

裂殖酵母细胞周期调控机制的系统建模与分析

滕 虎 黄 勋 修志龙 冯恩民

(大连理工大学环境与生命学院生物科学与工程系, 大连 116024; 大连理工大学应用数学系, 大连 116024.

E-mail: tenghu@dlut.edu.cn)

摘要 以酵母细胞周期行为作为研究对象, 综合分析了 Puc1, Cig1, Cig2 和 Cdc13 共 4 种周期蛋白在细胞周期 G1/S, G2/M 和 M 后期转换的调控作用, 绘制了周期调控机制的蛋白相互作用网络图, 并建立了对其动态行为进行描述的数学模型. 通过对不同突变体种型模拟结果的比较, 进一步说明了各种周期蛋白在细胞周期进程中对 S 期启动、G2/M 周期时相转换所起的作用.

关键词 裂殖酵母 细胞周期 数学建模 蛋白相互作用网络 系统生物学

细胞周期即细胞的增殖过程. 真核生物具有同样的细胞周期特征, 比如 G1, S, G2, M 期相, 周期蛋白及其依赖激酶以及检验点控制机制等^[1,2]. 由于细胞周期调控体系中涉及的蛋白、酶的种类繁多、功能各异, 仅从实验现象很难全面认识它们复杂的相互作用关系及其对细胞生理行为的影响. 利用数学建模的方法, 则可以整合这些有限的实验数据, 通过仿真得到更多有关细胞周期行为的信息, 加深对细胞周期调控机制的理解. 细胞生物学能取得如此辉煌的成功, 也离不开数学模型的分析和指导. 为此, Hartwell 等人^[3]曾对数学方法的使用给予了积极肯定.

国外学者从 20 世纪 90 年代开始从事细胞周期控制系统的数学模型构造和分析研究^[4,5], 研究对象包括裂殖酵母^[6]、芽殖酵母^[7]、蛙卵^[8,9]以及哺乳动物细胞^[10~12]等, 对这些物种的细胞周期实验结果进行了详细模拟, 检验和解释了一些实验现象, 并对细胞周期的调控体系进行数学分析. 国内有学者曾对芽殖酵母蛋白复合物与蛋白相互作用和基因表达谱之间相关性进行综合分析^[13], 但在细胞周期数学建模方面的研究比较少, 仅见一篇对 Tyson 模型进行介绍的文章^[14].

1 裂殖酵母细胞周期调控机制描述

裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)是一种经常被用来进行细胞周期研究的单倍体、单细胞低等真核生物, 主要包含 4 种周期蛋白: Cdc13, Cig1, Cig2 和 Puc1. 针对裂殖酵母的细胞周期调控机制, Novak 等人^[15]曾建立了一个考察 Cdc13 浓度变化的调控模型, 并在模型中考虑了 G1/S, G2/M, M 后期转换这 3 个周期检验点. Cdc13 对于有丝分裂进程是必不可少

的一种蛋白, 但是该模型中没有考虑 B 型周期蛋白 Cig1 和 Cig2, 对 G1 期蛋白 Puc1 也只是设定为常量来处理. 在 Novak 等人^[6]的修正模型中引进了 S 期启动激酶 (SK), 用 SK 简单地代替了 Cig2/Cdc2 和 Cig1/Cdc2, 但没有深入考察 Cig1 和 Cig2 的作用. 通过对这些模型分析发现, 现有的模型主要是围绕周期蛋白 Cdc13 建立的, 而基本上忽略了包含 Puc1, Cig1 和 Cig2 在内的系统性分析. 分子生物学实验则表明, 缺少了这几种周期蛋白的突变体会发生细胞周期的改变, 例如周期时间的改变、细胞启动增殖进程和细胞分裂时的细胞大小改变等^[16]. 显然, 通过数学建模分析 Cig1, Cig2, Puc1 和 Cdc13 这 4 种周期蛋白的综合调控作用很有必要. 为此本文对裂殖酵母细胞周期调控的机制进行了更为系统的描述, 其调控机制如图 1.

Cig1 与 Cdc2 的复合物能够促进 G1/S 转变^[17]. Cdc2/Cig1 能够磷酸化 Rum1 以促进其降解, 并且 Cdc2/Cig1 基本不受 Rum1 的抑制^[18]. Cig1 还能抑制 Ste9 的活性^[16], 同时 Cig1 也会被 APC-Ste9 促进降解^[19]. 另外, Cig1 还受 Cdc10 的转录调控^[20].

Cig2 与 Cdc2 形成的复合体是 G1/S 的主要启动激酶^[18], 它有通过磷酸化促进 Rum1 降解的作用, 也有通过磷酸化抑制 Ste9 活性的作用^[19], Cdc2/Cig2 还能促进 P-Cdc2/Cdc13 去磷酸化^[21]. Cig2 表达受到转录因子 Cdc10/Res 的调控^[1,18], Cdc2/Cig2 的活性在 G1 末期达到峰值^[20,22]. Cdc2/Cig2 受到 Rum1 的抑制, 但是比 Rum1 对 Cdc2/Cdc13 的抑制作用小得多^[12,22]. Rum1 在抑制 Cdc2/Cig2 活性的同时, 也提高了 Cig2 的稳定性, 使其不易被泛素化蛋白 APC 降解^[18,20]. Cig2 的降解主要是受 APC-Slp1 的调控, 而不受 APC-

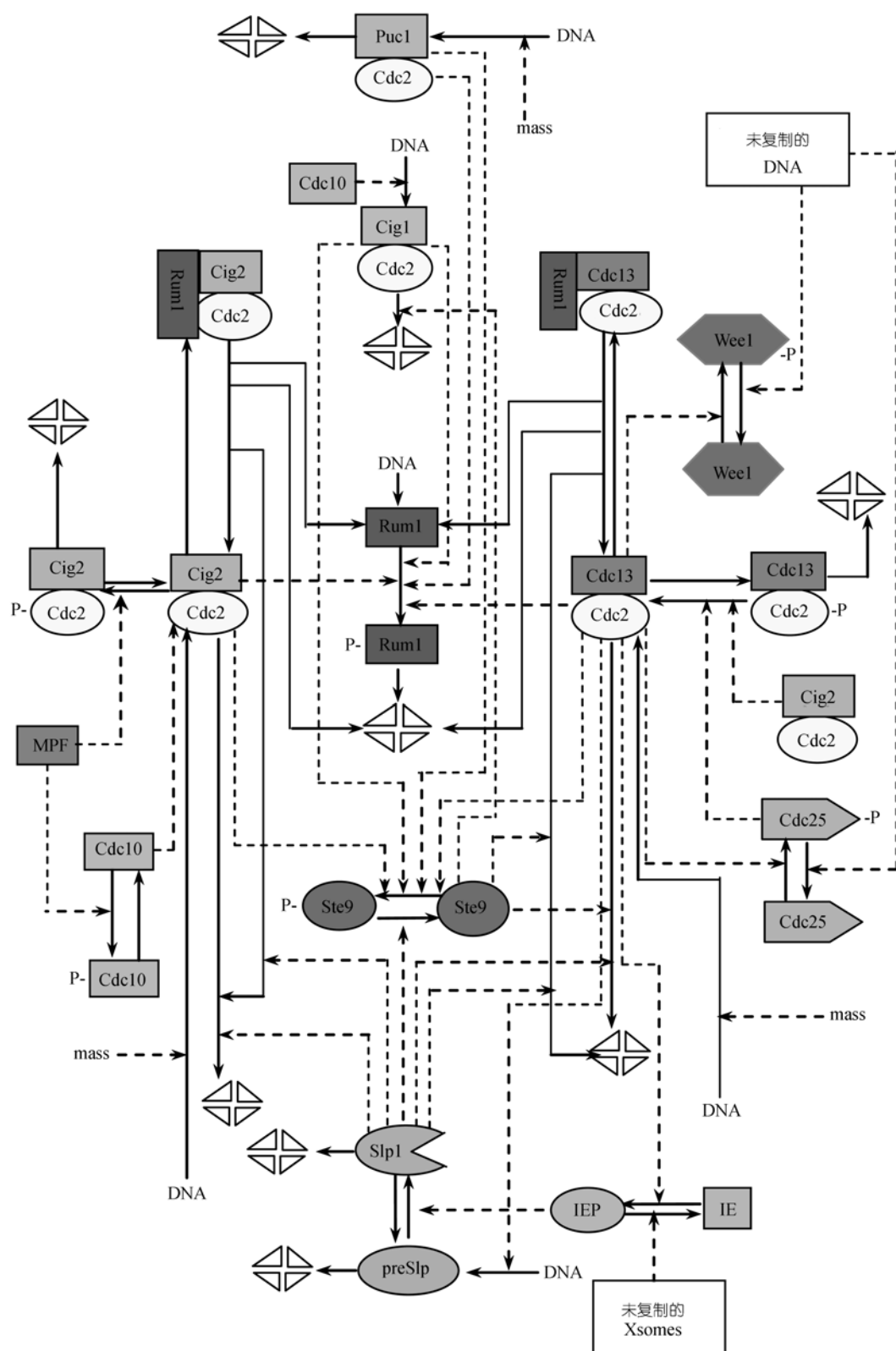


图1 裂殖酵母细胞周期的系统调控示意图

Ste9 调控^[1].

Puc1 与 Cdc13, Cig2 和 Cig1 的不同之处在于尽管它有促进 G1/S 转变的作用, 但是单独靠它还不能启动 S 期^[17,23]. Cdc2/Puc1 复合物能够使 Rum1 和 APC-Ste9 失活, 也能通过磷酸化促进 Rum1 降解, 并且 Rum1 对 Cdc2/Puc1 的结合抑制作用很小^[19]. Puc1 在细胞周期进程中基本保持相对稳定的低浓度^[15].

2 裂殖酵母细胞周期模型的建立

根据质量平衡原理, 对图 1 中的关键调控因子建立浓度随时间变化的方程, 具体如下:

() Cdc2/Cdc13 合成与转化的浓度变化速率方程.

$$\frac{d[MPF]}{dt} = k_{S,MPF} \cdot M + k_{RMPF} \cdot RMPF + k_{MPFP} \cdot MPFP - (k_{d,MPF} + k_{r,MPFP} + k_{c,RMPF} \cdot Rum1) \cdot MPF; \quad (1)$$

$$\frac{d[RMPF]}{dt} = k_{c,RMPF} \cdot MPF \cdot Rum1 - (k_{RMPF} + k_{d,RMPF}) \cdot RMPF; \quad (2)$$

$$\frac{d[MPFP]}{dt} = k_{r,MPFP} \cdot MPF - (k_{MPFP} + k_{d,MPFP}) \cdot MPFP; \quad (3)$$

$$\frac{d[Wee1]}{dt} = \frac{k_{r,W} \cdot (1 - [Wee1])}{J_{r,W} + 1 - [Wee1]} - \frac{k_W \cdot [MPF] \cdot [Wee1]}{J_W + [Wee1]}; \quad (4)$$

$$\frac{d[Cdc25P]}{dt} = \frac{k_{25} \cdot [MPF] \cdot (1 - [Cdc25P])}{J_{25} + 1 - [Cdc25P]} - \frac{k_{r,25} \cdot [Cdc25P]}{J_{r,25} + [Cdc25P]}. \quad (5)$$

() Cdc2/Cig2 的合成与转化.

$$\frac{d[SK]}{dt} = k_{S,SK} \cdot M - (k_{d,SK} + k_{c,RSK} \cdot Rum1) \cdot SK + k_{RSK} \cdot RSK; \quad (6)$$

$$\frac{d[RSK]}{dt} = k_{c,RSK} \cdot SK \cdot Rum1 - (k_{RSK} + k_{d,RSK}) \cdot RSK; \quad (7)$$

$$\frac{d[Res]}{dt} = \frac{k_{r,Res} \cdot (1 - [Res])}{J_{r,Res} + 1 - [Res]} - \frac{k_{Res} \cdot [Res]}{J_{Res} + [Res]}. \quad (8)$$

() Cdc2/Cig1 与 Cdc2/Puc1 的合成与降解.

$$\frac{d[PC]}{dt} = k_{S,PC} \cdot M - k_{d,PC} \cdot PC; \quad (9)$$

$$\frac{d[Cig1]}{dt} = k_{S,Cig1} \cdot M - k_{d,Cig1} \cdot Cig1. \quad (10)$$

() Rum1 的合成与降解.

$$\frac{d[Rum1]}{dt} = k_{S,Rum1} + k_{RMPF} \cdot RMPF + k_{RSK} \cdot RSK$$

$$- (k_{Rum1} + k_{c,RMPF} \cdot MPF + k_{c,RSK} \cdot SK) \cdot Rum1. \quad (11)$$

() APC 相关因子的合成与转化.

$$\frac{d[Slp1]}{dt} = \frac{k_{r,Slp1} \cdot [IEP] \cdot [preSlp1]}{J_{r,Slp1} + [preSlp1]} - \frac{k_{Slp1} \cdot [Slp1]}{J_{Slp1} + [Slp1]} - k_{d,Slp1} \cdot [Slp1]; \quad (12)$$

$$\frac{d[preSlp1]}{dt} = k_{s,preSlp1} - k_{d,Slp1} \cdot [preSlp1] + \frac{k_{Slp1} \cdot [Slp1]}{J_{Slp1} + [Slp1]} - \frac{k_{r,Slp1} \cdot [IEP] \cdot [preSlp1]}{J_{r,Slp1} + [preSlp1]}; \quad (13)$$

$$\frac{d[IEP]}{dt} = \frac{k_{IE} \cdot [MPF] \cdot (1 - [IEP])}{J_{IE} + 1 - [IEP]} - \frac{k_{r,IE} \cdot [IEP]}{J_{r,IE} + [IEP]}; \quad (14)$$

$$\frac{d[Ste9]}{dt} = \frac{k \cdot (1 - [Ste9])}{J + 1 - [Ste9]} - \frac{k \cdot [Ste9]}{J + [Ste9]}. \quad (15)$$

() 细胞尺寸的增长.

$$\frac{dM}{dt} = u \cdot M; \quad (16)$$

(在 M/G1 转换时细胞尺寸 M 减半)

() 速率系数函数.

$$\begin{aligned} k_{d,MPF} &= k_{d,Cdc13a} + k_{d,Cdc13slp} \cdot [Slp1] + k_{d,Cdc13ste} \cdot [Ste9]; \\ k_{MPFP} &= k_{Cdc13P1} + k_{Cdc13P25} \cdot [Cdc25P] + k_{r,Cdc13Pcig2} \cdot [Cig2]; \\ k_{d,RMPF} &= k_{d,Cdc13R1} + k_{d,Cdc13Rslp} \cdot [Slp1] + k_{d,Cdc13Rste} \cdot [Ste9]; \\ k_{r,MPFP} &= k_{r,Cdc13P1} + k_{r,Cdc13Pwee} \cdot [Wee1]; \\ k_{s,SK} &= k_{s,Cig2a} + k_{s,Cig2res} \cdot [Res]; \\ k_{Res} &= k_{Resa} + k_{ResMPF} \cdot [MPF]; \\ k_{d,RSK} &= k_{d,Cig2R1} + k_{d,Cig2Rslp} \cdot [Slp1]; \\ k_{s,Cig1} &= k_{s,Cig1a} + k_{s,Cig1res} \cdot Res; \\ k_{d,Cig1} &= k_{d,Cig1a} + k_{d,Cig1ste} \cdot [Ste9]; \\ k_{Rum1} &= k_{Rum1a} + k_{Rum1MPF} \cdot [MPF] + k_{Rum1Cig2} \cdot [Cig2] + k_{Rum1PC} \cdot [Puc1]; \\ k_{s,preSlp1} &= k_{s,preSlp1a} + \frac{k_{s,preSlp1MPF} \cdot [MPF]^4}{J_{s,preSlp1mpf}^4 + [MPF]^4}; \\ k_{r,Ste9} &= k_{r,Ste9a} + k_{r,Ste9slp} \cdot [Slp1]; \\ k_{Ste9} &= k_{Ste9a} + k_{Ste9SK} \cdot [SK] + k_{Ste9PC} \cdot [Puc1] + k_{Ste9Cig1} \cdot [Cig1]; \\ k_{r,25} &= k_{r,25P} + ks; \\ k_{r,W} &= k_{r,WP} + ks; \\ k_{r,IE} &= k_{r,IEP} + kx. \end{aligned}$$

() 有效总浓度定义.

促成熟因子 MPF:

$$[MPFto] = [MPF] + [MPF] \cdot MPF_{cdc13p};$$

S 期启动激酶:

$$[SKto] = [SK] \cdot SK_{cig2} + [MPF] \cdot SK_{mpf} + [Cig1] \cdot SK_{cig1};$$

泛素化因子:

$$[APCto] = [Slp1] \cdot APC_{slp} + [Ste9] \cdot APC_{ste}.$$

() 期相转换条件.

G1/S 转换: 当 $SKto$ 增大至阈值 $SKtoS$, 且 $APCto$ 降低至阈值 $APCtoS$;

S 期长短: 恒为 $Sdur$;

G2/M 转换: 当 $MPFto$ 增大至阈值 $MPFtoM$;

M/G1 转换: 当 $APCto$ 增大至阈值 $APCtoG1$.

模型参数的取值见表 1.

3 模拟结果分析

3.1 Cig1ΔCig2Δ突变体模拟结果

Novak 等人^[15]曾对 Cig1ΔCig2Δ 种型进行了模拟, 本研究模型的模拟结果与其基本吻合, 如 MPF 活性在 G1, S, G2 期都在低水平处缓慢增长, 在 G2 末期突然增长, 超过一定阈值后启动 M 期, 在 M 末期因为 APC (本文模型中的 Slp1 和 Ste9) 的激活而急剧下降; Rum1 则仅在 G1 期处于高水平 (图 2(b)).

与 Novak 模型^[15]不同的是, 本文忽略了 Wee1 与 Mik1 的差别, 将二者当作一个 Cdc2/Cdc13 的磷酸激酶来考虑, 因此模型中看不到 Mik1 的波动行为. 由于 Mik1 的活性远小于 Wee1, 故而这种差别对模型的运算结果不会产生较大影响. 尽管 Novak 等人^[15]没有画出 Wee1 的波动曲线, 但通过对原模型的模拟发现 Wee1 确实是在 G2 末期突然下降, 并在 M 期为低水平, 在其他期为高水平, 这与本文的模拟结果相符.

本文对 APC 的细化考虑与 Novak 模型^[15]总体上比较吻合, 都是在 M 末期急剧增加, 在 G1 期迅速减小. 当然, 本文模型在考虑 Slp1 和 Ste9 后也带来了一些不同: 由于 MPF 既能通过激活 IEP 正调控 Slp1 而使 Slp1 比 Ste9 更早地被激活, 也能通过激活转录正调控 Slp1 (此处酶促反应的 Hill 常数为 4), 因此 Slp1 更易受 MPF 活性的影响, 使得 Slp1 的峰形更陡更尖. 而 Ste9 因为主要受 Slp1 的正调控, 所以它的激活较 Slp1 更为滞后, 峰形也更为平滑. Slp1 和 Ste9 在大多数酵母突变体中都以此形式波动, 其模拟结果与 Novak^[6]中的模拟结果十分相似.

由于 Puc1 仅受细胞尺寸的调控, 因而它的活性

表 1 模型中参数的取值^{a)}

参数	参数值	参考文献	参数	参数值	参考文献
Cdc2/Cdc13 的合成与转化:					
k_s,MPF	0.0315	[6,15]	$k_d,Cdc13a$	0.005	[6,15]
$k_d,Cdc13ste$	1	[15]	$k_d,Cdc13slp$	0.1	[6]
$k_c,Cdc13R$	200	[15]	$k_r,Cdc13P1$	0.15	[6]
$k_r,Cdc13Pwee$	1.15	[6]	k_{RMPF}	1	[17]
$k_{Cdc13P1}$	0.01	[15]	$k_{Cdc13P25}$	0.39	[15]
$k_{Cdc13PCig2}$	1	[22]	$k_d,Cdc13R1$	0.03	[15]
$k_d,Cdc13Rslp$	0.12	[15]	$k_d,Cdc13Rste$	1.16	
k_r,Wp	0.2	[15]	k_W	1	[15]
J_r,W	0.02	[6,15]	J_W	0.02	[6,15]
k_{25}	1	[15]	$k_{r,25}$	0.2	[15]
J_{25}	0.02	[6,15]	$J_{r,25}$	0.02	[6,15]
Cdc2/Cig2 的合成与转化:					
$k_s,Cig2a$	0.0015	[17]	$k_s,Cig2res$	0.05	[6]
$k_d,Cig2a$	0.1	[6]	$k_d,Cig2slp$	1	
$k_d,Cig2Rslp$	0.05		$k_d,Cig2R1$	0.5	
k_{Cig2R}	1		$k_c,Cig2R$	60	
k_r,Res	1.6	[6]	J_r,Res	0.3	[6]
k_{Resa}	1	[6]	J_{Res}	0.3	[6]
k_{Resmpf}	6	[6]			
Cdc2/Cig1 与 Cdc2/Puc1 的合成与降解:					
k_s,PC	0.00055	[8]	$k_d,Cig1a$	0.048	
k_d,PC	0.05	[8,15]	$k_d,Cig1ste$	0.097	
$k_s,Cig1a$	0.015		$k_s,Cig1res$	0.005	
Rum1 的合成与降解:					
$k_s,Rum1$	0.1	[6,17]	k_{Rum1sk}	0	
k_{Rum1a}	0.1	[15]	$k_{Rum1cig1}$	240	[24]
$k_{Rum1mpf}$	20	[15]	k_{Rum1pc}	20	[20]
APC 的相关因子的合成与转化:					
$k_r,Slp1$	1	[6]	$k_r,Ste9a$	1	[6]
$J_r,Slp1$	0.01	[15]	$k_r,Ste9slp$	10	[6]
k_{Slp1}	0.25	[6]	$J_r,Ste9$	0.1	[6]
J_{Slp1}	0.01		k_{Ste9a}	1.1	[4]
$k_d,Slp1$	0.1	[6]	k_{Ste9sk}	2	[6]
$k_s,preSlp1a$	0.005	[6]	$k_{Ste9mpf}$	35	[6]
$k_s,preSlp1mpf$	0.3	[6]	$k_{Ste9cig1}$	35	
$J_s,preSlp1mpf$	0.3	[6]	k_{Ste9pc}	35	
k_{IE}	0.2	[6,15]	J_{Ste9}	0.01	[6]
J_{IE}	0.02	[6]	J_r,IE	0.02	[6]
$k_{r,IEp}$	0.04	[6]			
细胞尺寸的增长:					
u	0.005	[6]			
有效总浓度中的权重:					
$MPFcdc13p$	0.1	[15]	$SKpc$	0	[17]
$SKmpf$	1	[17]	$APCslp$	0.5	[17]
$SKcig2$	0.25	[17]	$APCste$	0.5	[17]
$SKcig1$	0.25	[17]			
阈值					
$SKtoS$	0.05	[17]	$Sdur$	12	[15]
$MPFtoM$	0.16	[15]	$APCtoG1$	0.3	[15]
$MPFtoG1$	0.2	[6]	$APCtoS$	0.2	[15]
监控信号					
$ksmax$	0.4 (S 期), 0 (G1, G2, M 期)				
$Kxmax$ M 期内前 18 min 为 0.48, 然后每分钟减小 0.33, 其他期为 0 (G1, S, G2 期)					[15]

a) 模型计算过程中所有的浓度变量都进行了无因次换算, 因而反应速率常数的单位都是 min^{-1} , 米氏常数都是无量纲的. 参数说明: 公式中[]代表着指定蛋白或聚合物的浓度; 字母 k 打头的参数为反应速率常数, 下标对应的是特定的蛋白或聚合物, 其中 k_s 表示特定蛋白的合成速率, k_c 表示聚合物的合成速率, k_d 表示特定蛋白或聚合物的降解速率, k_r 表示特定反应的逆反应速率; 字母 J 打头的参数为特定反应的米氏常数, J_r 为对应的逆反应米氏常数

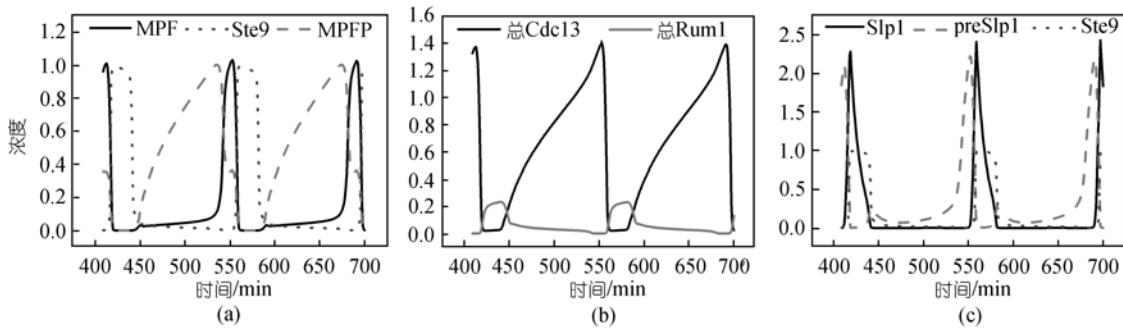


图 2 $cig1\Delta cig2\Delta$ 中的蛋白波动曲线

在低水平小振幅波动(这里没有给出模拟结果), 这与相关实验相符^[24]. 在 Novak 模型^[15]中仅仅是将 Puc1 浓度设为定值.

3.2 野生种型的模拟结果

从图 3 的模拟结果可以看到, Cdc2/Cig1 的活性在 M 末期开始下降, 并在 G1 期到达最低水平, 它的下降和上升区间与 Cdc2/Cdc13 活性有着一定的相似性. 与 Cdc2/Cdc13 活性的谷值不同, Cdc2/Cig1 活性的谷值仍然保持在峰值的 1/2 左右, 这与相关实验结果^[21,25]相吻合. 这种现象的可能原因是 Cig1 与 Cdc13 都受到泛素化蛋白 APC 的降解作用(Cig1 受 APC-Ste9, Cdc13 受 APC-Slp1 和 APC-Ste9), 其中对 Cdc13 的降解作用是主要的. Cdc2/Cdc13 与 APC 之间存在对抗性相互作用(当 Cdc2/Cdc13 水平高时, APC 的水平低; 当 Cdc2/Cdc13 水平低时, APC 的水平高)^[15]. 由于 APC-Ste9 的降解作用, Cdc2/Cig1 与 Cdc2/Cdc13 一样, 也在 M 后期出现低水平. 但是由于 Cig1 仅受 APC-Ste9 的降解作用, 因此它所受 APC 的降解作用远小于 Cdc13, 使得 Cdc2/Cig1 的水平不至于降得太低.

Cdc2/Cig2 的活性在从 G1 期起始时开始迅速增长, 在 G1 末期达到峰值, 而在 M 期下降到最低的水

平, 这与实验结果吻合^[18,22]. Cig2 的这种变化受到 APC 和 MPF 两种途径的调控. 首先, Cdc2/Cig2 受到 MPF 的双重负调控: 一重是间接抑制, 即 Cdc2/Cig2 受到 Cdc10/Res 的转录调控, 而 Cdc10/Res 被 MPF 抑制; 另一重是 MPF 通过磷酸化促使 Cig2 降解, 从而直接地负调控 Cdc2/Cig2. 其次, Cdc2/Cig2 受 APC-Ste9 的降解作用调控. 因此, 在 MPF 和 APC 水平都达到高水平的 M 期, Cdc2/Cig2 受到强烈负调控, 其活性下降至最低水平. 而在 G1 期, 随着 MPF 和 APC 活性的相继下降, Cdc2/Cig2 所受负调控作用减小, 其活性迅速上升达到高水平. Puc1 则在整个细胞周期中保持相对稳定的浓度^[18].

对比野生种型和 $Cig1\Delta Cig2\Delta$ 种型的模拟结果, 两者的 Cdc13 浓度变化波形基本一致, 但是前者的活性 MPF 峰值浓度超过了 1.0, 而后者的 MPF 峰值浓度则为 0.9 左右, 主要是野生型细胞中有启动激酶 SK 的推动, 降低了细胞 G1/S 转换的尺寸要求, 从而使得细胞分裂尺寸下降造成的(表 2).

3.3 细胞各期相时间分布和分裂尺寸的模拟结果

表 2 中列出了几种细胞种型的周期时间分布和分裂尺寸的模拟结果. 对几种细胞分裂的尺寸对比可以发现, 野生型细胞的分裂尺寸最小, 这是因为

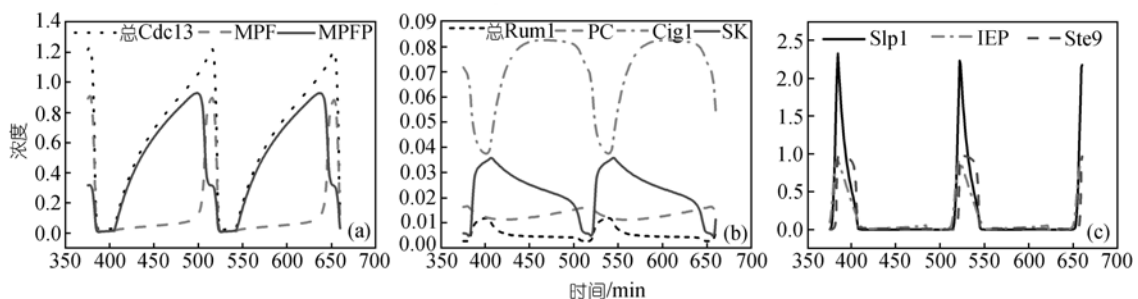


图 3 野生型裂殖酵母细胞周期蛋白波动曲线

表2 部分突变体的周期时间和分裂尺寸对比

	野生型	Cig1 Δ	Cig2 Δ	Cig1 Δ Cig2 Δ	Puc1 Δ Cig1 Δ	Puc1 Δ Cig1 Δ Cig2 Δ
G1 期/min	28	34	30	40	69	91
G2 期/min	70	63	67	57	20	7
M 期/min	30	29	30	29	29	28
细胞分裂后大小 ^{a)}	0.84	0.93	0.90	1.00	1.02	1.29

a) 细胞大小为相对值, 以 Cig1 Δ Cig2 Δ 突变体细胞分裂后的大小设为 1

SK激酶的存在使得G1/S转换对细胞尺寸的要求减小, G1 期的相对持续时间较短; 在随之而来的较长G2 期生长时间里MPF得以在较小的细胞内充分积累并实现G2/M转换, 因而细胞最终分裂的尺寸也小于其他菌株. 在所有种型的模拟结果中, cig1 Δ cig2 Δ puc1 Δ 突变体细胞尺寸最大, 这与实验结果基本吻合^[16]. 不难理解, 在缺少Cig2/Cdc2 激酶的细胞中, 又缺少Cig1 和Puc1 对Rum1 的磷酸化作用, Cdc13/Cdc2 的积累速度缓慢, 必须经过较长时间才能实现G1/S转换, 由于周期蛋白浓度与细胞大小相关, 因而G1/S转换的细胞尺寸要求增加, 进而也使得细胞分裂尺寸增加. 细胞尺寸的增加伴随着周期蛋白浓度在G2/M转换时升高.

在各种突变体细胞中, G1 期持续时间和细胞分裂尺寸都较野生型细胞发生了不同程度的变化, 总的规律是细胞分裂后的大小与 G1 期持续时间呈正相关性, 而细胞周期总的持续时间基本保持不变. 这是由于在本文的模型中, 细胞周期时间的长短主要由细胞大小倍增的时间(即比生长速率)来决定, 因而当比生长速率为定值时细胞周期时间就确定了; 但是细胞分裂时的大小则由模型计算中的 Cdc13/Cdc2 初始浓度决定: 如果细胞中存在启动激酶 SK, 则细胞对Cdc13的初始浓度要求降低, 细胞周期就可以在尺寸比较小的情况下启动; 如果细胞中没有启动激酶, 则细胞对Cdc13的初始浓度要求增加, 细胞周期就必须在较大尺寸的情况下启动.

由于Cdc2/Cig2 对Rum1 磷酸化促进其降解, 对Ste9 磷酸化抑制其活性, 从而促进G1/S转变, 并通过过磷酸化的P-Cdc2/Cdc13 进行去磷酸化, 提高MPF活性进而影响G2/M转变^[21], 因此Cig2/Cdc2 对细胞周期起着一定的推动作用. 此外, Cdc2/Cig2 本身对Rum1 不如MPF那样敏感, 所以尽管整个细胞周期进程中Rum1 在G1 期的浓度最高, 仍难阻止其推动G1/S转换; 而在cig2 Δ 突变体中G1/S转换就要推迟, 细胞要长到更大, 才能使活化的MPF达到S期启动所

需激酶活性的临界水平.

3.4 Cig1, Puc1 对 G1/S 转换的影响

Cig1, Puc1 共同构成了启动激酶 SK 和促成熟因子 MPF 的上游调控子, 它们的调控作用主要通过通过对 Rum1 的磷酸化促降解作用来实现.

在野生菌株中, Rum1 只有在G1 期表现出一定的高浓度, 其峰值浓度大约在 0.01 左右, 此时Cig1 浓度处于最低水平上. 经过S期之后, 由于Cig1 水平的显著增加, Rum1 随之显著下降并维持在一个低水平上, 随着细胞周期进程的推进进一步呈现缓慢下降的趋势. 在G2 晚期, MPF活性积累到一定程度后通过与Cdc25 和Wee1 之间的正反馈作用迅速增加. 虽然MPF能够和Rum1 结合成三聚体形式使得MPF活性被抑制, 但Cdc13 和Rum1 能彼此促进对方的不稳定^[17], 因此伴随MPF活性的显著增加, Rum1 更加不稳定并达到了整个细胞周期中的最低浓度点(图 3(b)).

考虑到野生菌株中 Cig1 在其最低浓度水平的 G1 期仍没有完全消失而是保持在一定水平上(此时 Rum1 总量也保持在一定水平上), 以及在 Cig1 达到峰值的 G2 期 Rum1 也没有完全下降到最低点这两种情况, 可能说明了 Cig1 对 Rum1 的促降解作用并非是彻底的. 只有在 MPF 活性达到顶点的 M 期, Rum1 才达到最低点, 这也许说明了 MPF 对 Rum1 的降解比 Cig1 更彻底.

在 Cig1 Δ 单突变体种型中, Rum1 总量在 G1 期显著增加, 于 G1 末期达到峰值浓度(约为 0.23), 相对于野生种型细胞中的浓度增加十分明显(图 4(a)). 由于 Rum1 的显著增加, SK 原本出现在 G1 期的浓度高峰也消失了, 大部分的 Cig2 都被 Rum1 抑制性结合为三聚体 Cig2/Cdc2/Rum1.

作为和 Cig1 具有类似作用的上游调控因子, Puc1 也具有促 Rum1 磷酸化降解的作用. 但 Puc1 在细胞周期中浓度变化的趋势和 Cig1 不尽相同, Cig1 浓度在 G1 期最低而在 G2 期达到顶点, 而 Puc1 则是

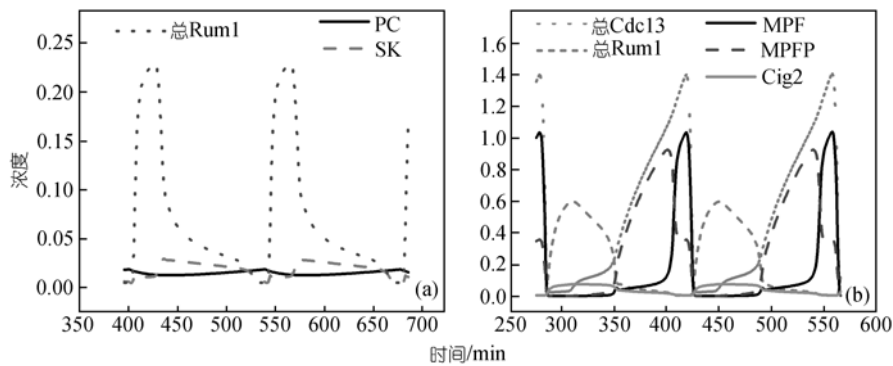


图 4 $cig1\Delta$ 和 $puc1\Delta cig1\Delta$ 突变体中 G1/S 转换相关的主要蛋白浓度波动曲线

在 G1 晚期和 S 期处于谷底并在 M 后期和 G1 早期达到峰值(图 2(b)). 在 $Puc1\Delta Cig1\Delta$ 双突变体中, Rum1 在细胞周期中的浓度波动曲线发生了显著变化(图 4(b)), Rum1 在相当长一段时间维持在较高浓度, 推迟了 G1/S 转换的时间. 这是因为由于缺少了 Puc1 和 Cig1 的降解作用, G1 期的 Rum1 可以充分地积累并和 SK 结合抑制其活性, 而此时 MPF 的活性也处于很低的水平上. MPF 活性低的原因也是由于 Rum1 的结合抑制作用, 无法通过以促进 Rum1 磷酸化降解的正反馈方式快速提高活性. 只有 MPF 逐渐积累到一定程度后, Rum1 被 MPF 大量磷酸化降解了, MPF 才会表现出明显增加, 推动细胞穿越 G1/S 转换期.

3.5 Cig2 在细胞周期中的变化规律和作用

Cig2 的主要作用是促进细胞穿越“Start”点实现 G1/S 转换, 因而二聚体 Cig2/Cdc2 被称为 S 期启动激酶(SK). 从它的作用也可以看出, SK 应该在 G1 末期达到峰值. Cig2 的活性受到了 Cig1, Puc1 的严格调控, 这种调控作用通过 Rum1 的促磷酸化降解实现. 在野生菌株中, Cig2/Cdc2 复合物在 G1 晚期达到峰值, 这和 Rum1 达到峰值的时间点很接近. SK 虽然能和

Rum1 构成三聚体, 但是它与 Cdc13/Cdc2/Rum1 三聚体不同, 后者的 Cdc13 和 Rum1 有促进彼此降解的作用, 而 Cig2 和 Rum1 却通过结合有促进彼此稳定的作用, 并且 Cig2 受 Rum1 的抑制作用没有 Cdc13 强烈^[17]. 在 $Cig1\Delta$ 和 $Puc1\Delta Cig1\Delta$ 突变体中, 由于缺少了对 Rum1 的磷酸化降解作用, SK 激酶的活性增加缓慢, G1 期的持续时间都有不同程度的延长(表 2).

在缺少 Cig2 的突变体中, 细胞也能通过 G1/S 转换. 此时, 扮演启动激酶这个角色的主要是 MPF, 积累到一定量的 MPF 也可以启动 G1/S 转换, 但此时 MPF 的活性没有达到 M 期的高水平, 启动 G2/M 转换的 MPF 活性要求更高. 通过不同转换点的 MPF 活性要求从低到高, 这也保证了细胞周期的有序进行, 而不至于发生周期进程的混乱. 虽然 Cig1/Cdc2 也被称作是启动激酶之一, 但是它的主要作用是通过磷酸化 Rum1 促进其降解.

在 $Cig2\Delta$ 单突变体中, 由于 Cig1 的存在 Rum1 能够被有效的磷酸化降解, 进而可以促使部分 Cdc13/Cdc2/Rum1 三聚体降解, MPF 也相对容易积累, 因而 G1/S 转换的时间并没有明显延迟(图 5(a)). 在

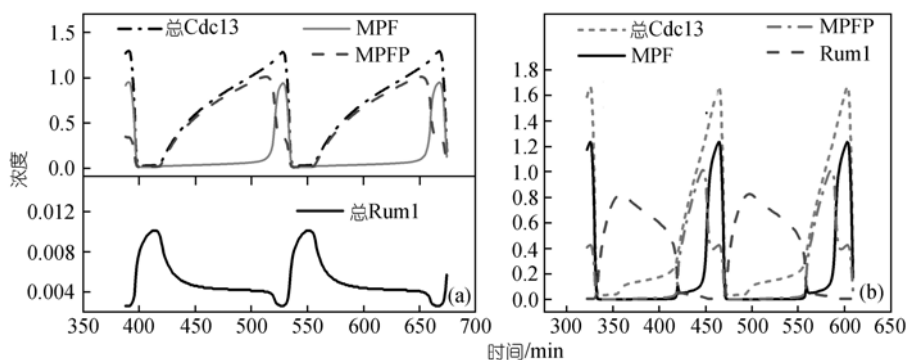


图 5 $Cig2\Delta$ 型和 $Puc1\Delta Cig1\Delta Cig2\Delta$ 型的蛋白浓度波动曲线

Cig1 Δ Cig2 Δ 双突变体中, 由于缺少了 Cig1 对 Rum1 的促降解作用, MPF 活性增长开始变得缓慢, G1/S 转换的时间已经有了明显的推迟(表 2). 在 Puc1 Δ Cig1 Δ Cig2 Δ 三突变体中, Puc1 对 Rum1 的促降解作用也消失了, Rum1 得以在相当长一段时间内不能被有效降解, MPF 活性增长十分缓慢, 迟迟不能实现 G1/S 转换, G1 期的持续时间显著延长(表 2). 在缺少 Cig2 的细胞中, 细胞周期进程完全由 MPF 控制, 不论是 G1/S 转换还是 G2/M 转换都完全依赖于 Cdc13 自身的不断积累. 因此 Puc1 Δ Cig1 Δ Cig2 Δ 三突变体中 Cdc13 的合成量明显高于其他菌株(图 5(b)).

4 结论

从系统研究细胞周期调控机制的角度出发, 在综合前人实验和数学分析工作的基础上, 本文给出了一个包含周期蛋白 Cdc13, Cig2, Cig1 和 Puc1 的裂殖酵母细胞周期综合性调控的数学模型, 建立了相应的动态描述微分方程和速率函数. 模型计算与一些重要实验以及前人的模型计算结果进行了对比, 取得了很好的吻合. 另外, 通过对野生型、cig1 Δ 型、cig1 Δ cig2 Δ 型等多种突变体的模拟结果分析深入阐述了周期蛋白 Puc1, Cig1 对细胞周期启动的间接促进作用以及 Cig2 对细胞周期启动的直接调控作用.

致谢 本工作为国家自然科学基金资助项目(批准号: 20176005).

参 考 文 献

- Rupeš I. Checking cell size in yeast. *Trends Genet*, 2002, 18(9): 479~487[DOI]
- 吴家睿. 细胞周期的驱动及其调控. *科学通报*, 2002, 47(11): 805~811[摘要]
- Hartwell L H, Hopfield J J, Leibler S, et al. From molecular to modular cell biology. *Nature*, 1999, 402: C47~C52[DOI]
- <http://www.biol.vt.edu/faculty/tyson/>
- <http://cellcycle.mkt.bme.hu/>
- Novak B, Pataki Z, Ciliberto A, et al. Mathematical model of the cell division cycle of fission yeast. *Chaos*, 2001, 11(1): 277~286[DOI]
- Chen K C, Calzone L, Csikasz-Nagy A, et al. Integrative analysis of cell cycle control in budding yeast. *Mol Biol Cell*, 2004, 15: 3841~3862[DOI]
- Borisuk M T, Tyson J J. Bifurcation analysis of a model of mitotic control in frog eggs. *J Theor Biol*, 1998, 195: 69~85[DOI]
- Marlovits G, Tyson C J, Novak B, et al. Modeling M-phase control in *Xenopus* Oocyte extracts: The surveillance mechanism for unreplicated DNA. *Biophys Chem*, 1998, 72: 169~184[DOI]
- Qu Z, Weiss J N, MacLellan W R. Regulation of the mammalian cell cycle: A model of the G1-to-S transition. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003, 284: 349~364
- Thron C D. Mathematical analysis of binary activation of a cell cycle kinase which down-regulates its own inhibitor. *Biophys Chem*, 1999, 79: 95~106[DOI]
- Aguda B D, Tang Y. The kinetic origins of the restriction point in the mammalian cell cycle. *Cell Prolif*, 1999, 32: 321~335[DOI]
- 蔡伦, 薛宏, 卢宏超, 等. 蛋白复合物与相互作用谱和基因表达谱的相关性分析. *科学通报*, 2003, 48: 1944~1948
- 张锁春, 吕金虎. 细胞周期调控及其数学模型. *非线性动力学学报*, 2001, 8(4): 286~296
- Novak B, Csikasz-Nagy A, Gyorffy B, et al. Mathematical model of the fission yeast cell cycle with checkpoint controls at the G1/S, G2/M and metaphase/anaphase transitions. *Biophys Chem*, 1998, 72: 185~200[DOI]
- Matsuoka K, Kiyokawa N, Taguchi T, et al. Rum1, an inhibitor of cyclin-dependent kinase in fission yeast, is negatively regulated by mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation at Ser and Thr residues. *Eur J Biochem*, 2002, 269: 3511~3521[DOI]
- Novak B, Tyson J. Modeling the control of DNA replication in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 9147~9152[DOI]
- Martin-Castellanos C, Blanco M A, de Prada J M, et al. The Puc1 cyclin regulates the G1 phase of the fission yeast cell cycle in response to cell size. *Mol Biol Cell*, 2000, 11: 543~554
- Blanco M A, Sanchez-Diaz A, Prada J M, et al. APC^{ste9/srw1} promotes degradation of mitotic cyclins in G₁ and is inhibited by Cdc2 phosphorylation. *EMBO J*, 2000, 19(15): 3945~3955[DOI]
- Jaime C B, Gulli M P, Nurse P. p25rum1 promotes proteolysis of the mitotic B-cyclin p56cdc13 during G1 of the fission yeast cell cycle. *EMBO J*, 1997, 16 (15): 4657~4664[DOI]
- Zarrov P, Decottignies A, Baldacci G, et al. G1/S CDK is inhibited to restrain mitotic onset when DNA replication is blocked in fission yeast. *EMBO J*, 2002, 21(13): 3370~3376[DOI]
- Mondesert O, McGowan C H, Russell P. Cig2, a B-type cyclin, promotes the onset of S in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol*, 1996, 16: 1527~1533
- Moser B A, Russell P. Cell cycle regulation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Opin Microbiol*, 2000, 3: 631~636[DOI]
- Forsburg S L, Nurse P. Analysis of the *Schizosaccharomyces pombe* cyclin puc1: Evidence for a role in cell cycle exit. *J Cell Sci*, 1994, 107: 601~613
- Benito J, Martín-Castellanos C, Moreno S. Regulation of the G1 phase of the cell cycle by periodic stabilization and degradation of the p25rum1 CDK inhibitor. *EMBO J*, 1998, 17(2): 482~497[DOI]

(2005-03-31 收稿, 2005-06-29 收修改稿)