维普资讯 http://www.cqvip.com

2. Lynch DH, Ramsdell F, Alderson MR, Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. Immunol Today, 1995, 16(12): 569 - 574.
3. Abbas AK, Die and let live: eliminating dangerous lymphocytes. Cell, 1996, 84: 655 - 657.
4. 袁红, Fas/FasL 与细胞凋亡研究进展。国外医学,生理病理科学与临床分册, 2000, 20(1): 26 - 26.
5. Oyaizu N, Adachi Y, Hashimoto F, et al. Moncoytes express Fas ligand upon CD_4 cross - lingking and induce CD_4 + T cells apoptosis. J Immunol, 1997: 158(5): 2456 - 2463.
6. Suda T, Tanaka M, Miwa K, et al. Apoptosis of mouse naive T cells induced by recombinant solubie Fas ligand and activation - induced resistance to Fas ligand. J Immunol, 1996, 157(4): 3918 - 3924.
7. Epperly MVV, Bray JA, Carlos TM, et al. Biology of marrow stromal cell lines devired from long - term bone marrow cultures of Trp53 - dericient mice. Radiat Res, 1999, 152(1): 29 - 40.
8. Mudry RE, Fortney JE, York T, et al. stromal cells regulate survival of B - lineage leukemic cells during chemotherapy. Blood, 2000, 96(5): 1926 - 1932.
9. Van der Velde - Zimmerman D, Smits AJ, Verdaasdonk MA, et al. Betal - interrins dominate cell traffic of leukemic cells in human bone - marrow stroma. Int J Cancer. 1996, 66(2): 225 - 233.
10. Hewson J, Bianchi A, Bradstock K, et al. Ultrastructural changes during adhesion and migration of pre B lymphoid leukemia cells within bone marrow stroma. Br J Haematol, 1996, 92(1): 77 - 87.
11. Taylor ST, Hickman JA, Dive C, et al. Epigenetic dederminants of resistance to etoposide regulation of Bcl - X(L) and Bax by tumor microenvironmental factors. J Natl Cancer Inst, 2000, 92(1): 18 - 23.
12. Lagneaux L, Ddlforge A, Bruyn DC, et al. Adhesion to bone marrow stroma inhibits apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells. Leuk Lymphoma, 1999, 35(5 - 6): 445 - 453.
13. Ghia P, Caligaris CF, The indispensable role of microenvironment in the natural history of low grade B cell neoplasms. Adv Cancer Res, 2000, 79(4): 157 - 173. 14. Grigorieva I, Thomas X, Epstein J, The bone marrow stromal environment is a major factor in myeloma cell resistance to dexamethasone. Exp Haematol, 1998, 26(7): 597 - 603.
15. Panayiotidis P, Jones D, Ganeshaguru K, et al. Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukemia cells in vitro. Br J Haematol, 1996, 92(1): 97 - 103.

(收稿日期: 2002 - 11 - 10)

Cdc13p 在染色体末端保护的端粒复制中的作用

陈 曦* 常 娟* 周建新**

端粒是染色体末端的 DNA - 蛋白结构复合体,是染色体末端稳定和细胞永生化的重要结构基础。端粒单链突出部在其中占有重要作用,不但是形成端粒末端特殊结构 T - 环的关键部分,而且提供端粒酶复制的底物。单链结合蛋白 Cdc13p 是形成端粒末端保护帽和征集端粒酶的重要分子,本文综述 Cdc13p 在端粒中的作用机制。

酵母的端粒包含约有 350bp 的 C(1 - 3)ATG(1 - 3),其中大部分通过常规半保留复制来合成,在常规复制后,C(1 - 3)A 链被降解,产生一条长的 TG(1 - 3)单链[1]。也有人认为先导链被充分合成时,后随链的合成却逐渐停止,3'突出部余出约 500bp 核苷酸[2]。

Cdc13p 是一种 TG(1 - 3)单链结合蛋白,在体内局限分布于端粒。遗传信息(genetic data)提示 Cdc13p 在端粒复制中有多重角色。Qi. 等用二重杂交法,证实 Cdc13p 与(聚合酶催化亚基)Pol1p,(端粒酶相关蛋白)Est1p 都有作用。因此研究 cdc13p 将有助于揭示端粒酶复杂调控机制的具体过程,指导肿瘤临床研究[1]。

一、Cdc13p 在端粒作用中的相对地位

通过对端粒结构研究发现,端粒富 G 序列能够形成一个的大的且很有规律性的鸟嘌呤四联体结构。该结构是由四条互相独立的 DNA 链构成的四聚体复合结构。目前研究结果提示端粒 DNA 的保护可能与其能够形成鸟嘌呤四联体有关。另外也发现多种端粒 DNA 结合蛋白能够促进鸟嘌呤四联体的形成。端粒酶的 RNA 模板区需要线性而且是非折叠的端粒 DNA 引物才能合成端粒并使端粒的末端延伸。因此,端粒鸟嘌呤四联体结构的存在就抑制了端粒酶活性[3]。T-环(T-loop)是通过端粒的 3'外伸部侵入端粒重复序列而形成的。并且在侵入处还形成 D-环(displacement loop),端粒重复序列结合因子 2(telomeric repeat factor 2, TRF2)就结合于此处。T - 环的基本作用机制是提供末端保护和复制端粒。相对于 TRF2 的双链保护机制[4],Cdc13p 主要保护 3'单链。

二、cdc13p 与端粒的结合特性

* 作者单位: 400038 重庆市第三军医大学学员旅五队
** 基础部生物化学教研室

维普资讯 http://www.cqvip.com

在酵母(S.cerevisiae)中,Cdc13p是一种端粒单链结合蛋白(single strand telomeric - binding protein),它的端粒结合域在第451 - 693位氨基酸,即Cdc13(451 - 693)p。用纯化的Cdc13p和Cdc13(451 - 693)p来比较它们的端粒结合活性,结果发现,它们对端粒的结合特异性相近,但Cdc13(451 - 693)p对DNA的亲和力低于Cdc13p。

在实验中发现,这两种蛋白的TG(1 - 3)结合位点,可位于3'端,5'端和寡核苷链底物的中央,所以判断出蛋白的端粒结合位点似乎对Cdc13p并不重要。进一步用DNA酶I(DN A footprint analysis)来分析寻找Cdc13p/Cdc13(451 - 693)p结合端粒DNA复合体的结构,这两种蛋白DNA对三种不同的端粒DNA底物作用alpha印迹本质上相同,表明了与端粒接触的区域限于Cdc13(451 - 693)p内。

总之,Cdc13p对端粒的特异性结合是调节端粒酶作用和端粒天然结构区别于损坏的染色体末端的重要特性[5]。

近来还发现Cdc13使用一个寡肽/寡糖粘和物(oligonucleotide/oligosaccharide binding)叠(fold)来识别端粒DNA。

三、Cdc13p的作用机制

1.酵母的Cdc13p可与DNA聚合酶alpha催化亚基(Pol1p)和端粒酶相关蛋白Est1p相互作用。

用全长或近全长蛋白生化分析(biochemical analysis using full - length or nearly full - length proteins),证实了这些蛋白的相关性,CDC13或POL1的点突变,削弱了Cdc13p与Pol1p的互相作用,导致端粒酶介导的端粒延伸。Est1p的羧端过度表达,部分抑制了突变体的温度敏感致死性。

Qi.等推论,Cdc13p与Est1相互作用,促进端粒酶介导的TG(1 - 3)链延伸,Cdc13p与Pol1p相互作用,促进聚合酶A对C(1 - 3)A链合成[1]。

2. Cdc13与酵母Ku蛋白,Stn1蛋白共同合作,调节端粒酶的征集。

酵母(S.cerevisiae)CDC13蛋白结合端粒单链DNA,Grandin.等分离出一种新突变体的CDC13,可致异常的端粒延伸或缩短。这种失控不仅依赖于端粒酶(Est2/Tcl1)和Est1(一种端粒酶直接调节因子),而且依赖于酵母Ku蛋白(yKu70/Hdf1和yKu80/Hdf2),已知涉及DNA修复和端粒维持。Cdc13 - yKu70融合表达可致端粒延伸,相似于Cdc13 - Est1,由此暗示yKu70可能推进cdc13介导的端粒酶征集。Grandin.基于STN1过度表达和Cdc13 - Stn1融和实验,证实了Stn1是Cdc13介导的端粒酶征集的抑制因子(inhibitor)。所以推论,Cdc13介导端粒酶征集途径的精确调节,有赖于yKu70正调控和Stn1负调控的平衡协调作用。该结果第一次证实了Cdc13p的端粒酶下载功能,是通过一种双链端粒DNA结合复合体(a double - strand telomeric DNA - binding complex)[6]。

除了在端粒静息(Telomeric silencing),同源重组和非同源末端连接(non - homologus end - joining)中的作用,S. cerevisiae Ku蛋白通过与茎环的相互作用,也辅助参与了端粒酶的征集或激活[7]。

3.cdc13端粒复制的正负调控。

cdc13 - 2突变体,消除了征集端粒酶的位点,也消除了cdc13与stn1的相互作用。

Cdc13 - 5突变体,可致端粒酶介导的端粒G链的延伸,伴C链合成的无力对等。Stn1(cdc13相关蛋白)可致后随链复制复合体的作用。Stn1增加表达,则cdc13 - 5突变体的过延伸作用可被消除。DNA聚合酶alpha突变体,也表现为端粒过延伸,同样可由于stn1增加表达而受到抑制。

Chandra.等推论,cdc13参与两道调节步骤:1. 正调控,结合端粒酶到端粒单链,2. 负调控,在重叠位点上结合负调控因子stn1,从而限制了端粒酶对G链的合成,使其与C链的合成保持一致。需要说明的是,端粒酶和stn1结合的是cdc13上的重叠位点[8]。

4.cdc13递送不同的复合体到端粒,负责末端保护和复制。

Pennock.等显示,cdc13的DNA结合域,DBD(CDC13),递送stn1蛋白到端粒与Cdc13p的融合,足以挽救致死的cdc13无效株,提供末端保护。但端粒复制仍有缺失,DBD(CDC13)融合递送端粒酶到端粒,后恢复。这些结果证实:stn1是负责末端保护的主要效应分子,端粒酶负责末端复制,cdc13的主要功能是提供下载平台,征集不同的分子复合体来保护和复制染色体末端[9]。

Cdc13不是第一个被报道的单链结合蛋白,纤毛虫棘豆属nova(ciliate oxytricha nova)中的一个异二聚体复合物,包括两个蛋白亚基alpha和beta[10],在1993年被第一个发现。相对于O. novo alpha和beta,S.pombe中的蛋白是spPot1[11]。在与spPot1限制性序列一致性的基础上,Baumann.等发现人类的一种单链结合蛋白hPot1[11]。可以估计人类和酵母细胞中,端粒单链结合蛋白有助于T - 环(T - loop)的形成。晶体结构研究证明了O.nova alpha和beta的DNA依赖性异二聚化导致深裂缝的形成,从而包埋3'端[12]。5'端和3'端的保护机制必有关联,关于染色体末端的保护机制已正在凸现。

结 论

随着端粒研究的愈加实用化,端粒的作用机制的研究相对落后,近年来发现Cdc13p是端粒作用机制中的关键分子,它的调控目标是端粒酶和端粒长度,针对前几年提出的长度调控模型是一种补充。作为真核生物的广泛使用机制,Cdc13p通过与Stn1p相互作用,调节端粒酶的下载,通过与Pol1p相互作用,调节端粒酶与常规复制合成DNA双链的协调对等,从而影响T - loop的形成,决定端粒末端是否打开复制或包埋起来不受侵犯。总之,作为端粒的复制问题,Cdc13p的作用相当于一个中介站,调节链式反应的取向和进程。

Cdc13p是端粒酶蛋白组分中的一种。在对端粒蛋白组分的研究中,直接以蛋白为肿瘤抑制靶点的应用虽未见报道,但在影响端粒具体结构的形成中,有相关药物的研制。无论是哪方面的临床应用,都需要进一步研究端粒酶的活性调控机制,以避免端粒酶抑制剂可能诱发非端粒酶依赖的稳定机制出现

维普资讯 http://www.cqvip.com

和药物致瘤副作用。相信随着研究的深入，会发现更多，更有效，更具特异性的以端粒与端粒相关蛋白为靶的肿瘤抑制剂。

参 考 文 献

1. Qi, H, Zakian VA. The Saccharomyces telomere - binding protein Cdc13p interacts with both the catalytic subunit of DNA polymerase alpha and the telomerase - associated est1 protein. Genes Dev, 2000, 14(14): 1777 - 88.
2. Ohki R, Tsurimoto T, Ishikawa F. In vitro reconstitution of the end replication problem. Mol Cell Biol, 2001, 21(17): 5753 - 66.
3. Read MA, Neidle S, Structural characterization of a guanine - quadruplex ligand complex. Biochemistry, 2000, 39(44): 13422 - 32.
4. Griffith JD, Comeau L, Posenfield S, et al. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. Cell, 1999, 97(4): 503 - 14.
5. Lin Y C, Hsu C L, Shih J W, et al. Specific binding of single - stranded telomeric DNA by Cdc13p of Saccharomyces cerevisiae. 2001, 276(27): 24588 - 93.
6. Grandin N, Damon C, Charbonneau M. Cdc13 cooperates with the yeast Ku proteins and Stn1 to regulate telomerase ecruitment. Mol Cell Biol, 2000, 20(22): 8397 - 408.
7. Peterson SE, Stellwagen AE, Diede SJ, et al. The function of a stem - loop in telomerase RNA is linked to the DNA repair protein Ku. Nat Genet, 2001, 27(1): 64 - 7.
8. Chandra A, Hughes TR, Nugent CI, et al. Cdc13 both positively and negatively regulates telomere replication. Genes Dev, 2001, 15(4): 404 - 14.
9. Pennock E, Buckley K, Lundblad V. Cdc13 delivers separate complexes to the telomere for end protection and replication. Cell, 2001, 104(3): 387 - 96.
10. Peersen OB, Ruggles JA, Schultz SC, et al. Dimeric structure of the Oxytricha nova telomere end - binding protein alpha - subunit bound to ssDNA. Nat Struct Biol, 2002, 9(3): 182 - 7.
11. Baumann P, Cech TR, Pot1, the putative telomere end - binding protein in fission yeast and humans. 2001, Science, 292(5519): 1171 - 1175.
12. Horvath MP, Schweiker VL, Bevilacqua JM, et al. Crystal structure of the Oxytricha nova telomere end binding protein complexed with single strand DNA. Cell, 1998, 95(7): 763 - 774.

（收稿日期：2002-06-20）

·个案与短篇·

超声三维成像技术的发展与应用

黄 英* 任 俐**

随着现代生物医学工程技术的迅速发展，工程技术与医学技术的有机结合，使超声二维成像技术向三维成像的发展成为可能。超声三维成像从1974年开始研究，首先采用的是机械臂方法，1976年提出了回声定位法，1977年应用电磁定位法，1986年利用经食道超声探头（IEE）获得静态三维图像，1990年用回拉式IEE探头成功重建了动态心脏三维图像。

一、超声三维成像的过程：主要包括4个步骤：原始图像的获取，三维的准确重建，三维图像的分割与理解，图像的三维显示。目前有两种方案实现三维成像：一是利用现有二维超声诊断设备，结合某种定位机械获取一系列空间位置已知的二维组织超声图像，进而以离线方式重建三维图像。二是利用二维面阵探头发射金字塔形体积超声束，从而获得实时的三维空间数据。

二、临床应用：三维超声图像为临床疾病诊断提供了立体动态准确的图形，越来越受到广泛的关注。目前临床应用较多的是重建左心室的三维图像，即在二维切面超声心动图基础上重建舒张末期和收缩末期左心室三维形态，可知左心室壁的收缩变化情况，并可计算出每搏输出量等参数。最近几年推出的具有临床实用价值的三维成像系统还有：①C530系列，1993年由克雷茨公司推出，适用于腹部三维重建，采用X、Y方向的机械式扫描，一个方向作用60～90°扇扫，另一方向按±15°摆动，实现三维容积扫描。②ECHO - CT能提供帧频为25～30帧/s的实时图像，即所谓四维超声动图，这时探头为经食道探头，换能器外为一水平束，用以改善和食道壁的接触。

三、讨论：三维成像技术在临床诊断治疗中显示出了广泛的运用前景，但三维成像并未成熟，特别是实时性方面，所以要提高图像质量和成像速度，其主要途径如下：①提高噪声分辨率，消除散射引起的噪声。②三维重建前对二维图像的预处理。③加快三维成像速度，实现实时显示。因此需要开发并行处理算法，发展快速的分割法以实现实时显示。

（收稿日期：2002－07－31）

* 作者单位：400038 重庆市第三军医大学西南医院信息科
** 西南医院设备科