

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2796(2008)03-0262-04

抑制端粒保护蛋白 TPP1 表达诱导 ATM 依赖的 DNA 损伤反应

郭晓兰¹, 袁国华², 周京国², 唐中², 刘宁涛³, 杨明辉², 青玉凤², 吴凤霞², 朱道银¹ (¹重庆医科大学免疫学教研室, 重庆 400016, ²川北医学院附属医院风湿免疫研究所, 四川南充 637000, ³四川省遂宁市人民医院风湿科, 四川遂宁 629000)

Knockdown of TPP1 initiates ATM-dependent DNA damage response at telomeres

GUO Xiao-Lan¹, YUAN Guo-Hua², ZHOU Jing-Guo², TANG Zhong², LIU Ning-Tao³, YANG Ming-Hui², QING Yu-Feng², WU Feng-Xia², ZHU Dao-Yin¹¹Department of Microbiology and Immunology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China, ²Institute of Rheumatology and Immunology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China, ³Department of Rheumatology, People's Hospital of Suining City, Suining 629000, China

【Abstract】 AIM: To construct the retrovirus vector encoding shRNA targeting TPP1 and characterize the effects of TPP1 knockdown on DNA damage response (DDR) at telomeres and on cell proliferation in mouse embryonic fibroblasts (MEFs). METHODS: TPP1-shRNA (shTPP1-01 or shTPP1-02) was co-transfected with retrovirus expressing TPP1-HA into 293T cells. Western Blot was applied to detect the knockdown efficiency on exogenous TPP1-HA protein expression and RT-PCR was used to determine the endogenous TPP1 mRNA in TPP1 knockdown MEFs. ATM^{+/+} and ATM^{-/-} MEFs were infected with TPP1-shRNA and the cell proliferation was examined by cell growth curve and bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation, and telomere dysfunction induced foci (TIF) was characterized by immunofluorescence plus peptide nucleic acids-fluorescence *in situ* hybridization (IF/PNA-FISH). RESULTS: shTPP1-01 or shTPP1-02 significantly inhibited the expression of exogenous TPP1-HA protein and endogenous TPP1 mRNA. Knockdown of TPP1 in primary MEFs diminished cell proliferation, and the BrdU positive cells in shTPP1-01 or shTPP1-02 accounted for 8.0% or 8.7% respectively, significantly lower than that (29.3%) in MEFs transfected with vector only ($P < 0.01$, $P < 0.01$). The results from IF/PNA-FISH suggested that shTPP1 induced γ -H2AX and

53BP1 foci formation at telomeres in ATM^{+/+} MEFs, but not in ATM^{-/-} MEFs, and the quantification results demonstrated that there were at least 5 TIF in approximately 50% of ATM^{+/+} MEFs, however, less than 5% of ATM^{-/-} MEFs with 5 TIF. CONCLUSION: Knockdown of TPP1 initiates ATM-dependent DDR at telomeres and results in cellular senescence.

【Keywords】 telomere; short-hairpin RNA interference; DNA; damage response

【摘要】目的 构建端粒保护蛋白 TPP1 短发夹 RNA 表达载体, 探讨抑制 TPP1 表达后对端粒 DNA 损伤及细胞增殖的影响。方法 体外构建端粒保护蛋白 TPP1 shRNA 逆转录病毒表达载体 shTPP1-01, shTPP1-02, 与表达外源性 TPP1 的 TPP1-HA 质粒共同转染 293T 细胞, Western Blot 检测 shTPP1 抑制外源性 TPP1 蛋白表达, RT-PCR 检测 shTPP1 抑制小鼠胚胎成纤维细胞 (mouse embryonic fibroblast, MEF) 内源性 TPP1 mRNA 的表达。再用 shTPP1 分别感染 ATM^{+/+} MEF 和 ATM^{-/-} MEF 细胞后, 分别采用细胞生长曲线和 BrdU 掺入法检测细胞增殖, 免疫荧光/端粒肽核酸荧光原位杂交法 (IF/PNA-FISH) 检测端粒功能障碍诱导损伤灶 (TIF) 的形成。结果: shTPP1-01 和 shTPP1-02 均能明显抑制外源性 TPP1 蛋白和内源性 TPP1 mRNA 的表达, shTPP1-01 和 shTPP1-02 作用于原代培养的 MEFs 后细胞生长缓慢, BrdU 阳性细胞数量分别占 8.0% 和 8.7%, 显著低于对照细胞的 29.3% ($P < 0.01$, $P < 0.01$) 而细胞表现为体积变大, 形态扁平类似细胞衰老的形态学改变, IF/PNA-FISH 法检测结果显示, shTPP1 作用于 ATM^{+/+} MEF 细胞后导致端粒 DNA 损伤标志物 - 磷酸化的 H2AX (γ -H2AX) 和 53BP1 损伤灶 (TIF) 的形成, 定量结果显示约 50% 的 ATM^{+/+} 细胞中出现至少 5 个 TIF, 而在 shTPP1 作用后的 ATM^{-/-} 细胞中, 端粒 γ -H2AX 和 53BP1 形成的 TIF 数量显著减少, 出现 5 个 TIF 的细胞数量不足 5%, 与对照组细胞相比无显著性差异。结论: 抑制 TPP1 表达后诱发端粒 ATM 依赖的 DNA 损伤反应, 进而抑制细胞增殖, 促进细胞衰老。

【关键词】 端粒; 短发夹 RNA; DNA; 损伤反应

【中图分类号】 R392 **【文献标识码】** A

收稿日期 2007-09-14; 接受日期 2007-12-01

通讯作者: 袁国华. Tel (0817) 2262323 Email: ghuayuan1996@yahoo.com; 朱道银. Tel (023) 68485813 Email: immzhudy@tom.com

作者简介: 郭晓兰. 博士生 (导师袁国华, 朱道银), 副教授. Tel: (0817) 2262325 Email: alan5200@hotmail.com

0 引言

端粒位于真核细胞染色体的末端, 由串联重复的 DNA 和端粒结合蛋白组成, 其主要功能是保持染色体的完整性, 同时也是细胞生存期限的关键调控因

子^[1]. 对肿瘤的研究发现, 大多数肿瘤细胞在分裂增殖过程中保持稳定的端粒长度, 因而通过干涉端粒的结构和功能有可能控制肿瘤发展^[2]. 目前发现端粒保护蛋白主要有 6 个亚单位: TRF1, TRF2, TIN2, Rap1, POT1 和 TPP1, 他们共同组成端粒保护蛋白复合体(Shelterin)^[3], 其中 TPP1 是形成蛋白复合体的关键因子之一^[4-5]. 我们通过采用靶向端粒结合蛋白 TPP1 小片段干扰 RNA(siRNA) 技术, 构建 TPP1 短发夹 RNA(shRNA) 逆转录病毒介导的表达载体, 观察抑制 TPP1 表达后所诱导的端粒 DNA 损伤反应以及对细胞增殖和衰老的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 构建 TPP1 的 shRNA 寡核苷酸和 PCR 引物由美国 Sigma 公司合成; RNA 提取试剂盒、RT-

PCR 反应试剂盒、转染试剂 lipofectamine(Invitrogen 公司)、限制性内切酶 *Bgl* II, *Eco*R I, *Hind* III (BioLabs 公司); γ -H2AX 鼠 mAb(美国 Upstate 公司); 凝胶成像系统(美国 Alpha Innotech 公司); PCR 扩增仪 PTC-200 Engine Cycler(美国 MJ Research 公司); BX41 型显微镜(日本 Olympus 公司).

1.2 方法

1.2.1 TPP1 shRNA 表达载体的构建 小鼠 TPP1 的 mRNA 序列来自 GenBank(GI:22823923), 参照 siRNA 靶点设计原则, 设计如表 1. 合成的正义链和反义链经变性和退火反应后形成双链 DNA, 用限制性内切酶 *Bgl* II 和 *Hind* III 将其定向克隆至逆转录病毒载体 Retro-pSuper(含有嘌呤霉素抗性筛选标记), 经 *Eco*R I 和 *Hind* III 酶切鉴定得到的阳性克隆 Retro-pSuper-shTPP1, 简称 shTPP1.

表 1 shTPP1-01 和 shTPP1-02 的碱基序列

项目		碱基序列	位点
shTPP1-01	正义链	5' GATCCCC AATCAGGATTCAGATGTGCAG TTCAAGAGA CTGCACATCTGAATCCTGATTTTTTTA 3'	487 ~ 507
	反义链	5' AGCTTAAAAA AATCAGGATTCAGATGTGCAG TCTCTTCAA CTGCACATCTGAATCCTGATTGGG 3'	
shTPP1-02	正义链	5' GATCCCC AAGCTGTGTTCAGTGTCTGTTCAGAGA CAGACACAGTGAACACAGCTTTTTTTA 3'	731 ~ 751
	反义链	5' AGCTTAAAAA AAGCTGTGTTCAGTGTCTGTCTG TCTCTTCAA CTGCACATCTGAATCCTGATTGGG 3'	

划线部分为 TPP1 的 mRNA 特异核苷酸序列, 斜体部分为限制性内切酶位点, GATCC 为 *Bam*H I 粘性末端序列, AGCTT 为 *Hind* III 粘性末端序列.

1.2.2 细胞培养和转染 将质粒 shTPP1-01 和 shTPP1-02 分别转染病毒包装细胞 293T, 转染操作按 lipofectamine Plus 说明进行 ① 接种 1×10^5 个 293T 细胞于 10 cm 细胞培养盘中, 37°C, 50 mL/L CO₂ 培养过夜; ② 更换为无血清 DMEM, 逐滴加入转染试剂 Lipofectamine(含 4 μ g shTPP1 质粒 DNA), 培养 4 ~ 6 h 后, 更换为完全 DMEM 培养基培养; ③ 分别于培养 24, 48 h 后收集 293T 细胞培养上清感染 MEF 细胞, 72 h 后加入 2 mg/L 嘌呤霉素进行筛选.

1.2.3 Western Blot 检测 shTPP1 抑制外源性 TPP1 表达 细胞转染 72 h 后收集 293T 细胞, 超声破碎细胞后 4°C, 10 000 g 离心 20 min, 收集上清进行蛋白质定量测定. 取 50 μ g 蛋白质经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后电转移至 PVDF 膜, 以抗-HA 抗体检测 TPP1-HA 的表达水平.

1.2.4 RT-PCR 检测 shTPP1 抑制 MEF 内源性 TPP1 mRNA 的表达 收集含有逆转录病毒的 293T 细胞培养上清, 以 MOI = 500 的病毒滴度感染 MEF 细胞, 48 h 后重复感染 1 次, 72 h 后收集细胞提取总 RNA, 采用 RT-PCR 检测 shTPP1-01 和 shTPP1-02 对 MEF 细胞内源性 TPP1 在转录水平表达的干扰作用. TPP1

上游引物序列: 5' ATGTCCGATTCAGGGTTGCTGG 3', 下游引物序列: 5' TCATACCTGGGTAACTCAGACTCTG 3'. 同时扩增 GADPH 作为内参. GADPH 上游引物序列: 5' TCACCACCATGGAGAAGGC 3', 下游引物序列: 5' GCTAAGCAGTTGTTGGTGC 3'. PCR 反应条件: 94°C 5 min, 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s, 共 25 个循环.

1.2.5 细胞生长曲线和 BrdU 掺入实验 MEF 细胞经含有 shTPP1-01 和 shTPP1-02 表达质粒的逆转录病毒感染后, 加入 2 mg/L 嘌呤霉素筛选 2 wk 获得稳定表达 shTPP1-01 或 shTPP1-02 的细胞. 然后按 5×10^4 /孔接种于细胞培养 6 孔板中, 分别于第 0, 2, 4, 6, 8 日作细胞计数, 绘制细胞数量 - 时间的生长曲线. 同时按 2×10^4 /孔的细胞接种 8 孔的 chamberslide, 培养过夜后加入 BrdU(终浓度为 10 μ mol/L), 继续培养 1 h, 固定细胞后以抗 BrdU 抗体检测掺入 BrdU 后的细胞及其数量.

1.2.6 免疫荧光/端粒肽核酸荧光原位杂交法(IF/PNA-FISH)检测端粒功能障碍诱导的损伤灶(TIF) 将逆转录病毒介导的 shTPP1 分别感染 ATM^{+/+} MEF 和 ATM^{-/-} MEF 细胞, 2 mg/L 嘌呤霉素筛选 2 wk. 按

2×10^4 /孔接种 chamberslide 培养过夜,按文献 [6] 行 IF/PNA-FISH 法检测端粒上磷酸化的 H2AX 和 53BP1 的 TIF 形成。同时 Western Blot 检测细胞中磷酸化的 H2AX(γ -H2AX)水平。

统计学处理:实验结果中两组计量资料之间的比较,采用 $\bar{x} \pm s$ 进行 t 检验。

2 结果

2.1 逆转录病毒介导的 shTPP1 质粒的鉴定和功能检测

按上述描述的方法构建逆转录病毒介导的 shTPP1 质粒。shTPP1 质粒经限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切后,琼脂糖凝胶电泳结果显示约为 300 bp 的片段,而空载体酶的片段为 240 bp 左右,与预期值一致,即 shTPP1 的大小为 60 bp 左右(图 1A)。shTPP1 与表达外源性的 TPP1-HA 质粒共同转染 293T 细胞后,Western Blot 结果显示 shTPP1-01 和 shTPP1-02 均能明显抑制外源性 TPP1 蛋白的表达(图 1B)。RT-PCR 结果表明 shTPP1-01 和 shTPP1-02 分别有效地降低了 MEF 细胞内源性 TPP1 在转录水平的表达(图 1C)。

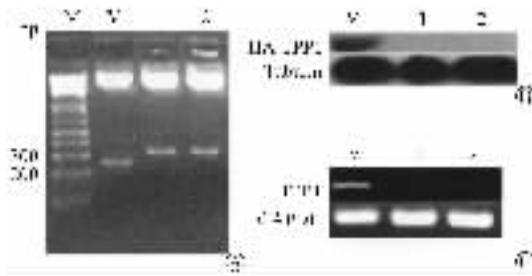


图1 shTPP1 质粒的构建和鉴定及其功能检测
A: shTPP1 经 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切; B: Western Blot 检测 shTPP1 作用后外源性 TPP1 蛋白的表达水平; C: RT-PCR 电泳。M: 标准分子质量; V: 空载体; 1: shTPP1-1; 2: shTPP1-2; Tubulin: 加样的蛋白量; GAPDH: 内参。

图1 shTPP1 质粒的构建和鉴定及其功能检测

2.2 抑制 TPP1 表达对细胞增殖的影响

与对照组细胞相比,shTPP1 作用于原代培养的 MEFs 后,细胞生长明显减缓。BrdU 细胞增殖掺入实验进一步证实,BrdU 阳性细胞数量在空载体质粒转染的对照细胞组中占 29.3%,在 shTPP1-01 或 shTPP1-02 作用后的细胞分别仅占 8.0% ($t = 11.49, P < 0.01$) 和 8.7% ($t = 10.96, P < 0.01$)。增殖受到抑制的细胞在显微镜下表现为体积变大、形态扁平类似细胞衰老的形态学改变(图 2)。

2.3 抑制 TPP1 表达对端粒 DNA 损伤反应的影响

shTPP1 作用于 ATM^{+/+} 细胞后, γ -H2AX 明显增高,而在 ATM^{-/-} 细胞中则未检测到(图 3A);在空载

体质粒转染的 ATM^{+/+} 细胞中 γ -H2AX 形成 TIF 的阳性率为 5%,在 shTPP1-01 或 shTPP1-02 作用后的 ATM^{+/+} 细胞则分别为 45% ($t = 15.49, P < 0.01$) 和 40% ($t = 11.26, P < 0.01$);53BP1 在空载体质粒转染的 ATM^{+/+} 对照细胞中形成 TIF 的阳性率为 4.0%,而在 shTPP1-01 或 shTPP1-02 作用后的 ATM^{+/+} 细胞中 TIF 分别为 42% ($t = 14.72, P < 0.01$) 和 35% ($t = 9.97, P < 0.01$);TPP1 受到抑制后,ATM^{+/+} 细胞中 γ -H2AX 形成 TIF 的信号(绿色)、53BP1 形成 TIF 的信号(绿色)与端粒 PNA-FISH 杂交的信号 TTAGGG-FISH(红色)相重合,表明 DNA 损伤反应发生在染色体的端粒。定量分析显示,大约 50% 的 ATM^{+/+} 细胞中出现至少 5 个由 γ -H2AX 或 53BP1 形成的 TIF(图 3B,C);ATM^{-/-} 细胞在 shTPP1 作用后的细胞中形成 TIF 的数量与空载体转染细胞相比无明显差异,ATM^{-/-} 细胞中出现 5 个 TIF 的细胞数量不足 5%(图 3D),表明抑制 TPP1 表达后诱导端粒发生了 ATM 依赖的 DNA 损伤反应。

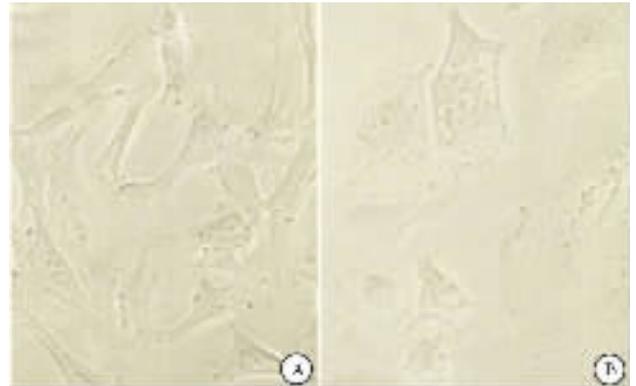
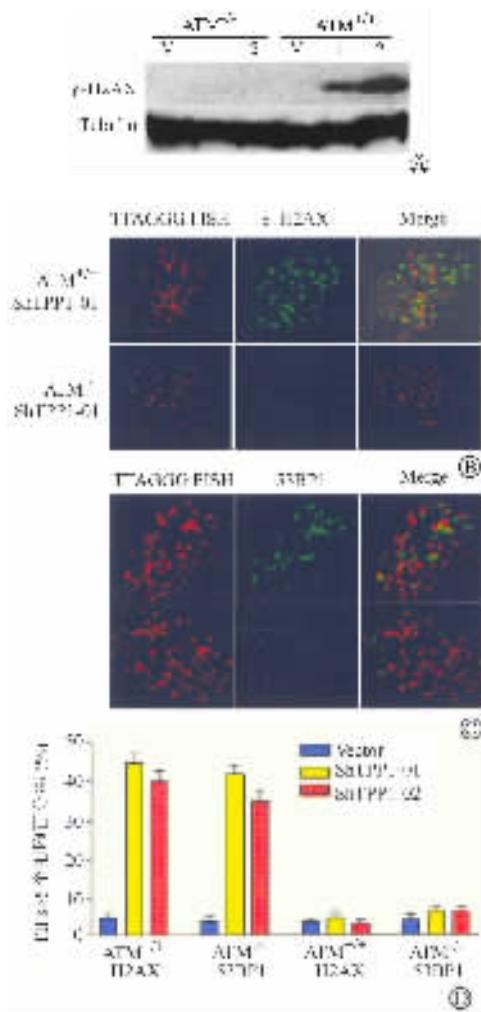


图2 抑制 TPP1 对细胞增殖的影响 $\times 400$

A: 转染空载体质粒的 MEFs; B: shTPP1 作用于后的 MEFs。

3 讨论

端粒除保持染色体的完整性外,在调控细胞的增殖能力方面起着关键性作用。哺乳动物细胞通过端粒上特有的蛋白区分正常染色体末端不被识别为损伤的 DNA 而诱发 ATM(ataxia-telangiectasia mutated) 或 ATR(ataxia-telangiectasia and Rad3 related) 介导的 DNA 损伤反应^[7],出现 DNA 损伤蛋白 53BP1 和 γ -H2AX 在端粒的聚积,导致细胞增殖衰竭或凋亡^[8]。端粒功能障碍引起的细胞增殖衰竭和凋亡是机体清除衰老细胞的一个重要途径,也是机体构成的一道重要癌变防御屏障。大多数肿瘤细胞在分裂增殖过程中保持稳定的端粒长度,因而在肿瘤细胞中诱导端粒功能障碍有可能成为新的治疗策略。



A: Western Blot 检测 ATM^{+/+} 和 ATM^{-/-} 细胞中的 γ -H2AX; B: IF/PNA-FISH 显示 ATM^{+/+} 和 ATM^{-/-} 细胞端粒中 γ -H2AX 形成的 TIF; C: IF/PNA-FISH 显示 ATM^{+/+} 和 ATM^{-/-} 细胞端粒中 53BP1 形成的 TIF; D: 定量分析 γ -H2AX 和 53BP1 在 ATM^{+/+} 和 ATM^{-/-} 细胞端粒中 TIF 的形成。V: 空载体; 1: shTPP1-1; 2: shTPP1。

图3 抑制 TPP1 表达诱发细胞端粒 ATM 依赖的 DNA 损伤反应

端粒保护蛋白在调控端粒的结构和功能方面起着关键性作用。最近 O'Connor 等^[9]发现, TPP1 表达的缺失可以导致端粒保护蛋白复合体的形成障碍, Chen 等^[10]则发现 TPP1 具有调控胞核输出通路信号作用, 直接调节其他端粒保护蛋白亚单位在核内水平。鉴于 TPP1 在端粒保护蛋白复合体中的重要功能, 我们设想是否可以通过抑制 TPP1 表达而诱导端粒功能障碍、抑制细胞增殖, 为此我们构建了针对 TPP1 的 siRNA 表达载体 (shTPP1), 并观察其对端粒 DNA 损伤反应的影响。

MEF 细胞经 shTPP1 作用后, 内源性 TPP1 mRNA 表达受到完全抑制, 伴随细胞生长明显迟缓, BrdU 摄入细胞的阳性率较空载质粒转染的细胞减少 3 倍左

右, 同时 shTPP1 作用后细胞出现体积变大、形态扁平、等细胞衰老的形态学表现。结果说明经 shTPP1 抑制内源性 TPP1 表达后可以抑制细胞增殖, 导致细胞衰老。

真核细胞的端粒 DNA 隐藏于保护蛋白复合体之中, 从而避免被细胞自身的 DNA 损伤检控机制识别为 DNA 双链断裂 (double-strand break, DSB) 而诱导 DNA 损伤反应。抑制 TPP1 表达导致细胞衰老是否可以归因于 DNA 损伤反应而引起的端粒功能障碍呢? 为此我们对端粒 DNA 损伤反应进行了检测, 结果显示, 经 shTPP1 作用抑制 TPP1 表达后, DNA 损伤蛋白 H2AX 的磷酸化水平明显增高, TIFs 发生率在 shTPP1 作用后的 ATM^{+/+} 细胞中达到 40% ~ 45%, 明显高于转染空载质粒的 ATM^{+/+} 对照细胞的 4.0% ~ 5.0%, 而且 γ -H2AX 和 53BP1 形成的 TIF 信号与端粒 PNA-FISH 杂交信号相重合, 表明 DNA 损伤反应发生在染色体的端粒。在 TPP1 缺失的 ATM^{+/+} 细胞中大约 50% 的细胞中出现至少 5 个 TIF, 但 ATM 敲除 (ATM^{-/-}) 细胞在 TPP1 表达抑制后, γ -H2AX 并无显著改变, 也极少见到 γ -H2AX 或 53BP1 在端粒上形成 TIF, 表明抑制 TPP1 表达诱导的端粒 DNA 发生损伤反应依赖于 ATM。

【参考文献】

- [1] Ramiro E, Verdun J, Karlseder J. Replication and protection of telomeres [J]. Nature, 2007, 21 (447 (7147)) 924-931.
- [2] Yibin D, Sandy C. Role of telomeres and telomerase in genomic instability, senescence and cancer [J]. Lab Invest, 2007, 87(3): 1071-1076.
- [3] de Lange T. Shelterin: The protein complex that shapes and safeguards human telomeres [J]. Genes Dev, 2005, 19(18): 2100-2110.
- [4] Cristofari G, Sikora K, Lingner J. Telomerase unplugged [J]. ACS Chem Biol, 2007, 2(3): 155-158.
- [5] Liu D, Safari A, O'Connor MS, et al. POT1 and regulates its localization to telomeres [J]. Nat Cell Biol, 2004, 6(7): 673-680.
- [6] Takai H, Smogorzewska A, de Lange T. DNA damage foci at dysfunctional telomeres [J]. Curr Biol, 2003, 13(17): 1549-1556.
- [7] d'Adda di Fagagna F, Teo SH, Jackson SP. Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response [J]. Genes Dev, 2004, 18(15): 1781-1799.
- [8] d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence [J]. Nature, 2003, 426(6963): 194-198.
- [9] O'Connor MS, Safari A, Xin H, et al. A critical role for TPP1 and TIN2 interaction in high-order telomeric complex assembly [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(32): 11874-11879.
- [10] Chen LY, Liu D, Songyang Z. Telomere maintenance through spatial control of telomeric proteins [J]. Mol Cell Biol, 2007, 27(16): 5898-5909.