

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.00019

鸡的端粒生物学研究

王伟, 王珊珊, 李辉, 王宁

东北农业大学动物科学与技术学院, 哈尔滨 150030

摘要: 端粒是线性染色体末端的核蛋白“帽子”结构, 其长度由端粒酶来维持。端粒对于维持基因组的稳定、防止细胞衰老和肿瘤发生具有重要的作用。鸡是遗传和发育研究的经典模式动物, 随着鸡基因组学研究的不断深入, 鸡的端粒和端粒酶研究取得了很大进展。文章综述了近年来鸡的端粒生物学研究进展, 并提出了未来的研究方向。

关键词: 鸡; 端粒; 端粒酶; 鸡端粒酶逆转录酶; 鸡端粒酶 RNA

Telomere biology of the chicken

WANG Wei, WANG Shan-Shan, LI Hui, WANG Ning

College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract: Telomeres, the nucleoprotein “caps” protecting the ends of linear chromosomes, are maintained by telomerase. Telomeres have important roles in maintaining genomic stability and preventing senescence or oncogenesis. Chicken is a classical model animal for genetic and developmental studies. With further development of chicken genomics, great progress has been made in research of chicken telomere and telomerase. This review describes recent advances and future research directions in chicken telomere biology.

Keywords: chicken; telomere; telomerase; *chTERT*; *chTR*

鸡是重要的实验动物和经济动物, 同时又是一种重要的中间进化模式生物, 代表着大约 9 000 种鸟类。2004 年鸡的基因组测序完成^[1], 鸡是第一个被测序的鸟类。鸡的基因组约含 10 亿个碱基对, 是人和鼠的 1/3^[2]。鸡含有 38 对常染色体和 1 对性染色体(Z 和 W), 其中小染色体的数量较多(28 对, GGA 11~38), 并且鸡小染色体的基因密度和重组率很高^[1]。鸡的端粒是目前脊椎动物中所发现的最大

的端粒, 其大小是人和其它哺乳动物的 10 倍^[3]。近年来鸡的端粒和端粒酶研究引起了许多科学家的注意。从目前研究结果来看, 鸡和人的端粒生物学十分相近, 它们的大多数体细胞会随着细胞分裂而出现端粒酶活性下降和端粒缩短; 同时, 鸡的端粒和端粒酶还有许多独特之处。文章综述了近年来鸡端粒生物学的研究进展, 并提出了未来的研究方向。

收稿日期: 2011-04-13; 修回日期: 2011-06-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30972086)和国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(编号: 2009CB941604)资助

作者简介: 王伟, 博士研究生, 研究方向: 动物分子遗传。Tel: 13069703334; E-mail: nightelf@yeah.net

通讯作者: 王宁, 博士, 教授, 研究方向: 动物分子遗传。E-mail: ningwang2001@yahoo.com

网络出版时间: 2011-10-18 15:34:52

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20111018.1534.008.html>

1 鸡的端粒

端粒是真核生物线性染色体末端的核蛋白“帽子”结构,能够保护染色体不被核酸酶降解,防止染色体末端相互融合。随着体细胞的不断分裂,端粒会逐渐缩短,当端粒长度缩短到一定程度,将会激活 ATM 和 ATR 介导的 DNA 损伤应答途径,引起细胞的衰老或死亡^[4]。

1.1 端粒 DNA 序列及结构

鸡的端粒由富含鸟嘌呤的六碱基串联重复序列 (TTAGGG)_n 组成,该重复序列在进化上十分保守。研究表明,人、鼠和鸡的端粒都可以形成具有特定构象的 T-loop 结构^[5-7],即由富 G 链的 3' 悬突向回弯折,取代端粒上游区域中的一段同源序列,形成闭合的染色体环,称为 T-loop,被取代的单链端粒序列形成 D-loop。T-loop 结构可以保护端粒的末端不被细胞 DNA 损伤修复途径所识别^[5]。

1.2 端粒长度的不均一性

鸡的端粒长度具有不均一性。2000 年,Delany 等^[3]研究了 18 种鸟类(包括亚种)端粒序列的结构,发现其中大多数鸟类(除了两种猛禽:北方苍鹰和美洲白头鹰,仅含有 4 对小染色体,端粒长度 < 100 kb)都含有非常长的端粒序列(端粒长度 > 200 kb)。2002 年,Nanda 等^[8]利用荧光原位杂交(FISH)技术研究了 16 种鸟类(包括鸡)的端粒重复序列在染色体中的分

布,发现有多种鸟类(尤其是平胸鸟类)的基因组除了含有典型的染色体末端端粒外,在大染色体内和着丝粒区域也含有 (TTAGGG)_n 重复,并且与大染色体相比,大多数鸟类的小染色体末端的端粒信号密度极高,说明这些小染色体含有很长的端粒。Delany 等^[3]将鸟类的端粒根据大小和位置的不同分成 3 类(图 1),第一类是染色体内的端粒序列,长度在 0.5~10 kb,这类端粒对 Bal 31 核酸外切酶不敏感,细胞分裂过程中不会发生缩短,种间高度可变,暗示鸟类在进化过程中存在染色体的融合和重排^[8];第二类是位于染色体末端的端粒序列,长度范围在 10~40 kb, Southern blotting 分析表现出端粒特有的“模糊”带型,并且随着细胞的分裂端粒会发生缩短;第三类称为巨型端粒,同样是染色体末端的端粒序列,长度在 200 kb~4 Mb,对 Bal 31 核酸外切酶敏感, Southern blotting 分析表现出分离的带型(即不连续的带型)^[3,9-11]。与鸡的端粒相比,人类的端粒长度为 10~15 kb,小鼠的端粒长度为 30~200 kb^[12,13]。

鸡的巨型端粒已通过 Southern blotting 和 FISH 的方法得到了验证^[3,8-11]。Delany 等^[9]以 UCD 001(红色原鸡近交系, F>0.9)、UCD 003(单冠白来航鸡高度近交系, F>0.99)以及 ADOL Line 0(单冠白来航鸡闭锁群体)为材料,利用双色荧光原位杂交的方法研究了不同遗传系间鸡端粒序列的分布(图 1),发现在这 3 个品系中染色体内端粒序列的位置都相同,均位于 GGA 1(p, q)、GGA 2(q)、GGA 3(q)和 GGA W(q)上。杂交分析显示这 3 个遗传系所共有的巨型端粒

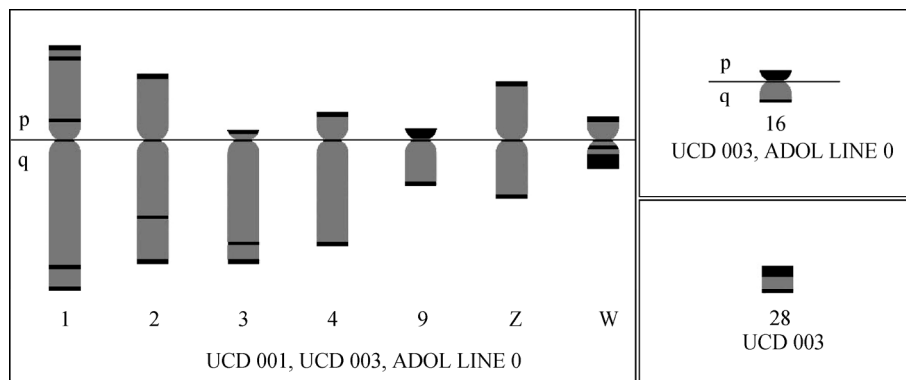


图 1 鸡染色体的端粒序列图谱^[14]

鸡的 3 个品系中染色体内端粒均位于 GGA 1(3 段序列)、GGA 2、GGA 3 和 GGA W 上,巨型端粒位于 GGA 9p 和 GGA Wq 上,而 GGA 16p 和 GGA 28 上的巨型端粒只在部分品系中出现。图中 GGA 1~4 为大染色体, GGA 9 为中型染色体, GGA 16 和 28 为小染色体, GGA Z 和 W 为性染色体;灰色:染色体 DNA;黑色:端粒序列。

序列位于 GGA 9(p)和 W(q)性染色体上,其中 W 染色体上的巨型端粒最大(UCD 001 为 4 Mb, UCD 003 为 2.8 Mb),并且只存在于雌性个体。位于 GGA 16p

和 GGA 28(着丝粒位置不确定)的巨型端粒只在部分品系中出现。值得注意的是,这些巨型端粒均位于中小染色体上,而与大染色体无关,并且均是在染

染色体的一端出现巨型端粒, 而另一端含有正常大小的端粒。鸡基因组端粒的这种有差异的分布与排列究竟是怎样产生? 又是如何维持的? 仍有待进一步研究。

O'Hare 和 Delany^[10]比较了鸡的正常细胞(来自 UCD 001、ADOL Line 0)、永生化细胞(DF-1)和转化细胞(DT40)间的端粒差异。发现这 4 种不同遗传背景的细胞中, 巨型端粒的数量和分布以及全部端粒序列在基因组中所占比例都存在显著差异。有趣的是, 基因组中端粒序列最多的是 DF-1 细胞, 占基因组序列的 17%, 与之相比, UCD 001 鸡占 5%, DT40 细胞占 1.2%, 而人类的端粒序列仅占人基因组的 0.3%。究竟是什么原因导致鸡的端粒序列数量和差异如此之大目前还不清楚, 推测这可能与鸡的基因组重组形式以及端粒酶活性有关。

巨型端粒的长度和分布在不同种类、不同个体(甚至在鸡高度近交的家系中)、不同基因型的鸟类间是高度可变的^[3, 9~11]。Rodrigue 等^[11]的遗传研究显示, 在鸡近交系的同胞之间, 巨型端粒表现出高度变异和不均一性, 并且遵循非孟德尔式的分离。一些亲代的巨型端粒在后代中消失, 而后代常常会产生新的端粒序列。这一现象在实验小鼠中有过报道, 暗示着鸡有很高的重组率, 并且在端粒处可能发生姐妹染色单体的互换^[9, 11, 15]。

1.3 端粒保护蛋白

端粒是真核细胞染色质中区别于核小体的又一种 DNA-蛋白质复合体, 端粒的长度、结构及功能受到蛋白网络的精细调控。端粒 DNA 与端粒保护蛋白形成核蛋白复合体结构, 其核心部分被称为 Shelterin, 它包括能够识别端粒重复序列的蛋白 TRF1、TRF2 和 POT1, 以及不直接结合端粒 DNA 的蛋白 TIN2、TPP1 和 RAP1^[16]。Shelterin 能够与若干 DNA 修复因子一起作用, 改变端粒 DNA 的结构, 从而保护染色体末端不被 DNA 损伤应答途径所识别^[16]。

鸡的 4 种端粒结合蛋白(TRF1、TRF2、POT1 和 RAP1)都已经被鉴定^[7, 17~19], 另外两种蛋白(TIN2 和 TPP1)目前尚未被鉴定。鸡与人的 TRF1 蛋白相似性仅为 46%, 却具有同样的结构域^[17]。鸟类与哺乳动物的 TRF2 蛋白在二聚化(dimerisation)结构域和 Myb-type DNA 结合区域高度保守。ORF 预测显示, 鸡的 TRF2 比人增加一段氨基酸序列, 但鸡与人 TRF2 蛋白的功能非常保守^[18]。鸡和人的 RAP1 相似性只有 36%, 但都含有保守的 BRCA1、Myb 和 Rap 结构域, 并且鸡 RAP1 蛋白同样能够与 TRF2 结合并作用于端粒^[19]。POT1 是一种单链 DNA 结合蛋白, 鸡的 POT1 能够在 T-loop 形成时出现在端粒处, 保护 G 链悬突和 T-loop 结构^[7]。Tankyrase 是高度保守

的蛋白, 鸡的 Tankyrase1 和 Tankyrase2 都已被鉴定, 并且都能够作用于 TRF1^[17]。另外, 其他一些与端粒有关的蛋白, 包括 DNA 修复因子如复制蛋白 A(RPA)、Rad54、Rad51 类似物及 BRCA1, 所有这些蛋白都已在鸡中被发现, 并且都可以作用于端粒^[20~23]。

Swanberg 和 Delany^[24]采用实时定量 PCR 的方法检测了家鸡的多能原肠胚细胞、分化的鸡胚成纤维细胞(Chicken embryo fibroblasts, CEFs)和转化的 DT40 细胞中 4 种端粒结合蛋白基因(*TRF1*、*TRF2*、*tankyrase1* 和 *tankyrase2*)以及 *c-myc*、*chTERT* 和 *chTR* 的表达水平, 研究发现这 7 个基因在 DT40 和大部分原肠胚细胞(端粒酶阳性细胞)中的表达量均高于 CEFs 细胞(端粒酶阴性细胞)。在 CEFs 中 *TRF1* 表达量下降而 *TRF2* 表达量不变, 并且随着细胞的老化, *TRF2:TRF1* 的比率显著增加。在 DT40 中 *tankyrase2* (*tankyrase2* 蛋白能够与 TRF1 结合)的表达量比在大部分 CEFs 和原肠胚细胞中高。这些结果提示, 端粒结合蛋白的表达差异与细胞的增殖潜力有关。

2 鸡的端粒酶

端粒酶是一种 RNA 依赖的 DNA 聚合酶, 它的核心部分由端粒酶逆转录酶(Telomerase reverse transcriptase, TERT)、端粒酶 RNA(Telomerase RNA, TR)及相关蛋白组成。TERT 具有逆转录酶的功能, 它能利用 TR 作为模板, 在端粒的 3'单链末端催化添加 TTAGGG 重复序列, 使端粒的长度和结构得以稳定。此外, 端粒酶还参与细胞的生长、凋亡和 DNA 损伤应答等。

2.1 端粒酶活性

鸡和人的端粒酶活性一样, 均在胚胎发育的早期出现, 在需要多次分裂的更新组织和干细胞中端粒酶维持较高活性, 在胚胎发育后期绝大多数体细胞中端粒酶活性下降, 直至消失^[25~30]。鸡和人的大多数肿瘤细胞和转化细胞具有较高的端粒酶活性, 说明端粒酶是正常细胞转变为肿瘤细胞的关键物质^[24, 26, 27, 31]。与人和鸡不同, 小鼠在一生中的各个阶段均表达端粒酶活性, 并且小鼠比人和鸡更易于形成肿瘤^[32]。

鸡的体细胞随着分裂次数的增加, 端粒的长度会不断缩短^[29, 33]。对鸡的红细胞(体细胞)和精子细胞(生殖细胞)端粒长度的比较发现, 鸡的端粒在每次细胞分裂中至少缩短 160 bp^[3]。体外研究表明, 鸡的非永生化、非转化的细胞随着细胞分裂, 也会发生端粒缩短^[27, 28, 34]。这与人类细胞一致^[35]。而通常情况下小鼠和其他一些啮齿类动物不会出现与衰老或分裂相关的端粒缩短(*TR*^{-/-}小鼠除外)^[32, 36]。人、小鼠和鸡的端粒生物学比较分析见表 1。

2.2 端粒酶逆转录酶及剪接变体

2.2.1 *chTERT* 的结构特点

鸡的端粒酶逆转录酶(*chTERT*)的 mRNA 全长 4

表 1 人、小鼠和鸡的端粒生物学的比较分析

	人类	小鼠	鸡
端粒缩短	是	否(<i>TR</i> ^{-/-} 是)	是
胚胎细胞端粒酶活性	是	是	是
生殖细胞端粒酶活性	是	是	是
体细胞端粒酶活性	否	是	否
转化细胞端粒酶活性	是	是	是
染色体末端端粒长度	10~15 kb	30~200 kb	8 kb~4 Mb
体细胞 <i>TERT</i> 的表达	否	是	—
体细胞 <i>TR</i> 的表达	是	是	—

注：“—”表示不同的体细胞表达情况不一致。

497 bp, 位于 2q21 染色体带上, 编码一个含 1 346 个氨基酸残基的蛋白质。脊椎动物 *TERT* 蛋白含有一些高度保守的区域, 包括 v-I、v-II、v-III、v-IV、1、2、A、B'、C、D 和 E, 以及端粒特有的“T”基序^[37, 38](图 2)。chTERT 蛋白与人(human *TERT*, hTERT)和鼠(mouse *TERT*, mTERT)相比, 相似性只有 45%和 41%, 但是 chTERT 含有所有这些基序, 它们分别位于: v-I(1~196), v-II(495~531), v-III(554~588), v-IV

(625~753), T 基序(756~803), 1 基序(814~838), 2 基序(839~870), A 基序(915~950), B'基序(1038~1072), C 基序(1078~1094), D 基序(1095~1120)和 E 基序(1139~1149)。不同的是, chTERT 蛋白在 v-I 区中包含 15 个额外的氨基酸残基, 在 v-IV 区中包含 27 个额外的氨基酸残基, 以及拥有一个更长的 N 末端柔性连接序列(含有 298 个氨基酸残基, 比人类长 144 个氨基酸残基)(图 2)。而 C-末端的反转录酶基序(RT 基序)以及下游区域却是非常保守的。除了保守的编码区外, *chTERT* 基因的 5'侧翼区-259 bp 至+727 bp 处含有一个 CpG 岛, 在-938 bp 的 5'侧翼区至+125 bp 的编码区序列内共含有约 80 个转录因子结合位点。鸡和人 *TERT* 基因的 5'侧翼区含有许多相同的转录因子结合位点, 如 Sp1、MAZ/Sp-1、E-box、Ik1、NF-1 和 AP-1 等结合位点, 不同的是 *chTERT* 的 5'侧翼区不含有 c-Ets2 和 WT1 结合位点, 但是却含有 4 个 c-Myb 结合位点^[39]。

2.2.2 *chTERT* 的剪接变体

鸡与人一样, 可以通过多种机制来调节 *TERT* 的活性, 其中之一就是 *TERT* 的选择性拼接^[40, 41]。Chang 等^[40]鉴定了鸡的原肠胚、7.5 天胚胎和 2 岁成体肝脏组织以及 CEFs 和 DT40 细胞系中 *chTERT* 的剪接变体形式, 发现 *chTERT* 的重要功能区域: 端粒酶特异性基序(T)和反转录酶基序(RT)中含有 19 种

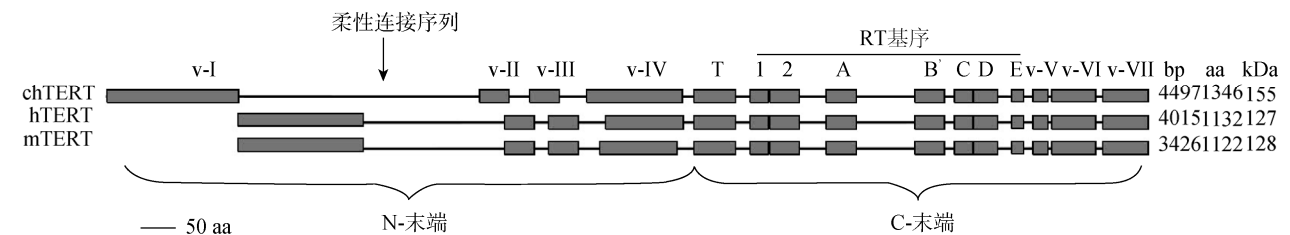


图 2 鸡、人和鼠 *TERT* 蛋白基序的相对位置和大小

不同的剪接变体, 其中有 3 种变体可以导致移码突变, 其他一些则造成编码提前终止(表 2)。这些剪接变体是通过外显子跳跃、内含子保留、拼接供体和受体位点的交替变化而产生的。一些变体与 *hTERT* 变体相似但不完全相同, 如 *chTERT* 的外显子 5 缺失(V4)造成 A 基序的断裂, 与人类的 α 变体相似, 以及外显子 8 缺失(V9、11、12、13 和 14)造成 B'基序的断裂, 这与人类的 β 变体相似^[40]。有 6 种变体(V2、3、5、14、15 和 18)是一些组织或细胞样本中所特有的, V4 变体在所有的样本中均被发现, 并可以产生一个缺少端粒酶催化活性的截短蛋白^[40]。有趣的是, 全长 *chTERT* 的表达不仅存在于端粒酶阳性样品还存在于端粒酶阴性样品^[40]。上述结果说明 *chTERT* 的 mRNA 前体存在相当复杂的剪接形式。

表 2 *chTERT* 重要功能区域的剪接变体

功能区	变体形式
v-IV	V1(插入), V3(缺失、提前终止编码)
T	V2(插入, 提前终止编码), V3(缺失, 提前终止编码)
2	V4(缺失), V5(缺失)
A	V4(缺失)
IFD	V6~V14(多种插入, 缺失, 提前终止编码)
B'	V9(缺失), V11~V14(多种插入, 缺失, 提前终止编码)
C	V15(插入, 提前终止编码), V16(多种插入, 提前终止编码)
D	V17~V19(多种插入, 提前终止编码)

注: IFD 指 *TERT* 的指状结构域插入突变^[42]。

2.3 端粒酶 RNA

鸡的端粒酶 RNA(chTR)是一段长度为 465 bp 的非编码 RNA, 是构成端粒酶活性的重要组分。*chTR* 基因是一个单拷贝基因, 基因座全长 3 763 bp, 包括 5'侧翼区 604 bp、*chTR* 编码区序列 465 bp 和 3'侧翼区 2 694 bp^[43]。*chTR* 定位于 9 号染色体的 q 臂上^[43]。尽管脊椎动物的 TR 在大小和序列上差异很大, 但是却都能折叠成一个相似的二级结构, 鸡的 TR 也不例外, 暗示 TR 序列二级结构的保守性对于功能是非常重要的。

比较 35 种脊椎动物(包括鸡)的 TR 序列显示, 脊椎动物的 TR 存在 8 个高度保守的区域, 按照 5'到 3'的顺序依次表示为 CR1~CR8, 它们具有 90% 以上的相似性, 这 8 个保守区域将 TR 分成了 3 个主要的结构域: Pseudoknot/Template 结构域, CR4/CR5 结构域和 ScaRNA 结构域^[44, 45]。Pseudoknot/Template 结构域包括 CR1、CR2 和 CR3, 是端粒酶活性所必须的。Template 结构域(CR1)含有添加端粒重复的模板序列 5'-CUAACCCU-3'^[45], 其 3'末端的两个碱基对(CU), 起到将模板序列对齐到它的互补 DNA 链上的作用^[45, 46]。研究表明脊椎动物的 TR 能够形成二聚体结构, 该结构可以使端粒酶持续的合成端粒^[47]。Pseudoknot 结构域(CR2/CR3)与 TR 的二聚体形成有关, 并且 Pseudoknot 结构域还参与构成了 TR 与 TERT 相互作用的第一个结合位点, Pseudoknot 区域的突变会导致端粒酶持续合成能力的减少或丧失^[47, 48]。鸡马立克氏病毒(Marek's disease virus, MDV)是一种能够编码端粒酶 RNA(virus TR, vTR)的鸟类疱疹病毒, 该病毒编码的 vTR 与 chTR 的同源性高达 88%, vTR 的 8 个保守序列中只有 Pseudoknot 区域的 P2-helix 和 P3-helix 存在碱基差异, 这些差异导致 vTR 与 chTERT 结合更加稳固, 从而使得 vTR 合成端粒的效率是 chTR 的 6 倍^[44]。CR4/CR5 结构域构成了 TR 和 TERT 作用的第 2 个结合位点^[47]。ScaRNA 结构域包括 H/ACA Box(CR6-CR8)和 CR7, 该结构域与 TR 在细胞核中的定位、TR 的 3'末端加工以及在细胞内的稳定性有关^[49, 50]。MDV 病毒疫苗株的 H-Box 3'末端存在一个单核苷酸替换, 该突变导致细胞核中 vTR 含量下降, 细胞端粒酶活性降低^[44]。

鸡和人 TR 基因的 5'调控区均含有 SP1、GR、c-myc、ER 和 CCAAT 等转录因子结合位点, 并且这些结合位点的相对位置十分近似, 但是鸡拥有比人更多数量的 Sp1、ER 和 CCAAT 结合位点, 尤其是 Sp1 结合位点, 其数量是人和鼠的 3 倍^[43]。

2.4 *chTERT* 和 *chTR* 的表达

人类的 TR(human TR, hTR)在大多数细胞中广泛而持续的表达^[38, 51], 而 *hTERT* 在大多数体细胞中很少表达或不表达, 因此 *hTERT* 是人端粒酶活性的限速成分^[52]。小鼠的 *mTERT* 和 *mTR*(mouse TR)在生长和发育的各个阶段均有表达。O'Hare 和 Delany^[53]检测了鸡胚(E0~E19 天)和 24 月龄成熟个体 *chTERT* 和 *chTR* 的表达水平, 结果表明在早期胚胎时期(E0、E1 天)*chTERT* 和 *chTR* 的表达水平非常高, 在胚胎发育至成体的过程中, 端粒酶活性保持阳性的组织(肠、脾和性腺)*chTERT* 和 *chTR* 的表达水平通常上调, 并存在组织特异性差异, 而端粒酶活性转变成阴性的组织(脑、心和肝)其 *chTR* 的表达下调而 *chTERT* 的表达不变或上调, 这些结果说明 *chTERT* 和 *chTR* 的表达模式与发育过程中端粒酶的活性有关, 并且暗示 *chTR* 有可能是端粒酶活性的重要调节组分。另一项研究检测了鸡的胚胎干细胞(chES)、CEFs 和 DT40 细胞系中 *chTERT* 和 *chTR* 基因的表达, 结果表明在端粒酶阳性的 chES 细胞中 *chTERT* 和 *chTR* 均有较高表达, 在端粒酶阴性的 CEFs 细胞中 *chTERT* 和 *chTR* 几乎无表达, 而在端粒酶阳性的 DT40 细胞中 *chTERT* 和 *chTR* 的表达水平最高^[28], 这同样提示 *chTERT* 和 *chTR* 的表达模式与细胞的端粒酶活性有关。

2.5 端粒酶活性重建

通过导入或激活细胞端粒酶活性的限制因子(如人类的 *hTERT*), 可以重建细胞的端粒酶活性, 并可以使多种类型的细胞越过衰老而获得无限增殖的能力, 端粒酶活性重建是建立永生化细胞的重要方法之一。目前, 人类细胞的端粒酶活性重建已取得了成功^[54], *hTERT* 已广泛用于哺乳动物细胞的永生化。人类在端粒酶缺失的小鼠体内和体外细胞系中也重建了端粒酶活性^[36, 55]。最新研究表明, 在端粒酶缺失的衰老小鼠体内重新激活端粒酶活性, 可以使多种组织退化逆转, 并去除衰老表型^[55]。

2003 年, Fragnet 等^[56]的研究表明, *mTR*、*hTR*、*vTR* 或 *chTR* 可以重建 TR 基因敲除小鼠的端粒酶活性。2005 年, Fragnet 等^[44]报道了在兔的织网红细胞裂解物系统中加入 *chTERT* 和 *chTR*(或 *vTR*)可以重建鸡的端粒酶活性。然而将 *hTERT* 转染到鸡的 CEFs 细胞中时, 细胞虽然表达 *hTERT* 基因, 但是却不会产生有活性的端粒酶^[57], 说明鸡作为非哺乳动物, 鸡的端粒酶具有种属特异性。研究发现在鸡端粒酶阴性细胞中 *chTR* 的表达水平很低或不表达, 提示 *chTR* 也许是端粒酶活性的重要组分^[53]。为了验证这

一点, Robb 和 Delany 构建了多种 *chTR* 的表达载体(运用多种启动子的载体, 包括或不包括 *chTR* 的潜在调控区), 转染端粒酶阴性的 CEFs 细胞。结果发现, 大多数情况下, 在转染后的 48 小时内可以检测到 *chTR* 的表达, 并伴随着内源 *chTERT* 的表达。但是在这些转染的 CEFs 细胞中端粒酶活性并没有像阳性对照(DT40 和 HeLa 细胞提取物)那样持续存在。这一结果提示, CEFs 细胞中可能缺少某些端粒保护蛋白的支持。总之, 尽管鸡的端粒酶活性重建取得了一定进展, 但是目前尚未见到利用 *chTR* 和 *chTERT* 建立鸡的永生化细胞的报道, 这一问题仍有待进一步探索和研究。

3 结语与展望

人类对鸡的端粒结构、功能、进化及端粒酶活性等都有了较深入的了解。从目前研究的结果来看, 鸡与人端粒的生物学特性十分相似, 使得鸡成为了研究端粒生物学的极好模型。开展鸡端粒的深入研究将有助于人类探索衰老和癌症的发生机制、开发构建人工染色体、建立鸡的永生化细胞系等。同时, 鸡的端粒生物学也是鸡基因组学研究的重要一环, 鸡端粒的高变异和不均一性等特性的研究对于揭示鸡基因组的结构、功能以及进化具有重要意义。

尽管鸡的端粒生物学研究已取得了很大进展, 但仍存在一些亟待解决的问题: (1)鸡巨型端粒如何进化产生的, 它为什么只存在于小染色体上; (2)同一条染色体是如何维持两种类型的端粒的; (3)鸡染色体端粒的高重组率有何生物学意义; (4)鸡细胞端粒酶活性的关键因素是什么; (5)鸡端粒酶活性的分子调控等。这些问题都将是未来鸡端粒生物学研究的重要方向。鸡端粒生物学的研究开启了鸟类端粒生物学领域的大门, 相信随着研究的不断深入, 鸟类的端粒生物学将被完整地阐明, 这将为人类最终阐明衰老和癌症等疾病的发生机制奠定坚实的基础。

参考文献(References):

- [1] International Chicken Genome Sequencing Consortium (ICGSC). Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature*, 2004, 432(7018): 695-716.
- [2] Gregory TR, Nicol JA, Tamm H, Kullman B, Kullman K, Leitch IJ, Murray BG, Kapraun DF, Greilhuber J, Bennett MD. Eukaryotic genome size databases. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(S1): D332-338.
- [3] Delany ME, Krupkin AB, Miller MM. Organization of telomere sequences in birds: evidence for arrays of extreme length and for in vivo shortening. *Cytogenet Cell Genet*, 2000, 90(1-2): 139-145.
- [4] Denchi EL, de Lange T. Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature*, 2007, 448(7157): 1068-1071.
- [5] Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*, 1999, 97(4): 503-514.
- [6] Nikitina T, Woodcock CL. Closed chromatin loops at the ends of chromosomes. *J Cell Biol*, 2004, 166(2): 161-165.
- [7] Wei C, Price CM. Cell cycle localization, dimerization, and binding domain architecture of the telomere protein cPot1. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(5): 2091-2102.
- [8] Nanda I, Schrama D, Feichtinger W, Haaf T, Scharl M, Schmid M. Distribution of telomeric (TTAGGG)(n) sequences in avian chromosomes. *Chromosoma*, 2002, 111(4): 215-227.
- [9] Delany ME, Gessaro TM, Rodrigue KL, Daniels LM. Chromosomal mapping of chicken mega-telomere arrays to GGA9, 16, 28 and W using a cytogenomic approach. *Cytogenet Genome Res*, 2007, 117(1-4): 54-63.
- [10] O'Hare TH, Delany ME. Genetic variation exists for telomeric array organization within and among the genomes of normal, immortalized, and transformed chicken systems. *Chromosome Res*, 2009, 17(8): 947-964.
- [11] Rodrigue KL, May BP, Famula TR, Delany ME. Meiotic instability of chicken ultra-long telomeres and mapping of a 2.8 megabase array to the W-sex chromosome. *Chromosome Res*, 2005, 13(6): 581-591.
- [12] de Lange T, Shiue L, Myers RM, Cox DR, Naylor SL, Killery AM, Varmus HE. Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol*, 1990, 10(2): 518-527.
- [13] Kipling D, Cooke HJ. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature*, 1990, 347(6291): 400-402.
- [14] Swanberg SE, O'Hare TH, Robb EA, Robinson CM, Chang H, Delany ME. Telomere biology of the chicken: a model for aging research. *Exp Gerontol*, 2010, 45(9): 647-654.
- [15] Starling JA, Maule J, Hastie ND, Allshire RC. Extensive telomere repeat arrays in mouse are hypervariable. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(23): 6881-6888.
- [16] de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev*, 2005, 19(18): 2100-2110.
- [17] De Rycker M, Venkatesan RN, Wei C, Price CM. Vertebrate tankyrase domain structure and sterile alpha motif (SAM)-mediated multimerization. *Biochem J*, 2003, 372(Pt 1): 87-96.
- [18] Konrad JP, Mills W, Easty DJ, Farr CJ. Cloning and characterisation of the chicken gene encoding the telomeric protein TRF2. *Gene*, 1999, 239(1): 81-90.
- [19] Tan M, Wei C, Price CM. The telomeric protein Rap1 is

- conserved in vertebrates and is expressed from a bidirectional promoter positioned between the Rap1 and KARS genes. *Gene*, 2003, 323: 1–10.
- [20] Bezzubova O, Shinohara A, Mueller RG, Ogawa H, Buerstedde JM. A chicken RAD51 homologue is expressed at high levels in lymphoid and reproductive organs. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21(7): 1577–1580.
- [21] De Boeck G, Forsyth RG, Praet M, Hogendoorn PCW. Telomere-associated proteins: cross-talk between telomere maintenance and telomere-lengthening mechanisms. *J Pathol*, 2009, 217(3): 327–344.
- [22] Orelli BJ, Logsdon -Jr JM, Jr., Bishop DK. Nine novel conserved motifs in BRCA1 identified by the chicken orthologue. *Oncogene*, 2001, 20(32): 4433–4438.
- [23] Salas TR, Petruseva I, Lavrik O, Bourdoncle A, Mergny JL, Favre A, Saintomé C. Human replication protein A unfolds telomeric G-quadruplexes. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(17): 4857–4865.
- [24] Swanberg SE, Delany ME. Differential expression of genes associated with telomere length homeostasis and oncogenesis in an avian model. *Mech Ageing Dev*, 2005, 126(10): 1060–1070.
- [25] Forsyth NR, Wright WE, Shay JW. Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation*, 2002, 69(4–5): 188–197.
- [26] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 1994, 266(5193): 2011–2015.
- [27] Swanberg SE, Delany ME. Dynamics of telomere erosion in transformed and non-transformed avian cells in vitro. *Cytogenet Genome Res*, 2003, 102(1–4): 318–325.
- [28] Swanberg SE, Payne WS, Hunt HD, Dodgson JB, Delany ME. Telomerase activity and differential expression of telomerase genes and c-myc in chicken cells in vitro. *Dev Dyn*, 2004, 231(1): 14–21.
- [29] Taylor HA, Delany ME. Ontogeny of telomerase in chicken: impact of downregulation on pre- and postnatal telomere length *in vivo*. *Dev Growth Differ*, 2000, 42(6): 613–621.
- [30] Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet*, 1996, 18(2): 173–179.
- [31] Rhyu MS. Telomeres, telomerase, and immortality. *J Natl Cancer Inst*, 1995, 87(12): 884–894.
- [32] Wright WE, Shay JW. Telomere dynamics in cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology. *Nat Med*, 2000, 6(8): 849–851.
- [33] Delany ME, Daniels LM, Swanberg SE, Taylor HA. Telomeres in the chicken: genome stability and chromosome ends. *Poult Sci*, 2003, 82(6): 917–926.
- [34] Venkatesan RN, Price C. Telomerase expression in chickens: constitutive activity in somatic tissues and down-regulation in culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(25): 14763–14768.
- [35] Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 1990, 345(6274): 458–460.
- [36] Samper E, Flores JM, Blasco MA. Restoration of telomerase activity rescues chromosomal instability and premature aging in *Terc*^{-/-} mice with short telomeres. *EMBO Rep*, 2001, 2(9): 800–807.
- [37] Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science*, 1997, 276(5312): 561–567.
- [38] Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, Harley CB, Cech TR. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science*, 1997, 277(5328): 955–959.
- [39] Delany ME, Daniels LM. The chicken telomerase reverse transcriptase (chTERT): molecular and cytogenetic characterization with a comparative analysis. *Gene*, 2004, 339: 61–69.
- [40] Chang H, Delany ME. Complicated RNA splicing of chicken telomerase reverse transcriptase revealed by profiling cells both positive and negative for telomerase activity. *Gene*, 2006, 379: 33–39.
- [41] Kilian A, Bowtell DD, Abud HE, Hime GR, Venter DJ, Keese PK, Duncan EL, Reddel RR, Jefferson RA. Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Hum Mol Genet*, 1997, 6(12): 2011–2019.
- [42] Lue NF, Lin YC, Mian IS. A conserved telomerase motif within the catalytic domain of telomerase reverse transcriptase is specifically required for repeat addition processivity. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(23): 8440–8449.
- [43] Delany ME, Daniels LM. The chicken telomerase RNA gene: conservation of sequence, regulatory elements and synteny among viral, avian and mammalian genomes. *Cytogenet Genome Res*, 2003, 102(1–4): 309–317.
- [44] Fagnat L, Kut E, Rasschaert D. Comparative functional study of the viral telomerase RNA based on natural mutations. *J Biol Chem*, 2005, 280(25): 23502–23515.
- [45] Chen JL, Blasco MA, Greider CW. Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell*, 2000, 100(5): 503–514.
- [46] Gavory G, Farrow M, Balasubramanian S. Minimum length requirement of the alignment domain of human telomerase RNA to sustain catalytic activity *in vitro*. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(20): 4470–4480.

- [47] Moriarty TJ, Marie-Egyptienne DT, Autexier C. Functional organization of repeat addition processivity and DNA synthesis determinants in the human telomerase multimer. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(9): 3720–3733.
- [48] Bachand F, Autexier C. Functional regions of human telomerase reverse transcriptase and human telomerase RNA required for telomerase activity and RNA-protein interactions. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(5): 1888–1897.
- [49] 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): 1833–1844.
- [50] Narayanan A, Lukowiak A, Jady BE, Dragon F, Kiss T, Terns RM, Terns MP. Nucleolar localization signals of box H/ACA small nucleolar RNAs. *EMBO J*, 1999, 18(18): 5120–5130.
- [51] Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, Ziaugra L, Beijersbergen RL, Davidoff MJ, Liu QY, Bacchetti S, Haber DA, Weinberg RA. *hEST2*, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell*, 1997, 90(4): 785–795.
- [52] Liu L, Lai S, Andrews LG, Tollefsbol TO. Genetic and epigenetic modulation of telomerase activity in development and disease. *Gene*, 2004, 340(1): 1–10.
- [53] O'Hare TH, Delany ME. Telomerase gene expression in the chicken: telomerase RNA (TR) and reverse transcriptase (TERT) transcript profiles are tissue-specific and correlated with telomerase activity. *AGE*, 2005, 27(4): 257–266.
- [54] Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, 1998, 279(5349): 349–352.
- [55] Jaskelioff M, Muller FL, Paik JH, Thomas E, Jiang S, Adams AC, Sahin E, Kost-Alimova M, Protopopov A, Cadinanos J, Horner JW, Maratos-Flier E, Depinho RA. Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. *Nature*, 2011, 469(7328): 102–106.
- [56] Fragnet L, Blasco MA, Klapper W, Rasschaert D. The RNA subunit of telomerase is encoded by Marek's disease virus. *J Virol*, 2003, 77(10): 5985–5996.
- [57] Michailidis G, Saretzki G, Hall J. Endogenous and ectopic expression of telomere regulating genes in chicken embryonic fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 335(1): 240–246.