



真核细胞染色体 DNA 复制起始及复制叉稳定性维持的机制

吴丽虹^{†*}, 刘阳^{†*}, 孔道春

北京大学生命科学学院, 蛋白质与植物基因研究国家重点实验室, 北京 100871

[†] 同等贡献

* 联系人, E-mail: lihongwu@pku.edu.cn; yangzai@pku.edu.cn

收稿日期: 2013-09-03; 接受日期: 2013-09-18

国家自然科学基金(批准号: 31170739)和国家重点基础研究发展计划(批准号: 2010CB912201)资助项目

doi: 10.1360/052013-287

摘要 在真核生物中, DNA 复制在染色体上特定的多位点起始. 当细胞处在晚 M 及 G1 期, 多个复制起始蛋白依次结合到 DNA 复制源, 组装形成复制前复合体. pre-RC 在 G1~S 的转折期得到激活, 随后, 多个直接参与 DNA 复制叉形成的蛋白结合到 DNA 复制源, 启动 DNA 的复制, 形成两个双向的 DNA 复制叉. 在染色体上, 移动的 DNA 复制叉经常会碰到复制障碍(二级 DNA 结构、一些蛋白的结合位点、损伤的碱基等)而暂停下来, 此时, 需要细胞周期检验点的调控来稳定复制叉, 否则, 会导致复制叉垮塌及基因组不稳定. 本文就真核细胞染色体 DNA 复制起始的机制, 以及复制叉稳定性的维持机制进行简要综述.

关键词

DNA 复制源
pre-RC 组装
复制叉稳定性
S 期细胞周期检验点

DNA 复制是细胞生长分裂过程中的一个最基本的生化反应. 准确的染色体 DNA 复制将使子细胞从母细胞里得到一套完整的染色体 DNA, 进行遗传信息的正确传递. 同时, DNA 复制很容易受到各种因素干扰, 使得遗传信息不能完整地传递给子代, 导致细胞基因组的不稳定. 基因组的不稳定会引起非常严重的后果, 如细胞凋亡、癌变甚至直接导致细胞或个体死亡. 经过亿万年的进化, 生物体已发展出一套复杂且极其严整的调控 DNA 复制起始过程和维持基因组稳定性的机制, 来保证细胞基因组在复制过程中的完整性和保真性.

1 真核细胞染色体 DNA 复制起始

在真核生物中, DNA 复制是在染色体上特定位点起始的, 这些位点被称为 DNA 复制源(replication origins). 复制起始蛋白(replication initiation proteins)通过顺序组装结合到复制源上, 最终使每个复制源上形成两个双向的复制叉, 从而起始 DNA 的复制^[1].

1.1 真核细胞 DNA 复制源及复制源的选择

真核生物 DNA 复制源结构在物种间存在较大差异. 芽殖酵母(the budding yeast *S. cerevisiae*)的复制源是长 100~150 bp 的 DNA 序列, 其中一段 11 bp 的

引用格式: 吴丽虹, 刘阳, 孔道春. 真核细胞染色体 DNA 复制起始及复制叉稳定性维持的机制. 中国科学: 生命科学, 2013, 43: 824-832

Wu L H, Liu Y, Kong D C. The mechanism of chromosomal DNA replication initiation and stabilization of replication forks in eukaryotes. SCIENTIA SINICA Vitae, 2013, 43: 824-832, doi: 10.1360/052013-287

保守序列 5'-(A/T)TTTA(T/C)(A/G)TTT(A/T)-3'是复制起始蛋白 ORC(origin recognition complex)的识别及结合位点^[2-4], 这 11 bp 的保守序列是 DNA 复制源活性所必需的. 除了这 11 bp 的保守序列外, 直接邻近这 11 bp 的 DNA 序列也对 DNA 复制源的活性起重要作用, 但它在序列上无保守性. 裂殖酵母(the fission yeast *S. pombe*)的复制源长 500~1500 bp, 长度是芽殖酵母 DNA 复制源长度的 5~10 倍. 裂殖酵母 DNA 复制源一般不含有保守序列, 但至少含有两段或多于两段 20~50 bp 不对称的 AT 丰富序列, 这些 AT 丰富序列在维持 DNA 复制源活性方面起着必需或非常重要的作用^[5-8]. 这些不对称的 AT 丰富序列中, 有部分是 ORC 的结合位点. 每一个 DNA 复制源有 1~2 个 ORC 结合位点, 有些复制源甚至有多于 2 个的 ORC 结合位点^[9-11]. 除了 ORC 结合位点, 裂殖酵母 DNA 复制源还含有别的蛋白结合的必需序列^[10]. 最近, 本实验室确定这个未知蛋白为 Sap1 蛋白(switch-activating protein 1), 同时证明 Sap1 是 DNA 复制起始必需的蛋白, 它的作用是募集 Cdc18(cell division cycle 18)蛋白到复制源, 直接参与 pre-RC (prereplication complex)的组装(未发表实验结果). 高等真核生物(higher eukaryotes)的复制源长 1000~2000 bp^[12,13], 它们也缺乏保守序列. 从长度及缺乏保守序列这两方面考虑, 认为后生动物的复制源和裂殖酵母的复制源在结构上应该是相似的. 本实验室最近的研究进一步支持这个观点, 确定了 Sap1 在高等真核生物的同源蛋白 Girdin(girders of actin filament). 在人细胞中, 它起着和 Sap1 同样的功能(未发表实验结果). 裂殖酵母及高等真核生物 DNA 复制源的结构曾是真核生物 DNA 复制领域里长期未解决的问题, 复制起始蛋白 Sap1 及 Girdin 的发现, 应该使问题基本上得到了解决.

一段 DNA 序列是否含有 ORC 及 Sap1/Girdin 蛋白的结合位点是决定这段 DNA 序列是否具有 DNA 复制源活性的最基本因素, 但仅有这个因素仍然不能确定该复制源是否会在细胞的 S 期起始 DNA 复制及复制源活性的强弱. 一般来说, DNA 复制源的数目远多于 DNA 复制起始的数目. 决定一个 DNA 复制源的强弱、是否在 S 期起始 DNA 复制及在 S 期起始 DNA 复制的时间, 是由许多因子决定的. 这些因子包括该复制源所处的染色质结构、基因转录活跃程

度、DNA 拓扑异构、核小体定位等^[14-16]. 目前, 在这方面的知识仍非常有限, 进一步的研究有望解决这个问题.

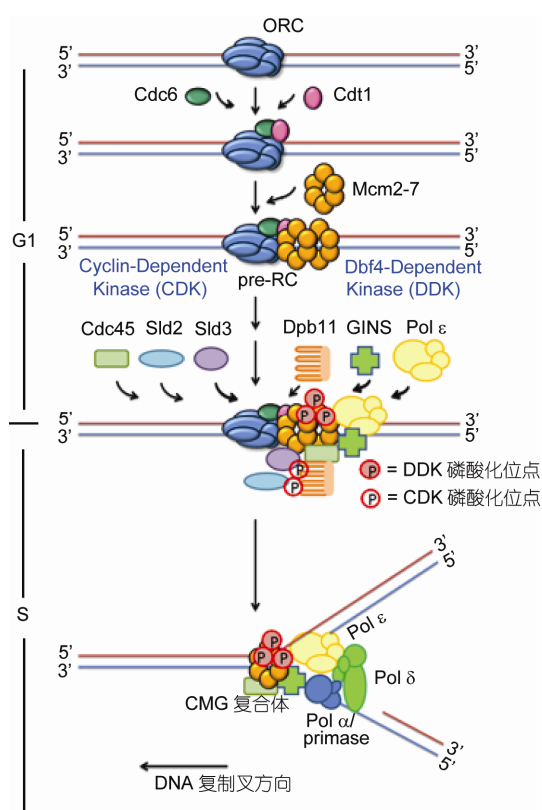
尽管从芽殖酵母到后生动物, DNA 复制源的结构差异显著, 但参与 DNA 复制起始的蛋白在物种间基本上是保守的^[1,17], 这表明在整个真核生物中, DNA 复制起始过程虽有不同的地方, 但基本机制应该是相似的.

1.2 真核细胞染色体 DNA 复制起始过程

在真核细胞染色体 DNA 复制起始的过程中, 尽管许多具体的分子机制尚未被阐明, 但总体而言, DNA 复制起始过程分为两步: (i) 复制源的选择及 pre-RC 的组装; (ii) pre-RC 的激活以及 DNA 复制的起始^[18-20].

如图 1 所示, 在芽殖酵母, ORC 识别并结合到复制源, 作为 pre-RC 组装的平台^[21]; 当细胞进入 G1 期, 染色质结合的 ORC 分别募集 Cdc6(cell division cycle 6)和 Cdt1(Cdc10-dependent transcript 1)到复制源, 接着 ORC, Cdc6 和 Cdt1 共同募集 Mcm2-7(minichromosome maintenance proteins)以二聚体形式结合到复制源上, 组装形成 pre-RC, 此时 Mcm2-7 的解旋酶活性尚未被激活^[22]. 在 G1-S 的转折期, Cdc7-Dbf4 (Dbf4-dependent kinase, DDK, Dbf4 依赖的激酶)和 CDK(cyclin-dependent kinase, 细胞周期蛋白依赖的激酶)两类激酶磷酸化一系列蛋白, 从而使 Sld2-Sld3-Dpb11 介导的 Cdc45 和 GINS(go-ichi-ni-san)等其他必需的复制蛋白结合到 pre-RC 上, 形成具有解旋酶活性的 CMG 复合体(Cdc45-Mcm-GINS), 此时细胞完成了对复制源的激活, 然后进一步进行 DNA 聚合酶介导的链延伸过程^[1,23].

目前, 在芽殖酵母中实现了从 ORC 到 Mcm2-7 的体外组装^[24-26], 证明在体外 ORC, Cdc6 和 Cdt1 足以募集 Mcm2-7 到染色质, 但在其他真核生物中尚未能重复这种顺序组装的过程, 这提示在其他真核生物中, 可能还有未发现的复制起始蛋白参与 pre-RC 组装的过程, 还存在更加复杂的相互作用和调控机制. 本实验室最近发现 Sap1 和 Girdin 直接参与 pre-RC 的组装(未发表实验结果), 这个发现将极大推动人们对裂殖酵母和高等真核生物 pre-RC 组装机制的理解.

图1 芽殖酵母 *S. cerevisiae* DNA 复制起始过程模型

1.3 真核细胞染色体 DNA 复制起始的调控

染色体 DNA 复制起始过程出错会使大量遗传物质改变, 进而导致细胞死亡或恶化转化成肿瘤细胞。但真核生物都有一套严格的调控机制, 以保证在一个细胞周期内, 所有的染色体 DNA 都得到一次复制, 且仅进行一次复制。

CDK 活性在 DNA 复制起始调控中有双重作用。一方面, 当细胞进入 S 期, CDK 活性不断提升, 能激活复制起始蛋白起始 DNA 复制; 另一方面, 在 S, G2 和早 M 期, CDK 活性很高, 又能抑制复制源起始新一轮 DNA 复制。pre-RC 组装只在晚 M/早 G1 期进行, 此时 CDK 活性很低; 当 CDK 活性不断提升到某个水平, pre-RC 被激活, 其他复制蛋白结合到复制源上起始 DNA 复制; 而在 S, G2 和早 M 期, CDK 活性很高, 又能严格抑制 pre-RC 的重组装^[1]。

不同生物在调控 pre-RC 组装上有不同的机制, 包括蛋白酶体降解、转录抑制、核外转运、化学修饰和 Geminin 蛋白抑制等, 防止 pre-RC 在 G1 期外重复组装, 来防止一个细胞周期内 DNA 的重复复制, 这

对维持基因组稳定性非常重要^[19]。

2 DNA 复制叉稳定性的维持

2.1 DNA 复制叉及影响复制叉稳定性的因素

DNA 复制叉是 DNA 复制的基本结构, 主要由“Y”字形的 DNA 以及结合在该处的 DNA 复制相关蛋白组成, 这些蛋白包括: CMG(cdc45/mcm2-7/gins)复合物、DNA 聚合酶(如 Pol α , Pol ϵ 和 Pol δ 等)、聚合酶结合蛋白(如 RFC(replication factor C)等), PCNA (proliferating cell nuclear antigen), Mrc1(mediator of replication checkpoint 1), Tof1(topoisomerase 1-associated factor 1), Csm3(chromosome segregation in meiosis protein 3)和拓扑异构酶以及冈崎片段成熟蛋白(如 Dna2(DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease), Fen1(flapp endonuclease 1)和 ligase 等)^[27]。

复制叉精密而复杂, 因此单个的复制叉很容易受到多种内外源因素的影响而停顿(fork pausing)。在 DNA 复制过程中, 由于 DNA 超螺旋结构的存在, 将导致扭曲应力产生。如果在 DNA 复制过程中, 没有机制来释放这种扭曲力, 将导致在 DNA 复制叉的前端形成紧密的超螺旋, 或在复制叉分支点处的后方形成扭转, 这都将严重影响 DNA 复制的正常进行, 甚至导致 DNA 复制叉垮塌^[28]。DNA 重复序列(如微卫星序列、反向重复序列、镜像或串联重复序列等)^[29]、染色体易碎点^[30,31]、复制叉障碍区(replication fork barriers)^[27]、复制终止区(replication termination)和酵母中的复制减缓区(replication slow zones)^[32]也都将导致复制减慢、暂停或几乎完全停止。在 DNA 代谢过程中, DNA 复制叉与转录复合体的偶然碰撞是不可避免的, 因此转录过程也将导致复制叉停顿^[33]。多种外源性的理化因素也能直接导致复制叉的停顿, 从而影响复制叉的稳定。HU(hydroxyurea, 羟基脲)可以抑制 dNTPs 的合成, 从而产生复制压力, 造成 DNA 复制叉的停顿^[34]。MMS(methyl methanesulfonate)可以甲基化修饰 DNA 链并直接停顿复制叉^[35]。

2.2 S 期细胞周期检验点

细胞周期检验点不仅是指细胞周期中各时期的顺序转换, 更是对维持细胞周期正常秩序的生化调控通路的描述, 即在细胞完成一个生化过程之前, 它可以阻止细胞启动其他生化过程^[36]。总而言之, 细胞

周期检验点保证细胞在完成一个时期的生理活动之前, 不会进入下一时期开始新的任务。

细胞周期检验点通路由 3 部分组成: 信号感知、信号传导和效应发生, 这 3 个过程密切相关, 保证了细胞周期的正确而完整地进行^[37]。本文主要讨论 S 期的细胞周期检验点。

(1) S 期细胞周期检验点的信号激活。细胞生长受到细胞内外多种因子的调节。这些因子对细胞正常生理活动既有积极作用也有负面影响。一些因素会干扰细胞的正常生理活动, 影响细胞周期的正常进行。虽然 S 期细胞中的染色体结构比较松散, 但染色质上存在许多内源的复制障碍物, 这些障碍物会导致复制叉停顿。停顿的复制叉需要 S 期细胞周期检验点来维持复制叉的稳定。在停顿的 DNA 复制叉附近, 往往形成较长片段的单链 DNA。RPA(replication protein A)蛋白可以识别并结合这些单链 DNA, 进而招募其他蛋白, 激活 S 期细胞周期检验点通路。因此, 被 RPA 结合的较长单链 DNA, 加上邻近的单双链 DNA 结构, 被认为是 ATR 通路激活的重要信号。电离辐射也能间接导致复制叉的停顿。电离辐射能直接引起双链 DNA 的随机断裂。断裂的 DNA 是激活 ATM(ataxia telangiectasia mutated protein)通路的重要信号^[38]。

(2) S 期细胞周期检验点的信号传导。S 期细胞周期检验点通路的信号传导主要通过一系列蛋白激酶实现: ATM, ATR(ataxia telangiectasia and Rad3-related protein), DNA-PK(DNA-dependent protein kinase), Chk1(checkpoint kinase 1)和 Chk2 蛋白。其中 ATM, ATR 和 DNA-PK 同属于 PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase related kinase)蛋白激酶家族。Chk1 和 Chk2 分别是 ATR 和 ATM 蛋白的下游底物, 同时也是 S 期细胞周期检验点通路激活的主要标志之一。在维持复制叉稳定性方面, 高等真核生物 ATR-CHK1 和 ATM-CHK2 通路发挥着重要的功能, 下面主要介绍这两条信号通路。

(i) ATM-CHK2 通路。ATM-CHK2 通路主要感知并修复 DNA 双链断裂(DNA double-strand breaks, DSBs)(图 2)。DSBs 可以阻碍复制叉的继续延伸, 影响复制叉的稳定性; 同时 DSBs 还可以导致其附近的复制起始源异常复制起始, 最终影响基因组的稳定。当 DSB 产生后, MRN(Mre11/Rad50/Nbs1)复合物首先识别并结合到断裂的 DNA 双链的末端上。NBS1

(nijmegen breakage syndrome protein 1)的 C 端可以直接与 ATM 蛋白结合, 从而将 ATM 募集到断裂位点附近并被激活^[39]。在 DSB 位点附近, H2AX 组蛋白会被磷酸化, 成为 γ -H2AX 蛋白, 招募相关修复蛋白。激活后的 ATM 可以通过 MDC1 蛋白进一步加强 γ -H2AX 的磷酸化, 从而将 DNA 损伤信号放大, 招募更多的修复相关蛋白。ATM 还可以激活 53BP1 蛋白(p53-binding protein 1), 被激活的 53BP1 蛋白促进 Chk2 蛋白的激活和 BRCA1(breast cancer type 1)蛋白在 DNA 断裂点附近的聚集, 进而招募同源重组修复的相关蛋白到 DSB 位点, 最后完成 DSB 的损伤修复^[40]。ATM-CHK2 通路还在调控细胞周期等方面具有重要功能。被激活的 ATM-CHK2 信号通路可以磷酸化 Cdc25(cell division cycle 25)从而抑制它的磷酸酶活性, 进而使得 CDK 激酶活性不能被激活^[41], 最终将细胞周期暂停在 S 期, 保证细胞有足够的时间完成 DNA 损伤修复。

(ii) ATR-CHK1 通路。当用 MMS 和 HU 等药物处理细胞后, DNA 复制叉由于受到复制压力会停顿下来, 并在停顿的 DNA 复制叉附近产生较长的单链 DNA 片段^[42]。RPA 是单链结合蛋白, 可以感知并结合到这些单链区域。同时, RFC 类似蛋白复合物, 9-1-1(Rad9-Hus1-Rad1), TopBP1(topoisomerase-binding protein 1)结合到该区域的单双链 DNA 结构。然后, 通过和 RPA 相互作用, ATRIP(ATR-interacting protein)-ATR 结合到该位点, 导致 ATR 激酶被激活^[43]。在人细胞的 S 期细胞周期检验点中, ATR 蛋白被激活之后, ATR 激活的下游核心蛋白激酶主要是 Chk1 蛋白。ATR 蛋白通过调控 Chk1 蛋白, 从而控制细胞周期, 稳定停顿复制叉并修复 DNA 损伤(图 3)^[44]。在酵母的 S 期细胞周期检验点中, Chk1 和 Chk2 蛋白的激活都依赖于 ATR 蛋白^[45]。ATR-CHK1 和 ATM-CHK2 通路在 S 期细胞周期检验点中都发挥着重要作用, 但是它们的分工又有不同: ATM-CHK1 通路主要在电离辐射造成的双链 DNA 断裂中起作用; ATR-CHK2 通路则主要在稳定停顿的 DNA 复制叉中起重要作用^[46]。不过, 这两条信号通路并不是孤立的, 而是紧密联系的。在 DSB 损伤修复过程中, ATR 通路也会被激活, 并且这个激活过程依赖于 ATM 蛋白的参与^[47]; 反之, 在 UV 引起的 DNA 损伤和复制叉停顿过程中, ATM 通路也会被激活, 并且依赖于 ATR 和 Chk2 蛋白^[48]。

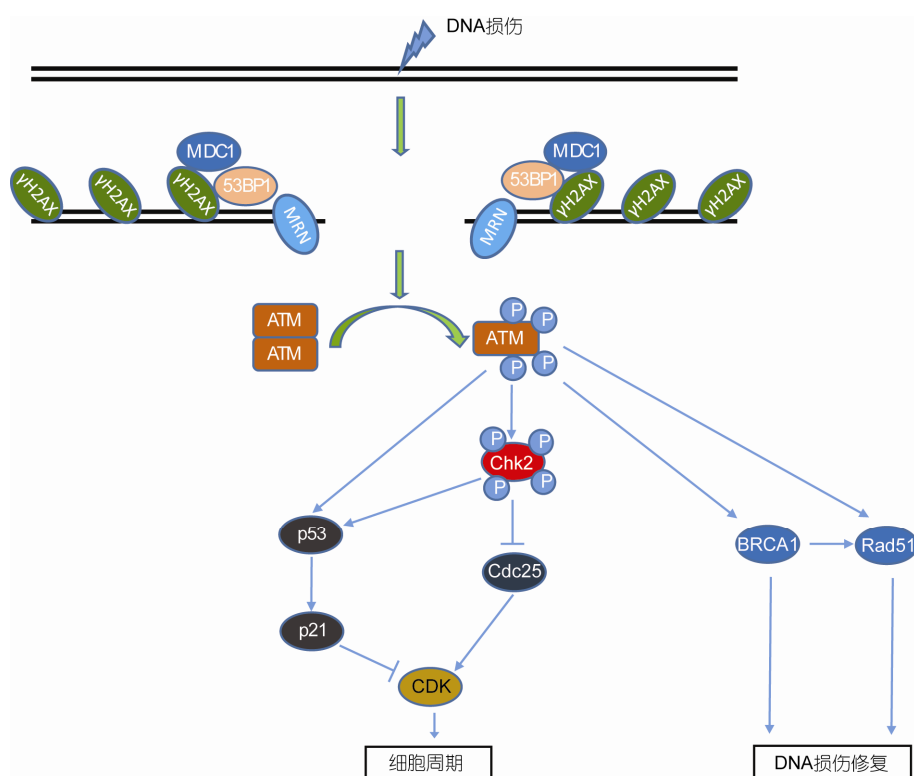


图 2 ATM-Chk2 信号通路

(3) S 期细胞周期检验点的效应发生. S 期细胞周期检验点的效应发生是通过磷酸化调控其他一系列蛋白来实现的. S 期细胞周期检验点通过磷酸化 p53 和 Cdc25 蛋白, 调节细胞周期的进程, 从而将细胞周期停滞或延迟在 S 期, 为细胞修复损伤的 DNA 提供充足的时间. 在 *S. cerevisiae* 中, Rad53 还可以直接磷酸化 Sld3, 抑制晚复制起始源(late origin)的起始^[49]. S 期细胞周期检验点还可以稳定停顿的复制叉, 防止其倒转. 2012 年, 本实验室^[50]发现, 在 *S. pombe* 中, Cds1 蛋白可以直接磷酸化 Dna2 蛋白, 防止被停顿复制叉的倒转.

目前, 关于 S 期细胞周期检验点的效应发生机制的研究仍是该领域的研究重点和热点. 这些研究主要集中在两方面: (i) 研究已知参与 S 期细胞周期检验点蛋白的修饰, 以阐明这些蛋白被 S 期细胞周期检验点调控的具体机制; (ii) 寻找新的 S 期细胞周期检验点的底物. 受 S 期细胞周期检验点调控的生理过程繁多, 而现在已经确定的 S 期细胞周期检验点底物的数量却非常有限, 仍存在大量未知的蛋白有待去鉴

定和发现.

(4) S 期细胞周期检验点与 DNA 复制的关系. S 期细胞周期检验点在 DNA 复制过程中发挥着非常重要的功能, 主要体现在以下几方面:

(i) 维持 DNA 复制过程的正常进行. 正常 DNA 复制过程中, 也有 ATR 介导的基底水平的 Chk1 激活, 以调节 Cdc25A 的活性, 确保细胞周期的正常进行^[51]. S 期细胞周期检验点也可以促进复制叉跨越复制障碍^[29]. 实验证实, *S. cerevisiae* 中, 敲除 Mec1 蛋白(mitosis entry checkpoint protein 1, ATR 的同源蛋白), DNA 复制叉穿过复制屏障的速度明显减缓, 且 DNA 断裂大量增加^[52].

(ii) 稳定停顿的 DNA 复制叉并促进其重启 DNA 复制. 当 DNA 复制叉停顿, S 期细胞周期检验点通路将被快速而有效地激活, 被激活的 S 期细胞周期检验点可以维持 DNA 复制相关蛋白在 DNA 复制叉处的结合, 使得 DNA 复制叉在复制压力解除后可以继续完成 DNA 合成^[53]. 在 S 期细胞周期检验点缺失株中, 停顿的复制叉很容易发生倒转, 如果不能被

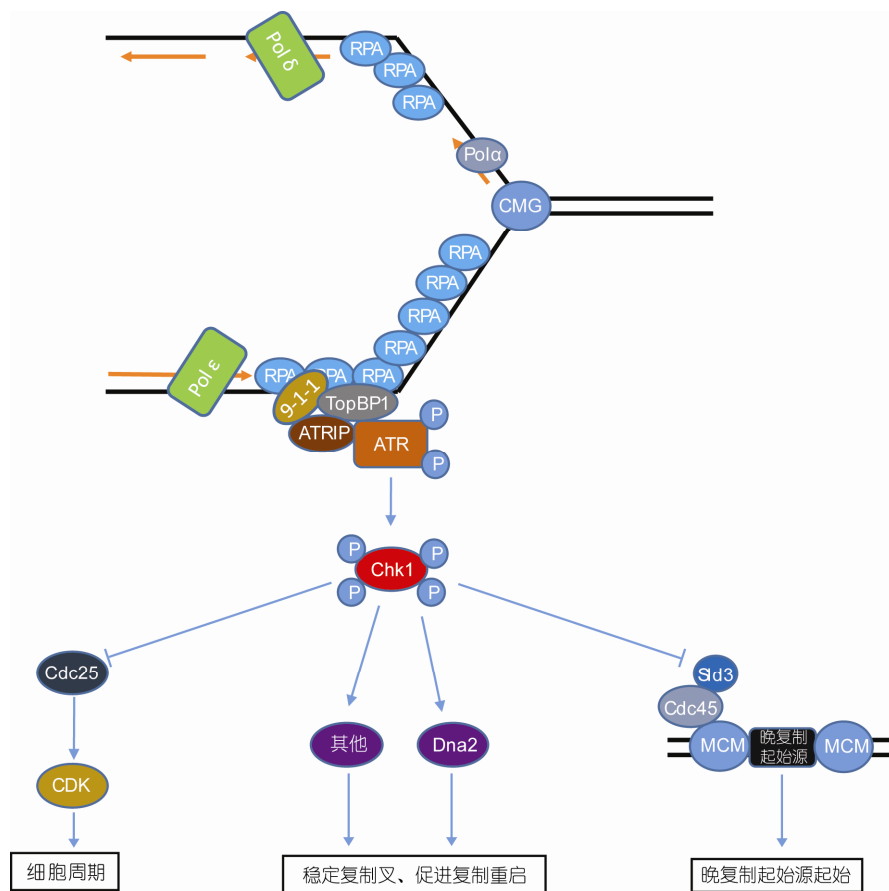


图 3 ATR-CHK1 信号通路

制止, 将直接导致复制叉垮塌^[54]. 2012 年, 本实验室^[50]在 *S. pombe* 中发现, S 期细胞周期检验点通过磷酸化调控 Dna2 蛋白来防止停顿复制叉倒转, 从而更深入地认识了 S 期细胞周期检验点在维持停顿的复制叉中的重要功能. 当复制压力解除后, S 期细胞周期检验点还将促使停顿复制叉继续完成 DNA 复制^[55]. 在 DNA 复制重启过程中, S 期细胞周期检验点将调节一系列蛋白, 其中最重要的是 CMG 复合物和 DNA 聚合酶. 当复制叉被停顿下来后, S 期细胞周期检验点将磷酸化 MCM 蛋白, 稳定 MCM 在停顿复制叉处的结合, 并抑制其解旋酶活性^[56]. DNA 聚合酶与被停顿的复制叉的稳定结合依赖于 ATM, ATR 和 Sgs1 蛋白^[57]. 如果 DNA 聚合酶从被停顿的复制叉上解离, 其与停顿复制叉的再次结合则依赖于 ATM 和 ATR 蛋白^[58]. 总之, S 期细胞周期检验点在整个 DNA 复制过程中都发挥着极其重要的作用, 保证了 DNA 复制精确而完整地进行.

2.3 复制叉稳定性与疾病治疗

复制叉的稳定性直接影响疾病的发生, 同时, 复制叉的稳定性可以用来治疗癌症. 与复制叉稳定性相关的蛋白突变后, 将导致多种非常严重的疾病发生. 例如, AT 综合征是由 ATM 蛋白突变后导致的^[39]; RecQ 家族的 BLM (Bloom's syndrome protein) 和 WRN (Werner syndrome protein) 突变后将分别导致 BLM 综合征和早衰^[59,60]; BRCA1 或 BRCA2 突变后, 也将大大提高个体罹患乳腺癌、卵巢癌等疾病的风险^[61].

由于癌细胞的分裂增殖比多数正常体细胞快很多, 因此, 常将能影响复制叉稳定性的试剂作为治疗癌症的药物. 例如, 能造成复制叉停顿的 HU 和 MMS 最早就被作为抗癌药物使用; 能造成 DNA 断裂的 CPT (camptothecin) 也是常用的抗癌药物. 电离辐射被用于治疗癌症也是由于它能直接造成 DNA 的断裂, 从而影响 DNA 复制的完成, 最后导致细胞凋亡或死亡^[62]. 因此, 深入研究影响复制叉稳定性的机制,

对于了解疾病发生和设计癌症治疗方案有重要的指导作用.

3 展望

目前, 关于真核细胞染色体 DNA 复制起始方面的研究已经取得了很大进展, 但还有许多关键问题有待解决. 例如, 在除芽殖酵母外的其他真核生物中, DNA 复制源是如何被选择的, 染色体的结构如何影响复制源的选择? 在除芽殖酵母外的其他真核生物中, pre-RC 组装的具体生化机制是怎样的? pre-RC 组装及调控的分子机制是什么? 继 pre-RC 组装后复制

源的激活过程, 其具体的分子机制是什么? 目前, 全基因组测序及高分辨率成像技术的兴起, 将会推动 DNA 复制领域研究达到新的广度和深度.

关于维持复制叉稳定性方面的研究主要集中在: 寻找新的维持复制叉稳定性的机制、鉴定已有信号通路中相关蛋白的调节修饰以及研究各个通路在维持复制叉稳定性方面的协同作用. 最近几年的研究, 已经鉴定了参与复制或损伤修复检验点通路的很多相关蛋白, 它们在维持复制叉稳定性、促进停顿复制叉重新开始复制等方面都有重要作用. 但是, 这些研究只是打开了一扇大门, 维持复制叉稳定性的细节机制仍需继续深入地研究.

参考文献

- 1 Bell S P, Dutta A. DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem*, 2002, 71: 333–374
- 2 Marahrens Y, Stillman B. A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements. *Science*, 1992, 255: 817–823
- 3 Newlon C S, Theis J F. The structure and function of yeast ars elements. *Curr Opin Genet Dev*, 1993, 3: 752–758
- 4 Palzkill T G, Newlon C S. A yeast replication origin consists of multiple copies of a small conserved sequence. *Cell*, 1988, 53: 441–450
- 5 Clyne R K, Kelly T J. Genetic analysis of an ARS element from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J*, 1995, 14: 6348–6357
- 6 Dubey D D, Kim S M, Todorov I T, et al. Large, complex modular structure of a fission yeast DNA replication origin. *Curr Biol*, 1996, 6: 467–473
- 7 Kim S M, Huberman J A. Multiple orientation-dependent, synergistically interacting, similar domains in the ribosomal DNA replication origin of the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol*, 1998, 18: 7294–7303
- 8 Okuno Y, Satoh H, Sekiguchi M, et al. Clustered adenine/thymine stretches are essential for function of a fission yeast replication origin. *Mol Cell Biol*, 1999, 19: 6699–6709
- 9 Kong D, DePamphilis M L. Site-specific DNA binding of the *Schizosaccharomyces pombe* origin recognition complex is determined by the Orc4 subunit. *Mol Cell Biol*, 2001, 21: 8095–8103
- 10 Kong D, DePamphilis M L. Site-specific ORC binding, pre-replication complex assembly and DNA synthesis at *Schizosaccharomyces pombe* replication origins. *EMBO J*, 2002, 21: 5567–5576
- 11 Lee J K, Moon K Y, Jiang Y, et al. The *Schizosaccharomyces pombe* origin recognition complex interacts with multiple AT-rich regions of the replication origin DNA by means of the AT-hook domains of the spOrc4 protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 13589–13594
- 12 Dijkwel P A, Hamlin J L. The Chinese hamster dihydrofolate reductase origin consists of multiple potential nascent-strand start sites. *Mol Cell Biol*, 1995, 15: 3023–3031
- 13 Aladjem M I, Rodewald L W, Kolman J L, et al. Genetic dissection of a mammalian replicator in the human beta-globin locus. *Science*, 1998, 281: 1005–1009
- 14 Aggarwal B D, Calvi B R. Chromatin regulates origin activity in *Drosophila* follicle cells. *Nature*, 2004, 430: 372–376
- 15 Kohzaki H, Murakami Y. Transcription factors and DNA replication origin selection. *Bioessays*, 2005, 27: 1107–1116
- 16 Masai H, Matsumoto S, You Z, et al. Eukaryotic chromosome DNA replication: where, when, and how? *Annu Rev Biochem*, 2010, 79: 89–130
- 17 Kelly T J, Brown G W. Regulation of chromosome replication. *Annu Rev Biochem*, 2000, 69: 829–880
- 18 Mendez J, Stillman B. Perpetuating the double helix: molecular machines at eukaryotic DNA replication origins. *Bioessays*, 2003, 25: 1158–1167
- 19 Arias E E, Walter J C. Strength in numbers: preventing rereplication via multiple mechanisms in eukaryotic cells. *Genes Dev*, 2007, 21: 497–518
- 20 Diffley J F. Regulation of early events in chromosome replication. *Curr Biol*, 2004, 14: R778–R786

- 21 Bell S P, Stillman B. ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature*, 1992, 357: 128–134
- 22 Diffley J F, Cocker J H, Dowell S J, et al. Two steps in the assembly of complexes at yeast replication origins *in vivo*. *Cell*, 1994, 78: 303–316
- 23 Sclafani R A, Holzen T M. Cell cycle regulation of DNA replication. *Annu Rev Genet*, 2007, 41: 237–280
- 24 Evrin C, Clarke P, Zech J, et al. A double-hexameric MCM2-7 complex is loaded onto origin DNA during licensing of eukaryotic DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 20240–20245
- 25 Remus D, Beuron F, Tolun G, et al. Concerted loading of Mcm2-7 double hexamers around DNA during DNA replication origin licensing. *Cell*, 2009, 139: 719–730
- 26 Tsakraklides V, Bell S P. Dynamics of pre-replicative complex assembly. *J Biol Chem*, 2010, 285: 9437–9443
- 27 Branzei D, Foiani M. Maintaining genome stability at the replication fork. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11: 208–219
- 28 Postow L, Crisona N J, Peter B J, et al. Topological challenges to DNA replication: conformations at the fork. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 8219–8226
- 29 Mirkin E V, Mirkin S M. Replication fork stalling at natural impediments. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2007, 71: 13–35
- 30 Barlow J H, Faryabi R B, Callén E, et al. Identification of early replicating fragile sites that contribute to genome instability. *Cell*, 2013, 152: 620–632
- 31 Durkin S G, Glover T W. Chromosome fragile sites. *Annu Rev Genet*, 2007, 41: 169–192
- 32 Casper A M, Nghiem P, Arlt M F, et al. ATR regulates fragile site stability. *Cell*, 2002, 111: 779–789
- 33 Azvolinsky A, Giresi P G, Lieb J D, et al. Highly transcribed RNA polymerase II genes are impediments to replication fork progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol cell*, 2009, 34: 722–734
- 34 Wright J A, Chan A K, Choy B K, et al. Regulation and drug resistance mechanisms of mammalian ribonucleotide reductase, and the significance to DNA synthesis. *Biochem Cell Biol*, 1990, 68: 1364–1371
- 35 Wyatt M D, Pittman D L. Methylating agents and DNA repair responses: methylated bases and sources of strand breaks. *Chem Res Toxicol*, 2006, 19: 1580–1594
- 36 Nasmyth K. Viewpoint: putting the cell cycle in order. *Science*, 1996, 274: 1643–1645
- 37 Osborn A J, Elledge S J, Zou L. Checking on the fork: the DNA-replication stress-response pathway. *Trends Cell Biol*, 2002, 12: 509–516
- 38 Symington L S, Gautier J. Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu Rev Genet*, 2011, 45: 247–271
- 39 McKinnon P J. ATM and ataxia telangiectasia. *EMBO Rep*, 2004, 5: 772–776
- 40 Lavin M F. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9: 759–769
- 41 Stolz A, Ertych N, Bastians H. Tumor suppressor CHK2: regulator of DNA damage response and mediator of chromosomal stability. *Clin Cancer Res*, 2011, 17: 401–405
- 42 Sogo J M, Lopes M, Foiani M. Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects. *Science*, 2002, 297: 599–602
- 43 Paulsen R D, Cimprich K A. The ATR pathway: fine-tuning the fork. *DNA Repair (Amst)*, 2007, 6: 953–966
- 44 Smith J, Tho L M, Xu N, et al. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv Cancer Res*, 2010, 108: 73–112
- 45 Tanaka K, Russell P. Cds1 phosphorylation by Rad3-Rad26 kinase is mediated by forkhead-associated domain interaction with Mrc1. *J Biol Chem*, 2004, 279: 32079–32086
- 46 Ciccio A, Elledge S J. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol cell*, 2010, 40: 179–204
- 47 Jazayeri A, Falck J, Lukas C, et al. ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol*, 2006, 8: 37–45
- 48 Stiff T, Walker S A, Cerosaletti K, et al. ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling. *EMBO J*, 2006, 25: 5775–5782
- 49 Zegerman P, Diffley J F. Checkpoint-dependent inhibition of DNA replication initiation by Sld3 and Dbf4 phosphorylation. *Nature*, 2010, 467: 474–478
- 50 Hu J, Sun L, Shen F, et al. The intra-S phase checkpoint targets Dna2 to prevent stalled replication forks from reversing. *Cell*, 2012, 149: 1221–1232
- 51 Shechter D, Costanzo V, Gautier J. ATR and ATM regulate the timing of DNA replication origin firing. *Nat Cell Biol*, 2004, 6: 648–655
- 52 Cha R S, Kleckner N. ATR homolog Mec1 promotes fork progression, thus averting breaks in replication slow zones. *Science*, 2002, 297: 602–606

- 53 Lopes M, Foiani M, Sogo J M. Multiple mechanisms control chromosome integrity after replication fork uncoupling and restart at irreparable UV lesions. *Mol Cell*, 2006, 21: 15–27
- 54 Lopes M, Cotta-Ramusino C, Pelliccioli A, et al. The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. *Nature*, 2001, 412: 557–561
- 55 Petermann E, Helleday T. Pathways of mammalian replication fork restart. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11: 683–687
- 56 Ilves I, Tamberg N, Botchan M R. Checkpoint kinase 2 (Chk2) inhibits the activity of the Cdc45/MCM2-7/GINS (CMG) replicative helicase complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 13163–13170
- 57 Cobb J A, Bjergbaek L, Shimada K, et al. DNA polymerase stabilization at stalled replication forks requires Mec1 and the RecQ helicase Sgs1. *EMBO J*, 2003, 22: 4325–4336
- 58 Trenz K, Smith E, Smith S, et al. ATM and ATR promote Mre11 dependent restart of collapsed replication forks and prevent accumulation of DNA breaks. *EMBO J*, 2006, 25: 1764–1774
- 59 Ellis N A, Lennon D J, Proytcheva M, et al. Somatic intragenic recombination within the mutated locus *BLM* can correct the high sister-chromatid exchange phenotype of Bloom syndrome cells. *Am J Hum Genet*, 1995, 57: 1019–1027
- 60 Meisslitzer C, Ruppitsch W, Weirich-Schwaiger H, et al. Werner syndrome: characterization of mutations in the *WRN* gene in an affected family. *Eur J Hum Genet*, 1997, 5: 364–370
- 61 Petrucelli N, Daly M B, Feldman G L. BRCA1 and BRCA2 hereditary breast and ovarian cancer. In: Pagon R A, Adam M P, Bird T D, et al, eds. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, 1998
- 62 Wang J C. DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem*, 1996, 65: 635–692

Mechanisms of Chromosomal DNA Replication Initiation and Stabilization of Replication Forks in Eukaryotes

WU LiHong, LIU Yang & Kong DaoChun

National Laboratory of Protein and Plant Genes, College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China

In eukaryotes, DNA replication initiates at multiple and specific sites on chromosomal DNA. When cells are in late M and G1 phases, Cdc6/Cdc18, Cdt1 and MCM are loaded to ORC binding sites on DNA replication origins to form pre-RC (pre-replication complex). Pre-RC is activated at the transition of G1 to S phase. Subsequently, those proteins that act at replication forks bind to DNA origins to form two bidirectional replication forks for initiating DNA synthesis. On chromosome, the moving replication forks often encounter replication fork barriers (DNA secondary structure, some protein binding sites, damaged bases) and stall. The stalled forks require checkpoint control to maintain fork stability; otherwise, stalled forks will collapse and genomic integrity is compromised. This article gives a brief review about current understanding of the mechanism of replication initiation and replication fork stabilization.

DNA replication origins, pre-RC assembly, replication fork stability, S phase checkpoint

doi: 10.1360/052013-287