性增殖表型^[3], 但对这种机制一直缺乏详细理解.

引用格式: 郭晓强, 黄卫人, 蔡志明. 端粒酶基因突变与癌症发生. 科学通报, 2015, 60: 2790–2793

Guo X Q, Huang W R, Cai Z M. Telomerase mutations and carcinogenesis (in Chinese). Chin Sci Bull, 2015, 60: 2790–2793, doi: 10.1360/N972015-00762

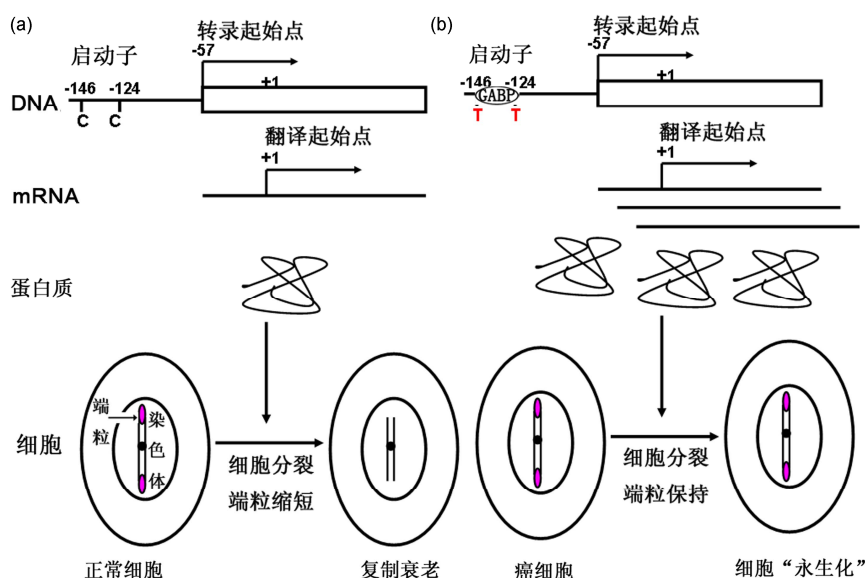


图1 *TERT* 基因启动子突变与癌症发生

Figure 1 *TERT* pmoter mutations and cancer development

3 *TERT*基因启动子突变和癌症发生

基因突变被认为是造成癌症发生的根本原因。20世纪80年代以来,一系列癌基因被成功鉴定,而寻找特定基因突变亦称为癌症遗传学研究重点之一。早期利用全基因组关联分析(GWAS)鉴定出一些突变位点(主要集中于异染色质区),后来借助全基因组测序技术在多个基因编码区发现碱基突变,著名的如异柠檬酸脱氢酶1(isocitrate dehydrogenase 1, IDH1)等。2013年,借助GWAS和全基因组测序两种技术在人黑色素瘤患者癌症组织中发现*TERT*基因调节区(非氨基酸编码)——启动子区(影响基因转录活性的功能元件)存在高达70%以上的碱基突变^[4,5]。这一发现拓展了对基因突变与癌症发生关联的理解和认识(传统研究主要集中于编码区碱基错义突变或无义突变造成的蛋白质结构变异)。更为重要的是这一突变模式随后在多种类型癌症包括神经胶质瘤^[6]、肝癌^[7]、膀胱癌^[8,9]、甲状腺癌^[10]、卵巢透明细胞癌^[11]和肾透明细胞癌^[12]等均得到证实,但在突变频率上存在较大差异^[13],突变率较高的包括原发性胶质瘤(83%)、膀胱癌(66%)、肝细胞癌(44%)等,而突变率较低则有髓母细胞瘤(20%)、乳头状甲状腺癌(17%)、透明肾细胞癌(6.4%)等。研究还表明*TERT*基因启动子突变与患者临床症状密切相关,发生突变的膀胱癌或神经胶质瘤等患者往往表现出肿瘤易复发、易远端转移、

放化疗后预后差等特征,并且多种肿瘤数据均显示*TERT*基因启动子突变是癌症发生、发展和转移等过程的普遍特征^[14]。特别需要指出的是,多种癌症*TERT*基因启动子突变并非随机发生,而是主要集中在两个位点,-124C和-146C(基因编码起始位点定义为+1),且它们均突变为T(-124C>T和-146C>T),但这种特征背后的机制尚不清晰。

对23个膀胱癌细胞系检测发现除5个细胞系*TERT*基因启动子未发生保守性-124C和-146C位点突变外,其余18个细胞系均存在-124C或-146C突变(以-124C突变更常见)。发生突变的18个细胞系相对于5个未突变细胞系,*TERT*的mRNA含量平均增加18倍,蛋白含量和酶活性均增加2倍,最终使细胞系的端粒长度平均增加1.8倍,这意味着膀胱上皮细胞中*TERT*基因的启动子突变可有效增加*TERT*基因转录、蛋白表达和端粒酶催化活性,通过持续延长端粒长度而逃脱正常死亡命运,最终达到“永生”而癌变^[15]。临床标本也进一步证明*TERT*基因启动子突变可上调基因表达和端粒酶活性^[16]。

为了寻找*TERT*基因启动子-124C或-146C突变增加基因转录能力的机制,研究人员检测了突变序列与转录因子家族ETS(E-twenty-six)成员结合能力的差异。首先利用RNA干扰方法依次对13个ETS因子进行验证,从中鉴定出5个潜在成员,其中GA结合蛋白A(GA-binding protein A, GABPA)效应最为明显。

进一步免疫共沉淀和单分子蛋白结合实验显示 GABPA 与突变序列结合能力显著高于正常序列. GABPA 可与 GABPB 形成异源二聚体 GABP, 随后选择性与发生 -124C 或 -146C 突变的 *TERT* 基因启动子结合, 这种结合有利于激活 *TERT* 基因表达, 产生过多的端粒酶催化端粒延长而克服许多癌症的复制性衰老^[17].

至此, 对 *TERT* 基因启动子突变致癌机制有了一个初步的理解: 正常情况下, 细胞内只产生少量 *TERT* 的 mRNA 和蛋白, 所催化的反应不足以抑制 DNA 复制造成的缩短效应, 最终细胞衰老和死亡如图 1(a); 启动子 -124C 或 -146 突变为 T 后可显著增加转录因子 GABP 的结合和激活, 从而增加 mRNA 和蛋白含量, 增加的端粒酶活性可有效保证细胞分裂过程中端粒长度保持, 实现“永生性”如图 1(b).

4 研究意义和展望

TERT 基因启动子突变的发现一方面解释了癌细胞端粒酶重激活机制(癌症发生的基础之一), 另一方面也为癌症诊治提供了一种全新思路(诊断或治疗的分子靶点^[18]), 该特征也可作为癌细胞标志物而用于区分正常细胞及干细胞等. 基于癌细胞存在 *TERT* 启动子突变前提并结合合成生物学逻辑与门设计原理

实现了对膀胱癌细胞的选择性识别^[19], 从而为进一步选择性杀伤癌细胞奠定坚实基础. *TERT* 基因启动子突变还可应用于膀胱癌尿液诊断, 将极大革新目前膀胱镜诊断为患者带来的痛苦. 而通过靶向 *TERT* 酶本身或抑制其表达也对预防癌症复发和转移具有重要益处^[20].

尽管 *TERT* 基因启动子保守性突变在多种癌症中不同比例的存在, 并与患者临床症状存在一定程度的关联, 基础研究也初步揭示了 *TERT* 基因突变造成表达上调的机制, 但目前许多关键问题尚待研究. 突变保守性的机制何在(目前鉴定的突变基本都为 -124C 或 -146C 两个点)? 突变后效应差异机制(相同突变细胞系端粒酶表达和活性存在上百倍的差异)? *TERT* 基因启动子突变造成表达升高的其他机制(如空间结构变化等, 特别是存在 G-四链 DNA 可能性)? 这些问题的解决将更深一步理解癌症发生的端粒作用机制.

总之, 端粒酶基因突变为癌症基础研究和临床应用拓展了一个全新领域, 但距离实际应用尚有较大距离, 毕竟从端粒酶发现至今 30 年间, 尚未有理想药物应用于癌症临床治疗, 因此将端粒研究最新进展应用于人类健康仍是一件任重道远的事情.

参考文献

- Varela E, Blasco M A. 2009 Nobel prize in physiology or medicine: telomeres and telomerase. *Oncogene*, 2010, 29: 1561–1565
- Kirkpatrick K L, Mokbel K. The significance of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in cancer. *Eur J Surg Oncol*, 2001, 27: 754–760
- Xu L, Li S, Stohr B A. The role of telomere biology in cancer. *Annu Rev Pathol*, 2013, 8: 49–78
- Huang F W, Hodis E, Xu M J, et al. Highly recurrent *TERT* promoter mutations in human melanoma. *Science*, 2013, 339: 957–959
- Horn S, Figl A, Rachakonda P S, et al. *TERT* promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science*, 2013, 339: 959–961
- Killela P J, Reitman Z J, Jiao Y, et al. *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: 6021–6026
- Quaas A, Oldopp T, Tharun L, et al. Frequency of *TERT* promoter mutations in primary tumors of the liver. *Virchows Arch*, 2014, 465: 673–677
- Rachakonda P S, Hosen I, de Verdier P J, et al. *TERT* promoter mutations in bladder cancer affect patient survival and disease recurrence through modification by a common polymorphism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 17426–17431
- Wu S, Huang P, Li C, et al. Telomerase reverse transcriptase gene promoter mutations help discern the origin of urogenital tumors: a genomic and molecular study. *Eur Urol*, 2014, 65: 274–277
- Melo M, da Rocha A G, Vinagre J, et al. *TERT* promoter mutations are a major indicator of poor outcome in differentiated thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99: E754–E765
- Wu RC, Ayhan A, Maeda D, et al. Frequent somatic mutations of the telomerase reverse transcriptase promoter in ovarian clear cell carcinoma but not in other major types of gynaecological malignancy. *J Pathol*, 2014, 232: 473–481
- Hosen I, Rachakonda P S, Heidenreich B, et al. *TERT* promoter mutations in clear cell renal cell carcinoma. *Int J Cancer*, 2015, 136: 2448–2452

- 13 Vinagre J, Almeida A, Pópulo H, et al. Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nat Commun*, 2013, 4: 2185
- 14 Heidenreich B, Rachakonda P S, Hemminki K, et al. TERT promoter mutations in cancer development. *Curr Opin Genet Dev*, 2014, 24: 30–37
- 15 Borah S, Xi L, Zaug A J, et al. Cancer. TERT promoter mutations and telomerase reactivation in urothelial cancer. *Science*, 2015, 347: 1006–1010
- 16 Huang D S, Wang Z, He X J, et al. Recurrent TERT promoter mutations identified in a large-scale study of multiple tumour types are associated with increased TERT expression and telomerase activation. *Eur J Cancer*, 2015, 51: 969–976
- 17 Bell R J, Rube H T, Kreig A, et al. Cancer. The transcription factor GABP selectively binds and activates the mutant TERT promoter in cancer. *Science*, 2015, 348: 1036–1039
- 18 Vinagre J, Pinto V, Celestino R, et al. Telomerase promoter mutations in cancer: an emerging molecular biomarker? *Virchows Arch*, 2014, 465: 119–133
- 19 Liu Y, Zeng Y, Liu L, et al. Synthesizing AND gate genetic circuits based on CRISPR-Cas9 for identification of bladder cancer cells. *Nat Commun*, 2014, 5: 5393
- 20 Liu Z, Li Q, Li K, et al. Telomerase reverse transcriptase promotes epithelial-mesenchymal transition and stem cell-like traits in cancer cells. *Oncogene*, 2013, 32: 4203–4213

Telomerase mutations and carcinogenesis

GUO XiaoQiang^{1,2}, HUANG WeiRen¹ & CAI ZhiMing¹

¹ National and Local Joint Key Laboratory of Engineering for Medical Synthetic Biology Clinical Application of Key Technologies/Shenzhen Key Laboratory of Medical Reprogramming Technology, Shenzhen Second People's Hospital/The First Affiliated Hospital of Shenzhen University, Shenzhen 518035, China;

² College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China

A telomere is a specific structure of repetitive nucleotide sequences at the ends of the chromosomes, which protects the chromosomes from degradation or fusion. The telomere dysfunction can lead to various diseases, such as aging and cancer. Telomerase reverse transcriptase (TERT) is a catalytic subunit of telomerase which maintains the integrity of telomere. Recurrent mutations in TERT promoter -124 C>T and -146 C>T have been identified in multiple cancer types, including melanoma, glioblastomas, bladder cancer and hepatocellular carcinoma. These TERT promoter mutations are correlated with higher levels of TERT mRNA, protein and enzymatic activity, which are also associated with telomere length. These mutations are beneficial to recruiting transcription factor GA-binding protein (GABP) to activate *TERT* gene expression. These discoveries will provide a new biomarker for diagnosis and treatment of human cancers.

Telomerase reverse transcriptase, promoter, mutation, carcinogenesis

doi: 10.1360/N972015-00762