

人端粒酶反转录酶线粒体转位的研究进展

胡惟恺¹, 刘瑞霞², 阴赓宏^{1*}

(首都医科大学附属北京妇产医院 1. 内科; 2. 中心实验室, 北京 100026)

摘要:端粒酶反转录酶是端粒酶的亚单位,在维持端粒酶活性和调节细胞周期的过程中起关键作用。人端粒酶反转录酶(hTERT)主要在生殖细胞、胚胎干细胞和肿瘤细胞中高表达,参与肿瘤发生、发展,在正常细胞中亦有少量表达;hTERT主要位于细胞核内,线粒体中也有分布。hTERT从细胞核内穿过核孔移入线粒体,使得线粒体内hTERT增加,称为hTERT的线粒体转位。hTERT线粒体转位在细胞凋亡、细胞永生化和细胞耐药中均发挥作用。对hTERT的调控可能成为某些疾病治疗的新突破。

关键词:人端粒酶反转录酶;线粒体转位;细胞凋亡

中图分类号:R33 文献标志码:A

Research progress on mitochondrial translocation of human telomerase reverse transcriptase

HU Wei-kai¹, LIU Rui-xia², YIN Cheng-hong^{1*}

(1. Department of Internal Medicine; 2. Department of Central Laboratory, Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University, Beijing 100026, China)

Abstract: Telomerase reverse transcriptase is a subunit of telomerase, which plays an important role in activating telomerase and regulating cell cycle. Human telomerase reverse transcriptase(hTERT) is mainly expressed in germ cells, embryonic stem cells and tumor cells, only a few expressed in normal cell. hTERT is mainly located in nucleus and also distributed in mitochondria. hTERT migration from nucleus into mitochondria is called the mitochondrial translocation of hTERT. Mitochondrial translocation of hTERT functions in the process of apoptosis, immortalization and drug resistance. Control of hTERT is a potential breakthrough in the treatment of diseases.

Key words: human telomerase reverse transcriptase; mitochondrial translocation; cell apoptosis

人端粒酶反转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)是人端粒酶的催化亚单位和限速酶,主要表达在细胞核中,对维持端粒酶活性和端粒长度具有关键作用,在细胞生存、转化、分化、维持线粒体功能以及DNA损伤氧化应激时核基因的表达等方面也发挥重要作用^[1]。近年来研究显示在

耐药细胞或接受氧化应激刺激的细胞中,细胞质(主要是线粒体)hTERT的表达较正常细胞显著增加^[2]。

hTERT从细胞核内穿过核孔移入线粒体,使得线粒体内hTERT表达增加,称为hTERT的线粒体转位,该过程可逆^[3]。线粒体呼吸链是细胞有氧呼

收稿日期:2020-08-18 修回日期:2020-11-23

基金项目:国家自然科学基金(81871605)

*通信作者(corresponding author): yinchh@ccmu.edu.cn

吸和氧化磷酸化的场所,线粒体内活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)为线粒体内膜上的呼吸链副产物,其来源主要在线粒体内。hTERT通过核孔从核内移出至线粒体内膜,与线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)非特异性结合,调节线粒体呼吸链功能,ROS生成减少,减轻mtDNA损伤,保护线粒体功能,辅助细胞抗凋亡^[1,4]。hTERT线粒体转位在细胞凋亡中的作用可能为双向的,且还与细胞永生化和细胞耐药相关。本文就hTERT的转录和表达调控,hTERT线粒体转位过程及影响因素,线粒体内hTERT的生物学功能等相关研究进展作一简要综述。

1 hTERT的表达和调控

hTERT基因组DNA长37 kb,其中33 kb是内含子序列,其余4 kb与hTERT mRNA转录相关。hTERT蛋白在大部分体细胞中不表达或少量表达,在生殖细胞、胚胎干细胞和肿瘤细胞中高表达,正常情况下,细胞内hTERT大部分位于细胞核,仅20%~30%位于细胞质(包括线粒体)^[5]。hTERT蛋白的表达受转录、RNA加工、转运、mRNA降解、翻译等水平的调控,其中主要是转录水平。

调控hTERT转录的因素主要包括原癌基因、转录因子。位于第8号染色体的原癌基因c-myc本身或与异二聚体MAX形成复合物后结合hTERT启动子序列中的E盒,上调hTERT的转录活性^[6]。ETS原癌基因2可与c-myc相互作用,共同与hTERT启动子结合并促进转录,而巨噬细胞集落刺激因子1受体则可促进c-myc与hTERT启动子的结合,促进转录^[7]。核因子 κ B(NF- κ B)是一种转录因子复合物,可与启动子结合或通过影响hTERT转录因子的表达起激活转录的作用^[7]。转录因子刺激蛋白1(Sp1)在胎儿、精子、造血干细胞中高表达,与hTERT启动子上的GC盒结合而增强hTERT转录活性^[8]。雌激素受体阳性细胞中的雌二醇(E2)。正常细胞和端粒酶阴性永生细胞系中的曲古霉素A(I和II类组蛋白脱乙酰酶的抑制剂)可促进hTERT的转录^[9-10]。转录因子Mad1通过与异二聚体MAX形成复合物,再与E盒结合,抑制hTERT的表达;而肿瘤细胞中过表达的转录因子E2F1通过与hTERT启动子区域E2识别位点结合,对c-myc

诱导hTERT表达进行负反馈调控来抑制转录^[7-8]。p53可能通过抑制Sp1结合到hTERT基因启动子上而实现对hTERT基因的转录抑制作用^[8]。HeLa细胞内的复合体5c、复合体8b可抑制hTERT基因启动子的活性,减少转录^[11]。Wt1可直接与hTERT基因启动子发生作用抑制hTERT基因转录^[6]。此外,研究显示microRNA可以通过调控hTERT的转录因子来间接调控hTERT表达,如miR-494和miR-1294下调c-myc^[6]。部分转录因子对hTERT转录具有双重作用。上游刺激因子蛋白属于基本的螺旋-环-螺旋亮氨酸拉链家族蛋白,其中的1/2异二聚体可直接与端粒酶阳性和阴性细胞中hTERT近端启动子上的E盒结合在调节hTERT基因表达中起激活和抑制作用。AP-1、早期生长反应蛋白-1、低氧诱导因子2 α (HIF-2 α)等也存在双重作用^[7]。

RNA加工水平的调控主要为剪接。当剪接发生在两个内含子之间时,会删除两个内含子及其中间的全部外显子或内含子,称为RNA的可变剪接。已知有22种hTERT mRNA的可变剪接,任何一部分基因的缺失均会导致无功能性剪接变异体的产生;仅两种无缺失mRNA的剪接变异体具有催化作用,构成有功能的hTERT mRNA^[12-13]。以下两种为较常见的可变剪接体,外显子7和8上182个核苷酸的缺失($\alpha+\beta$ -变异体),基因外显子6上的36个核苷酸的剪切使得部分蛋白分子上的反转录酶A区缺失($\alpha-\beta$ +变异体)并失去催化作用;无功能性hTERT的产生是对hTERT负性调控的一种方式^[13-14]。研究显示凋亡性核酸内切酶(apoptotic endonuclease, EndoG)在细胞内的分布和hTERT相同;改变EndoG的表达水平及定位,hTERT mRNA可变剪接体的表达水平和定位也相应改变,因此认为EndoG的过表达参与hTERT mRNA的可变剪接^[13]。正常情况下,EndoG位于线粒体内;在凋亡细胞或DNA受损的细胞中,EndoG移入核内,线粒体内EndoG减少,核内EndoG增加,核内进行hTERT mRNA的可变剪接^[15];CD4⁺T细胞中EndoG的过表达,使有功能的hTERT可变剪接体的表达下调,无功能的可变剪接变体表达上调。以上因素造成有活性 $\alpha+\beta$ -hTERT mRNA可变剪接体数量减少,而无活性的 $\alpha+\beta$ -hTERT mRNA可变剪接体数量增加,两种mRNA剪接体比例的改变导致端粒酶活

性受抑制^[16]。

miRNA 和 hTERT 启动子甲基化均与 hTERT 表达减弱相关。miRNA (miR-138、491-5p、1266、1207-5p、1182 等)可通过结合于 hTERT 3'UTR 上的互补序列而干扰 hTERT mRNA 的正常翻译,抑制 hTERT 表达^[17]。研究显示 hTERT 启动子内特定区域的甲基化,特别是 hTERT 核心启动子上游的甲基化与基因激活有关,但其他基因的启动子甲基化通常与基因沉默相关^[6]。线粒体内不包含 hTERT 相关基因和蛋白,转录和翻译均不在线粒体内进行,因此线粒体内的 hTERT 表达是通过线粒体转位实现的。

2 hTERT 的线粒体转位

细胞质中有少量 hTERT 表达,主要位于线粒体内,但线粒体内不包含 hTERT 相关基因,因此线粒体 hTERT 是通过线粒体转位实现的。

hTERT 蛋白具有核定位和线粒体定位功能。hTERT 的 C 端多肽(27 ku)可在端粒酶的作用下进行核转位或者染色体尾端定位;TERT 的 N 端则是线粒体定位信号,N 端的线粒体定位肽通过与线粒体膜上的出入转位酶结合来实现线粒体转位^[6,18]。氧化应激条件下,hTERT 线粒体转位的起始因子(Tyr707)磷酸化^[4],hTERT 在定位信号肽的作用下主动发生核外移,进入细胞质后,在线粒体膜上的线粒体外膜异位酶(translocase of the outer mitochondrial membrane member, TOM)、线粒体内膜异位酶(translocase of the inner mitochondrial membrane, TIM)及 TERT 的线粒体定位肽的作用下,TERT 结合到 mtDNA 的编码区 ND1 和 ND2(编码呼吸链复合体 I 的亚基)并保护这两组基因,辅助编码线粒体呼吸链复合体 I 的亚基,增加功能性复合物 I 亚基的合成,提高复合体 I 的呼吸效率,减少 ROS 生成^[5-6]。研究^[19]发现核外移过程中,信号蛋白 14-3-3 绑定于 TERT 上,使 TERT 定位于细胞核,当 14-3-3 蛋白表达阴性时,TERT 从细胞核移出。酪氨酸磷酸酶 Shp-2 在细胞核和细胞质中均有分布,核内 Shp-2 锚定 Tyr707,抑制 Tyr707 活性,从而抑制 hTERT 线粒体转位;内皮细胞中核内 Shp-2 可与 TERT 结合,并在 TERT 核外移之前分离;当 Shp-2 下调时,线粒体内 TERT 表达上调^[20-21]。

另有研究^[6]显示部分哺乳动物 TERT 以线粒体膜电位依赖的方式导入线粒体基质。制备与蛋白质 a(非线粒体伴随蛋白且单独不能进入线粒体)相连的嵌合结构 hTERT N33 PrA(hTERT 的前 33 个 N 端氨基酸,包括线粒体定位信号),将 hTERT N33 PrA 与线粒体共同孵育后进行筛选,结果显示进入线粒体的 hTERT N33 PrA 没有分子质量的改变,表明 hTERT 上没有可切割的线粒体定位信号,其进入线粒体的过程依赖于线粒体膜电位;而当无膜电位时,嵌合蛋白可与线粒体外膜结合,但无法进入线粒体。

3 hTERT 线粒体转位的功能

线粒体内 TERT 作为一种不依赖端粒酶 RNA 的反转录酶起作用,在 hTERT 过表达的细胞中,hTERT 线粒体转位增多,转位后定位于线粒体内膜基质侧,非特异性地与 mtDNA 的各个区域(包括 12S 和 16S rRNA,ND1、2、4 和 5,COX I 和 III,以及 ATP 合酶的 6 和 8 亚基)结合,参与 mtDNA 代谢,提高线粒体膜电位^[6];hTERT 线粒体转位还可增加细胞内还原型和氧化型谷胱甘肽的比例,增强抗氧化功能,也可增加细胞色素 C 氧化酶(线粒体电子传输链中的限速酶)活性^[22],最终减少 ROS 生成,保护线粒体免受氧化应激损伤,减少 mtDNA 损伤^[1,4]。hTERT 还特异性地与 14 种 mtDNA 编码的 tRNA 相互作用,所有与 hTERT 相互作用的 RNA 均与 mtDNA 复制相关,因此推测 TERT 可能参与 mtDNA 双链断裂修复^[4-5]。细胞水平研究表明干扰 hTERT 的线粒体定位功能但保持其核内端粒酶的功能,hTERT 表达后不能进入线粒体,却仍可在核内发挥作用,使得 mtDNA 完整性缺失,mtROS 增加并改变了线粒体超微结构,细胞出现线粒体功能缺陷^[6]。易患癌的小鼠模型中,TERT 敲除小鼠全部死于线粒体功能障碍和端粒缺失^[23],表明 TERT 对线粒体具有保护作用;同样,在 TERT 敲除的 HUVEC 细胞以及 TERT 敲除小鼠的心脏中,也发现线粒体内 TERT 对线粒体功能的保护作用^[4-5]。有研究发现人脐带血单核细胞的线粒体 hTERT 在氧化应激时增多可以保护新生儿的 mtDNA 免受妊娠期糖尿病的氧化损伤^[24]。hTERT 线粒体转位还可能与细胞凋亡、细胞永生化和细

胞耐药相关。

hTERT 线粒体转位在细胞凋亡中可能存在双重作用,既有对细胞的保护,防止细胞凋亡,也可导致细胞损伤。hTERT 线粒体转位后与 mtDNA 结合,减少 mtDNA 损伤,同时增强抗氧化功能,减少 ROS 生成,保护线粒体免受氧化应激损伤,辅助抗凋亡。研究结果显示 hTERT 线粒体转位对细胞有损伤作用。有研究^[25]证实,经过过氧化氢处理的正常细胞中,hTERT 的表达水平与 mtDNA 损伤呈正相关;经过过氧化氢处理的 hTERT 突变细胞(hTERT 的 N 端线粒体前导序列突变,使线粒体转位功能丧失,但保持催化活性)中,过氧化氢诱导的 mtDNA 损伤显著减少,且未见细胞活性或细胞生长受损,表明 hTERT 线粒体转位缺失有助于细胞的抗凋亡活性,保护细胞免受细胞凋亡,减少 mtDNA 损伤。认为可能是由于线粒体基因组对氧化应激高度敏感,致使过氧化氢在 mtDNA 中诱导的损伤比在核基因组中更多;而 hTERT 的线粒体转位使细胞对氧化应激诱导的 mtDNA 损伤更敏感并导致细胞死亡;无 hTERT 线粒体转位时,则出现 mtDNA 损伤减少、细胞存活率增加、防止细胞凋亡的情况。有研究^[26]发现体外培养的 CAD 和非 CAD 受试者心房及脂肪微血管内皮细胞中,线粒体 TERT 上调能清除内皮细胞内过多的 ROS,减少 DNA 损伤。此外,有研究^[27]证实细胞凋亡启动时,线粒体内 hTERT 可引起细胞器受损,受损细胞器累积后引起细胞自噬导致细胞死亡,同样支持上述观点。

细胞永生生化导致癌症的关键在于直接或间接调控 hTERT 启动子,使 hTERT 重新激活,但抑制

hTERT 出核可阻止细胞永生生化,增加细胞对毒性药物的敏感性^[28],因此认为 hTERT 的线粒体转位可能参与细胞永生生化。

hTERT 线粒体转位还可导致肿瘤细胞耐药。hTERT 在细胞核内作为反转录酶,调节端粒酶活性,维持端粒长度,参与肿瘤细胞的多种生物学行为,而 hTERT 在线粒体内则与细胞耐药相关。大多数抗癌药物诱导细胞凋亡的机制是产生 ROS,引起过量 DNA 损伤和凋亡,若持续使用相同药物治疗同一恶性肿瘤可能会使 ROS 产生率减低,导致细胞耐药。而 hTERT 线粒体转位致使线粒体内 hTERT 过表达,调节呼吸链功能,减少 ROS 产生,抑制 ROS 诱导的损伤,减少 mtDNA 损伤,细胞耐受能力增强,减少凋亡的发生^[2]。因此,hTERT 的线粒体转位可能作为一个潜在的多药耐药机制。

4 小结

氧化应激时,hTERT 在定位肽的作用下核外移,再与线粒体膜上的转位酶结合进行转位,减少 ROS 生成,减少氧化应激损伤,保护 mtDNA,但 hTERT 的线粒体输出途径尚未明确。线粒体内 hTERT 可能参与细胞氧化应激、凋亡、永生化和细胞耐药过程,机制未明。线粒体内 hTERT 还可能与癌症(如肝癌、胰腺癌、头颈部癌等)、冠脉疾病等相关。利用现代分子生物技术干扰或改变 hTERT 的线粒体转位过程,进一步明确 hTERT 转位的生物学功能以及与某些疾病的关系可能成为未来研究的方向。

参考文献:

- [1] Yan J, Zhou Y, Chen D, *et al.* Effects of mitochondrial translocation of telomerase on drug resistance in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Cancer*, 2015, 6: 151-159.
- [2] 常杏. 端粒酶逆转录酶线粒体转位在肝癌细胞耐药中的作用及机制研究[J]. 西安:第三军医大学学报, 2017, 39: 781-786.
- [3] Buchner N, Zschauer TC, Lukosz M, *et al.* Downregulation of mitochondrial telomerase reverse transcriptase induced by H2O2 is Src kinase dependent [J]. *Exp Gerontol*, 2010, 45: 558-562.
- [4] Ahmed S, Passos JF, Birket MJ, *et al.* Telomerase does not counteract telomere shortening but protects mitochondrial function under oxidative stress[J]. *Cell Sci*, 2008, 121: 1046-1053.
- [5] Haendeler J, Drose S, Buchner N, *et al.* Mitochondrial telomerase reverse transcriptase binds to and protects mitochondrial DNA and function from damage[J]. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*, 2009, 29: 929-935.

- [6] Sharma NK, Reyes A, Green P, *et al.* Human telomerase acts as a hTR-independent reverse transcriptase in mitochondria[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: 712-725.
- [7] Ball AJ, Levine F. Telomere-independent cellular senescence in human fetal cardiomyocytes [J]. *Aging Cell*, 2005, 4: 21-30.
- [8] Zhang F, Cheng D, Wang S, *et al.* Human specific regulation of the telomerase reverse transcriptase gene [J]. *Gene*, 2016, 7: 30-42.
- [9] Choi J, Min N, Park J, *et al.* TSA-induced DNMT1 down-regulation represses hTERT expression via recruiting CTCF into demethylated core promoter region of hTERT in HCT116[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391: 449-454.
- [10] Kyo S, Takakura M, Kanaya T, *et al.* Estrogen activates telomerase[J]. *Cancer Res*, 1999, 59: 5917-5921.
- [11] Li Y, Pan G, Chen Y, *et al.* Inhibitor of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene promoter induces cell apoptosis via a mitochondrial-dependent pathway[J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 145: 370-378.
- [12] Hrdlickova R, Nehyba J, Bose HR, *et al.* Alternatively spliced telomerase reverse transcriptase variants lacking telomerase activity stimulate cell proliferation [J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32: 4283-4296.
- [13] Zhdanov DD, Pokrovsky VS, Orlova EV, *et al.* Intracellular localization of apoptotic endonuclease EndoG and splice-variants of telomerase catalytic subunit hTERT[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2017, 82: 894-905.
- [14] Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, *et al.* Regulation of telomerase by alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in normal and neoplastic ovary, endometrium and myometrium[J]. *Int J Cancer*, 2000, 85: 330-335.
- [15] Montes M, Becerra S, Sanchez-Alvarez M, *et al.* Functional coupling of transcription and splicing [J]. *Gene*, 2012, 501: 104-117.
- [16] Vasina DA, Zhdanov DD, Orlova EV, *et al.* Apoptotic endonuclease EndoG inhibits telomerase activity and induces malignant transformation of human CD4⁺ T cells [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2017, 82: 24-37.
- [17] 陈陵. hTERT 调控相关 miRNA 的鉴定及功能研究 [D]. 西安: 第三军医大学, 2011, 12: 1-141.
- [18] Santos JH, Meyer JN, Skorvaga M, *et al.* Mitochondrial hTERT exacerbates free-radical-mediated mtDNA damage [J]. *Aging Cell*, 2004, 3: 399-411.
- [19] Seimiya H, Sawada H, Muramatsu Y, *et al.* Involvement of 14-3-3 proteins in nuclear localization of telomerase [J]. *EMBO J*, 2000, 19: 2652-2661.
- [20] Jakob S, Schroeder P, Lukosz M, *et al.* Nuclear protein tyrosine phosphatase Shp-2 is one important negative regulator of nuclear export of telomerase reverse transcriptase [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283: 33155-33161.
- [21] Haendeler J, Hoffmann J, Brandes RP, *et al.* Hydrogen peroxide triggers nuclear export of telomerase reverse transcriptase via Src kinase family-dependent phosphorylation of tyrosine 707[J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23: 4598-4610.
- [22] Indran IR, Hande MP, Pervaiz S. hTERT over-expression alleviates intracellular ROS production, improves mitochondrial function, and inhibits ROS-mediated apoptosis in cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2011, 71: 266-276.
- [23] Hu J, Hwang SS, Liesa M, *et al.* Antitelomerase therapy provokes ALT and mitochondrial adaptive mechanisms in cancer[J]. *Cell*, 2012, 148: 651-663.
- [24] Li P, Tong Y, Yang H, *et al.* Mitochondrial translocation of human telomerase reverse transcriptase in cord blood mononuclear cells of newborns with gestational diabetes mellitus mothers [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2014, 103: 310-318.
- [25] Santos JH, Meyer JN, Van Houten B. Mitochondrial localization of telomerase as a determinant for hydrogen peroxide-induced mitochondrial DNA damage and apoptosis [J]. *Hum Mol Genet*, 2006, 15: 1757-1768.
- [26] Beyer AM, Freed JK, Durand MJ, *et al.* Critical role for telomerase in the mechanism of flow-mediated dilation in the human microcirculation novelty and significance [J]. *Circ Res*, 2016, 118: 856-866.
- [27] Green PD, Sharma NK, Santos JH. Telomerase impinges on the cellular response to oxidative stress through mitochondrial ROS-mediated regulation of autophagy [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 1509-1524.
- [28] Kovalenko OA, Kaplunov J, Herbig U, *et al.* Expression of (NES-) hTERT in cancer cells delays cell cycle progression and increases sensitivity to genotoxic stress [J]. *PLoS One*, 2010, 5: e10812. doi: 10.1371/journal.pone.0010812.