

细胞周期的驱动及其调控

吴家睿

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031. E-mail: wujr@sunm.shcnc.ac.cn)

摘要 细胞周期是生命活动中一个最重要的过程, 对它的研究也是现代生命科学的一个主要内容. 从大量的研究文献以及最新进展中选择了一些具有代表性的工作, 对细胞周期的驱动及其调控进行了较为全面的总结和评述. 细胞周期运行的动力主要来自依赖周期蛋白激酶(CDK), 它的活性则通过周期蛋白(cyclin)和依赖周期蛋白激酶抑制剂(CKI)进行控制. 细胞周期的调控方式有两种: 正调控——在满足细胞周期某些特定阶段的生长条件后细胞周期才能进行; 负调控——保证细胞周期运行质量的检查机制, 只有当异常事件出现时这类调节机制才被激活, 被称为细胞周期检查点. 细胞周期的分子调控机理可分为两类: 质的控制, 主要指蛋白质的磷酸化状态和在细胞内空间位置的控制; 量的控制, 指蛋白质的表达和降解. 这些调控方式相互制约或进行耦联, 形成一个复杂的细胞周期分子调控网络.

关键词 细胞 细胞周期 限制点 复制起始位置决定点 检查点

细胞增殖的过程称为细胞周期. 在细胞周期中, 最主要的事件是遗传信息的载体 DNA 复制成两份拷贝, 并通过有丝分裂的方式将两份拷贝分配到两个子代细胞内. 由此, 细胞周期划分为 DNA 合成期(S 期)和有丝分裂期(M 期), 在 M 期结束后和 S 期开始前的间隙期称为 G1 期, 而在 S 期结束后和 M 期开始前的间隙期称为 G2 期^[1].

1 细胞周期引擎

如果把细胞周期看做是一种周而复始的运动, 那么其推动力主要来自依赖周期蛋白激酶(cyclin dependent kinase, CDK), 即特定的蛋白激酶开动并磷酸化适当的蛋白质, 这些蛋白质性质由此而来的改变使得细胞周期的时相进行转换. 比如在哺乳动物细胞中, CDK4/CDK6 和 CDK2 对一种肿瘤抑制蛋白 Rb 进行磷酸化, 从而释放 Rb 对 E2F 的转录抑制作用, 启动了一系列进入 S 期所必需的基因的表达, 推动细胞进入 S 期^[2~4]. 最近发现, 芽殖酵母的 CDK 对 DNA 复制的起始复合物“ORC”的磷酸化被用来防止 S 期复制后 DNA 的再复制(re-replication)^[5]. 在单细胞真核生物里, 负责细胞周期内蛋白质磷酸化的 CDK 通常只有一种, 在芽殖酵母中是 Cdc28, 在裂殖酵母里是 Cdc2. 然而, 在多细胞真核生物中, 参与细胞周期的 CDK 则有许多种. 例如在人体细胞内, 控制 G1 期的主要是 CDK2, CDK4 和 CDK6; S 期和 G2 期依赖于 CDK2; 而 M 期则主要由 CDK1(Cdc2)负责^[6].

由于细胞周期的各个时相内有着不同的事件发生, 因此作为推动细胞周期运行的 CDK 的活性受到严格的调节. 人们发现, 调节 CDK 活性的任务主要是由一类被称为周期蛋白(cyclin)的蛋白质负责^[6]. CDK 单体以及 CDK-cyclin 复合体的晶体结构分析表明, CDK 以单体形式存在时, 其催化中心被掩盖在内部, 因而 CDK 单体没有活性; 而 cyclin 的结合导致了 CDK 蛋白结构的变化, 催化中心暴露出来, 形成了有活性的 CDK^[7]. 在芽殖酵母中, 虽然负责细胞周期的 CDK 仅有一种——Cdc28, 但与它结合的周期蛋白却有 9 种之多. 在 G1 期内, Cdc28 与 G1 期 cyclin Cln1, Cln2 和 Cln3 结合; 在 S 期内, Cdc28 与 B 型 cyclin Clb5 和 Clb6 结合; 而在 G2 期和 M 期内, Cdc28 分别与 B 型 cyclin Clb1, Clb2, Clb3 和 Clb4 相结合. 在哺乳动物细胞中, 不同的 CDK 在相应的细胞周期各时相中与不同的周期蛋白相结合. 在 G1 期中, CDK2 与 cyclin E 结合, CDK4 和 CDK6 与 cyclin D 相结合; 在 S 期和 G2 期时 CDK2 则与 cyclin A 结合; 而在 M 期时, CDK1 与 cyclin B 结合^[8].

CDK 的活性除了受 cyclin 的正向调节外, 还受另外一类蛋白质的负向调节. 这类蛋白被称为依赖周期蛋白激酶抑制剂(cyclin-dependent kinase inhibitors, CKI)^[9]. 在芽殖酵母里, 现已发现 2 种 CKI: Far1 抑制 Cdc28-Cln 复合体的活性^[10]; Sic1 则通过抑制 Cdc28-Clb5, 6 复合物来调节细胞进入 S 期的时间^[11]. 在裂殖酵母的 G1 期, 依赖周期蛋白激酶抑制剂 Rum1 结合在 Cdc2-Cdc13 复合体上, 并维持 Cdc13 蛋白在低

水平,以防止不成熟的 M 期形成^[12]. 哺乳动物细胞里存在有两类 CKI, 一类是 Cip/Kip 家族, 它包括 p21, p27 和 p57 3 种 CKI; 另一类是 Ink4 家族, 它拥有 p15, p16, p18 和 p19 4 种 CKI. 前一类主要参与调节 G1 期和 G1/S 转型期中 CDK2 和 CDK4/6 与 cyclin 的复合体的活性; 后一类则限于抑制 CDK4/6-cyclin D 复合体的活性^[9].

综上所述, 我们可以得到一个细胞周期运行的简化图景: cyclin 负责正调控, 与 CDK 的结合引起 CDK 的活化; 而 CKI 进行负调控, 与 CDK-cyclin 复合物的结合将抑制其活性. 如果把 CDK 视为细胞周期的“引擎”, 那么 cyclin 可以被认为是“油门”, CKI 则是“刹车”. 这三者组成了负责细胞周期运行的驱动装置. 不过人们已经发现, 驱动细胞周期运行的真实情况远远要复杂得多. 例如 CKI 通常被认为是抑制 CDK 蛋白激酶活性, 但近年来的研究工作发现, Cip/Kip 家族的蛋白质帮助 cyclin D 和 CDK 复合物的形成, 从而激发 CDK4/6-cyclin D 的活性^[13,14]. 因此, 研究细胞周期运行的驱动装置精细结构以及各组成部分间相互作用的复杂性和多样性是目前细胞周期研究领域的重要内容.

2 细胞周期的正调控——限制点和复制起始位置决定点

细胞周期是一个不可逆的过程. 在正常情况下, 一旦 DNA 复制开始了, 随后就会进入有丝分裂状态, 最终形成两个子代细胞. 因此, 细胞通常在 G1 期需要通过某些机制来决定是否进入细胞周期(S 期). 在酵母细胞里, G1 期有一个调控点, 称为“开始点”(start); 而在哺乳动物细胞的 G1 期里, 存在一个与“开始点”相似的调控点, 称为“限制点”(restriction point, R point)^[11].

研究者在 20 世纪 70 年代中期发现, 哺乳动物细胞的 G1 期中, 存在有一个特定的时间点. 在这个点之前, 如果缺少外界生长信号(通常是肽生长因子)或某些必需的营养成分(如必需氨基酸), 细胞会终止其 G1 期的进程, 进入一种称之为 G0 期的“休眠”状态. 一旦补充了所缺少的成分后, 细胞将会从 G0 期回到 G1 期, 继续其细胞周期的进程. 然而, 过了这个时间点之后, 纵然缺少生长因子或营养成分, 细胞仍将通过 G1 期并进入 S 期. 这样一个时间点被称为限制点^[15].

近年来的研究表明, 调控限制点的分子机制主要是通过控制 Rb 的磷酸化状态来实现的. 在限制点之前, Rb 处于低磷酸化状态. 这时它与一种转录激活因子 E2F 相结合, 并抑制 E2F 的活性, 导致了对进入 S 期所必需的一系列基因的表达不能进行^[3]. 如果满足了细胞的生长条件, 细胞内的 CDK4/6-cyclin D 将被活化, 对 Rb 进行磷酸化. 随后 Rb 又被 CDK2-cyclin E 复合物进一步过磷酸化^[2]. 过磷酸化了的 Rb 处于失活状态, 不能与 E2F 结合. 这就使得 E2F 的转录激活作用得以发挥, 启动了一系列基因的表达, 从而使细胞通过限制点, 最终推动细胞进入 S 期. Rb 对转录的抑制有两种主要的方式. Rb 可以结合到 E2F 的激活区域, 从而阻断 E2F 的转录激活能力^[3,16]. 此外, Rb 可以和 E2F 形成复合物结合到启动子上, 直接抑制转录^[17,18]. 最新的研究表明, Rb 还可以与影响染色质结构的蛋白质相结合, 如组蛋白去乙酰转移酶(histone deacetylase)和组蛋白甲基化酶(histone methylase), 使染色质处于转录抑制状态^[19~21].

尽管 Rb 被认为是控制限制点的主要分子, 但是并不排除其他因子的参与. p130 蛋白是 Rb 家族的一员, 可以和 E2F 形成复合物. 在 Rb 缺失的细胞里, p130 被 CDK2-cyclin E 复合物过磷酸化, 从而释放 E2F^[22]. 另有实验报道, 限制点的分子控制机理可能至少有两种: 依赖 Rb 的和 not 依赖 Rb 的^[23]. 目前, not 依赖 Rb 的控制限制点的分子机理还很不清楚, 值得进一步研究.

DNA 复制的起始标志着细胞周期的启动. 因此, 对 DNA 复制起始的调控是控制细胞周期的关键环节. 作者和 Gilbert 等人^[24]发现, 如果把处于 G1 期早期的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞核放在爪蟾卵抽提物中进行体外复制, DNA 复制起始位置是随机的, 但如果把处于 G1 中晚期的 CHO 细胞核放在抽提物中复制, 其复制起始位置就与细胞自身体内复制起始位置一致, 不再是随机的了. 这一结果表明, 在高等真核生物细胞周期的 G1 期中, 存在一个 DNA 复制定点起始的调控点. 我们称这个点为“复制起始位置决定点”(origin decision point, ODP)^[24]. 进一步的研究表明, 复制起始位置决定点位于限制点之前, 并对蛋白激酶抑制剂 2-aminopurine 敏感, 意味着某种(某些)蛋白激酶可能参与了这一调控过程^[25,26]. 这个新的细胞周期调控点的发现把细胞周期调控与 DNA 复制的起始控制机制联系了起来. 因此, 对复制起始位置

决定点的作用机理和在细胞周期调控中所起的功能的研究可能是今后细胞周期正调控的一个研究热点。

3 细胞周期的负调控——检查点

细胞在长期的进化过程中发展出了一套保证细胞周期中 DNA 复制和染色体分配质量的检查机制,通常称为细胞周期检查点(checkpoint)^[27]。这是一类负反馈调节机制。只有当细胞周期进程中出现异常事件,如 DNA 损伤或 DNA 复制受阻,这类调节机制才会被激活,以便及时地中断细胞周期的运行;待细胞修复或排除了故障后,细胞周期又可以恢复运转。从检查点的工作方式来看,可把检查点分为 3 个部分。第 1 个部分是探测器(sensors),它负责检查质量问题;第 2 个部分是传感器(signal transducers),它把“出了质量问题”的信号传递给第 3 部分——效应器(effectors),由效应器去中断细胞周期进程并开动修复机制。根据“质量控制”的内容,又可将细胞周期检查点分为 3 种。第 1 种负责查看 DNA 有无损伤,称为 DNA 损伤检查点;第 2 种负责 DNA 复制的进度,称为 DNA 复制检查点;第 3 种是管理染色体的正确分配已否,称为纺锤体组装检查点。

由于 DNA 损伤可以发生在细胞周期的任一个时期,且 DNA 损伤有许多种类,所以存在多种探测 DNA 损伤的手段。它们可以在不同的时期对特定的 DNA 损伤进行检测。在芽殖酵母细胞的 G1 和 G2 期, DNA 损伤由至少两种检查点蛋白进行感知:一种是 Rad9;另一种是 Rad24^[28]。Rad24 与 DNA 复制因子 RFC 的组分非常接近,可能也是通过形成一种类似于 RFC 的 DNA-下载因子,供其他修复蛋白因子结合^[29]。但是, Rad9 和 Rad24 在探测 S 期的 DNA 损伤时不起主要作用,而是 DNA 复制机器的某些组分,如 Pole 和 Drc1 负责进行检查^[30,31]。我们实验室最近发现,少量的 DNA 损伤并不能激活检查点的反应,细胞必须有一定数量的 DNA 损伤时 Rad9 蛋白才会有明显的增加^[32]。这一结果意味着,探测 DNA 损伤和激活检查点的反应可能是不同的机制。在 DNA 损伤检查点的信号传递方面人们了解得要比探测方面深入。ATM 和 ATR 是两类负责 DNA 损伤信号传递的关键蛋白激酶^[33]。它们激活后可以对下游的蛋白激酶 Chk1 和 Chk2 进行磷酸化^[34,35]。磷酸化的 Chk1 和 Chk2 进一步影响其他蛋白质,如 p53 和 cdc25 的活性^[36,37]。发现问题之后,检查点的主要任务就是中止细胞周期的运行。例如, G1 期 DNA 损伤可以引起

p53 的积累和活化; p53 则可以诱导 p21 转录的增加, p21 则抑制 CDK 的活性,从而导致 G1 期的休止^[38]。最近又发现, p53 还可以通过降低 cyclin B1 的表达控制 G2 期的休止^[39]。

对 DNA 复制检查点来说,在检测 DNA 复制的完成情况时,常常是通过参与 DNA 复制的蛋白质来进行。例如 DNA 合成酶 Pole 的 C 末端就可能具有探测 DNA 复制的完成的功能^[40]。在裂殖酵母中, Rad12 基因编码一种解旋酶(helicase)。它能对 DNA 复制的抑制做出反应,并通过调节其下游的 Rad9 而开启检查点机器^[41]。DNA 复制检查点的工作方式主要是采用磷酸化。在芽殖酵母细胞中, DNA 复制检查点的反应依赖 Mik1/Tel1 激酶对 Rad53 激酶进行磷酸化^[42]。活化的 Rad53 激酶又可以磷酸化参与 DNA 复制的蛋白质如 DNA 合成酶,从而终止 S 期的运行^[43]。检查点除了要停止细胞周期的运行外,还需要防止或排除故障。最新的研究揭示,当芽殖酵母的 DNA 复制受到药物抑制时,具有正常 Rad53 的细胞的 DNA 复制又保持完整,而 Rad53 突变的细胞的 DNA 复制又则发生断裂。说明 Rad53 在 DNA 复制中断时起到了保护 DNA 复制叉的作用^[44]。

在有丝分裂期,染色体的正确分配依赖于纺锤体微管蛋白在着丝点上的正确结合。研究人员在酵母细胞里发现,尚未和微管结合的着丝点可以引发纺锤体装配检查点的反应^[45]。进一步的研究揭示,纺锤体装配检查点的分子机制主要有两个途径:一个称为 Mad2 途径,它通过抑制 Pds1 蛋白的降解阻止分裂末期的开始。另一个则是 Bub2 途径,通过抑制 cyclin 蛋白的降解使细胞停留在有丝分裂期^[46]。检查点把细胞分裂和染色体复制的循环相互连接起来,使二者的运动互相牵制,这种线路的连接导致了严格的交替和基因组的完整。

越来越多的研究表明,细胞周期检查点功能的丧失与细胞癌变紧密相关。因为基因组的损伤或异常是肿瘤形成的主要原因,而细胞周期检查点正是细胞保证其基因组稳定的重要手段^[47,48]。因此,细胞周期检查点的失控和基因组不稳定与肿瘤发生的关系是当前生物学家和临床医学研究者共同关心的问题。

4 细胞周期的质的调节

通常是蛋白质分子负责细胞周期的运行和调控。

所谓质的改变主要是指蛋白质通过磷酸化、糖基化和乙酰化等各种修饰作用发生活性或功能的改变. 在细胞周期的运行和调控中, 最主要的方式就是调节和改变蛋白质的磷酸化状态. CDK 之所以具有推动细胞周期运行的功能, 就在于它可以在不同的时相对适当的蛋白质进行磷酸化. 此外, CDK 自身的活性不仅受 cyclin 和 CKI 的控制, 细胞还用磷酸化的方式对 CDK 活性进行更为精细的调节, 即对 CDK 的不同位点的磷酸化以增加或抑制 CDK 的活性. 在 CDK 的活性区域内有一个称为 “T-loop” 的结构. 研究表明, 只有当 T-loop 被磷酸化后, CDK 的活性中心才能完全暴露, 从而使 CDK2 的激酶活性增加 80 ~ 300 倍^[49]. 随后的研究发现, 细胞内存在有一类对 T-loop 磷酸化的蛋白激酶, 它们被称为活化 CDK 激酶(CDK-activating kinase, CAK)^[50]. 对 CDK 的磷酸化也可以用来抑制 CDK 的酶活性. 在裂殖酵母里存在一类蛋白激酶, 如 *wee1* 和 *mik1*, 它们专门对 Cdc2 上第 15 位酪氨酸残基进行磷酸化, 导致 Cdc2 活性的下降^[17].

在细胞内磷酸化与去磷酸化是紧密偶联在一起的. 最经典的例子是蛋白激酶 *wee1* 和 *mik1* 与磷酸酯酶 Cdc25 对 Cdc2 上第 15 位酪氨酸残基磷酸化状态的控制. 当细胞准备进入 M 期之前, *wee1* 和 *mik1* 的活性下降, Cdc25 的活性升高, 将 Cdc2 第 15 位酪氨酸残基上磷酸基团去除, 从而使 Cdc2 的激酶活性增加^[51]. 在细胞周期检查点激活的情况下, 一方面是防止 *wee1* 的降解^[52]; 另一方面则是通过 Rad3 对下游的 Chk1 激酶进行磷酸化, 而 Chk1 则进一步磷酸化 Cdc25, 磷酸化的 Cdc25 失去对 Cdc2 进行去磷酸化的功能; 最终抑制了 Cdc2 的活性, 使细胞停留在 G2/M 期^[53].

磷酸化的调控方式不仅有高度可逆和响应快的优点, 还可以使蛋白质的调节更为精致和多样化. 研究者发现, 检查点蛋白激酶 Rad53 上含有 2 个 FHA 区域. 磷酸化的 Rad9 只能结合在 FHA2 上. 有可能 Rad9 在 G1 和 G2 期与 Rad53 的 FHA2 结合, 以启动这 2 个时期的 DNA 损伤检查点的工作. 而另外的蛋白激酶则在磷酸化后与 Rad53 的 FHA1 结合以启动 S 期的 DNA 损伤检查点反应^[54]. 前面说过, 芽殖酵母的 Sic1 抑制 Cdc28-Clb 的活性; 对 Sic1 进行磷酸化并导致其降解是细胞进入 S 期的主要条件. 最新的研究揭示, Sic1 蛋白磷酸化程度的大小才是启动降解的关键. 如果 Sic1 蛋白上 5 个或低于 5 个的特定位点 (CPD consensus) 被磷酸化, Sic1 仍未开始降解; 只有

当 Sic1 被进行第 6 次或 6 次以上的磷酸化时, Sic1 才会被降解. 也就是说, Sic1 蛋白的磷酸化程度成为一个控制 G1 期长短的时钟^[55]. 可以预见, 今后研究者将更注重对蛋白质翻译后修饰如磷酸化或糖基化对细胞周期精密调控的研究.

细胞周期中蛋白质性质改变的另一种类型是指蛋白质空间位置和分布的改变. 在这里把这种空间的调控方式也称之为 “质的改变”. 一般说来, 涉及细胞周期调控的两个最主要的胞内区域是细胞质与细胞核. 大部分与细胞周期过程有关的事件都发生在细胞核内, 因此蛋白质从细胞质向细胞核的输入或从细胞核向细胞质的输出也就成了细胞周期调控的重要方式. 一个典型的例子就是磷酸酯酶 Cdc25 活性的调控. 非磷酸化状态的 Cdc25 存在于核内, 并且可以对 CDK1 进行去磷酸化从而激活 CDK1, 启动 M 期. 当 DNA 受到损伤并激活了蛋白激酶 Chk1 后, Chk1 可以将 Cdc25 磷酸化. 这种磷酸化 Cdc25 会被一种属于 14-3-3 蛋白家族的 RAD24 结合后带出细胞核, 导致了细胞核内的 CDK1 保持其磷酸化和失活状态, 使细胞停滞在 G2 期^[56]. 此外, 人们还发现 cyclin D-CDK 复合物也受到空间的调控. 在 G1 期时它们在细胞质内进行装配, 然后通过分子伴侣蛋白 Hsp90 和 Map 蛋白激酶的途径帮助, 将该复合物输送到细胞核内^[57]; 在 S 期时, cyclin D-CDK 复合物被转送到细胞质并被泛肽蛋白酶系统降解 (ubiquitin-mediated proteolysis)^[58,59].

在细胞内, 有些蛋白质是按顺序出现, 其角色没有重叠. 但也有一些蛋白质会同时存在并且有活性. 这时就必须依赖于空间对它们的活性加以调节. 例如在哺乳动物细胞 cyclin B 的家族中, cyclin B2 存在于内质网和高尔基体上; 而 cyclin B1 则在核与胞质之间穿梭, 并在 M 期时转移至核内; 此外, cyclin B1 也能与微管和中心粒相结合^[60]. 也就是说, 动物细胞内至少有两类 cyclin 与 CDK 的复合物, 一类是在核内, 另一类是在胞浆内, 它们起着不同的作用.

过去一段时间, 人们对蛋白质空间位置和分布的改变与细胞周期的影响没有给予足够的重视, 注意力主要放在时间的变化上. 随着认识的深入, 从时空结合这样一种 “四维” 角度研究细胞周期调控已得到了研究者的共识.

5 细胞周期的量的调节

细胞周期的不同时期中, 许多蛋白质的数量会

出现波动,有时多有时少.这种量的变化也是细胞周期的重要调控方式.它包括两个方面:一是量的增加,即基因转录和蛋白质的表达;二是量的减少,即蛋白质被蛋白酶降解.这类调控的典型就是周期蛋白.例如在哺乳动物细胞, cyclin A 在晚 G1 期开始表达,在 S 期表达量达到最高点,然后在晚 M 期被蛋白酶降解.而 cyclin B 则在晚 S 期开始产生,到 G2 期达到最高点,然后在晚 M 期被蛋白酶降解.这类蛋白因其含量随细胞周期的进程呈现周而复始的有规律的变化,因此获得了“cyclin”这一名称^[61,62].显然,细胞周期蛋白质的量的调控与质的调控方式不一样,其增减是不可逆的.正是因为这种不可逆性,保证了细胞周期各种时相的有序和单向的转换.

在细胞周期中,基因转录的调控主要依赖于对各种转录因子的磷酸化.首先,磷酸化可以激活许多转录因子的活性. p53 是细胞周期检查点的一种重要调控蛋白,它能够刺激或抑制转录.当 DNA 受到损伤时, p53 可以被许多蛋白激酶磷酸化而激活其转录活性^[63].例如它在 S 期或 G2/M 期可以被 Cdk2-cyclin A 和 Cdc2/cyclin B 磷酸化,刺激其对 DNA 的结合,诱导 p21 和 GADD45 基因的转录^[64];它也可以被 DNA 损伤检查点的两种主要的蛋白激酶 ATM 和 ATR 磷酸化而激活其转录活性^[65,66].其次,磷酸化也可以用来抑制转录因子的活性,例如 Rb 和 E2F. Rb 的磷酸化的机理和功能前面已有许多讨论,这里介绍有关 E2F 的磷酸化情况. E2F 负责激活从 G1 期进入 S 期所需要的基因的转录.进入 S 期后, E2F 可以和 Cdk2-cyclin A 结合并被后者磷酸化,导致 E2F 对 DNA 结合能力的下降并失去转录激活功能^[67,68].

细胞周期蛋白还可能直接对转录过程进行调控.真核生物绝大部分的 mRNA 转录是通过 RNA 聚合酶 II 来进行的. RNA 聚合酶 II 的工作不仅受到许多转录激活因子和转录抑制因子的复杂控制,而且还依赖于与该酶形成复合物的众多转录因子.一个让人吃惊的发现是,转录因子 TF II H 的一个亚基是涉及细胞周期调节的 CDK7/cyclin H 蛋白激酶复合物^[69]. CDK7-cyclin H 复合物是 CAK 的一种,主要负责对控制细胞周期的 CDK 进行磷酸化^[50].研究者发现^[70], CDK7 复合物对 RNA 聚合酶 II 的羧基末端的区域(carboxyl-terminal domain, CTD)进行磷酸化.这一磷酸化过程被认为对移走转录过程中促进子(promoter)上的结合蛋白发挥着重要的作用.

参与细胞周期运行和调控的蛋白质的降解是通过泛肽途径(ubiquitin pathway)来进行的.在这一途径中,待降解的蛋白质会被标记上一种有 76 个氨基酸残基的小分子量多肽——ubiquitin,然后被一种 26S 蛋白酶复合体所识别并予以降解^[71].显然,这里关键的一步是正确地识别应该给予以降解的蛋白质并将其进行泛肽标记.现已发现两种负责这一工作的蛋白质复合物.第一类称为 SCF (Skp1-cullin-F-box-protein complex),第二类则称为 APC (anaphase-promoting complex)^[72].

SCF 主要调节 G1 期向 S 期的转换^[73].通常这个复合物至少含有 Cdc34, Cdc4, Cdc53 和 Skp1 4 种成分; Cdc34 是其核心,负责将泛肽与蛋白质相连接^[74].芽殖酵母 SCF 所选择的待降解蛋白质主要有: G1 cyclin, Clins CDK 抑制剂 Sic1 和 Far1.哺乳动物 SCF 的作用底物则可能有 cyclin D 和 cyclin E, CDK 抑制剂 p21, p27 和 p57 等^[72,73].

APC 是参与 M 期调控的核心成员^[75].在人的细胞和蛙卵里, APC 至少有 10 个亚单位,而芽殖酵母的 APC 则由 12 个组分所构成^[76].在 M 期 APC 主要参与 2 个事件的进程:姊妹染色单体在 M 晚期的分离以及细胞结束末期进入新的 G1 期.芽殖酵母的 APC 涉及到待降解的蛋白质有 M 期的 cyclins,末期的抑制蛋白 Pds1 和纺锤体蛋白 Ase1 等.人细胞的 APC 的反应对象则有 cyclin A 和 cyclin B 等^[77].在对果蝇的 APC 研究中人们发现,这些底物的降解有着一定的顺序和不同的功能, cyclin A 的降解有利于染色体的分离,并为 cyclin B 的降解所必需;而 cyclin B 的降解帮助染色体向两端移动,是 cyclin B3 降解的先决条件; cyclin B3 的降解则是细胞结束 M 期的前提^[78].

需要强调的是,在细胞周期分子调控机制中,不仅量的增加与减少紧密相关,相互依赖;而且量和质之间的调控也同样有着密切的关系.例如,磷酸化参与了基因转录调控和蛋白质泛肽降解.研究者发现, APC 的磷酸化或去磷酸化可以用来调节 APC 的活性.它的某些亚基可以被 CDK-cyclin B 复合物磷酸化^[79].最近还发现一种小分子量的蛋白质 Suc1 能与 CDK1 复合物结合并调节 APC 的磷酸化状态.如果 Suc1 蛋白被人为地去除, APC 的亚基 Cdc27 的磷酸化就不能进行, cyclin B 也不会被降解^[80].前面提到的 Sic1 蛋白磷酸化程度控制 Sic1 的降解也是一个很好的例

子^[55]。因此,在细胞内,这些调控方式相互制约或进行耦联(cross-talk),形成了一个复杂的细胞周期分子调控网络。如果说过去对细胞周期的研究偏重单个基因或蛋白质以及单一调控通路,那么未来细胞周期研究的核心内容将是阐明细胞周期的分子调控网络。

致谢 本工作为国家杰出青年科学基金(批准号:39825115)、国家重点基础研究发展规划(批准号:G1999053901)和中国科学院“百人计划”资助项目。

参 考 文 献

1 Nurse P. Along twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell*, 2000, 100: 71~78

2 Lundberg A S, Weinberg R A. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol*, 1998, 18: 753~761

3 Flemington E K, Speck S H, Kaelin W J. E2F-1-mediated transactivation is inhibited by complex formation with the retinoblastoma susceptibility gene product. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 6914~6918

4 Harbour J W, Luo R X, Dei Sante A, et al. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interaction that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell*, 1999, 98: 859~869

5 Nguyen V Q, Co C, Li J J. Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms. *Nature*, 2001, 411: 1068~1073

6 Morgan D O. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1997, 13: 261~291

7 Jeffrey P D, Russo A A, Polyak K, et al. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclin A-CDK2 complex. *Nature*, 1995, 376: 313~320

8 Roberts J M. Evolving ideas about cyclins. *Cell*, 1999, 98: 129~132

9 Sherr C J, Roberts J M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G₁-phase progression. *Genes Dev*, 1999, 13: 1501~1512

10 Jeong D I, Oehlen L J, Cross F R. Cln3-associated kinase activity in *Saccharomyc cerevisiae* is regulated by the mating factor pathway. *Mol Cell Biol*, 1998, 18: 433~441

11 Correa-Bordes J, Nurse P. p25 rum1 orders S phase and mitosis by acting as an inhibitor of the p34cdc2 mitotic kinase. *Cell*, 1995, 83: 1001~1009

12 Schwob E, Bohm T, Mendenhall M D, et al. The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G₁ to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell*, 1994, 79: 233~244

13 LaBaer J, Garrett L F, Stevenson J M, et al. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev*, 1997, 11: 847~862

14 Cheng M P, Olivier J A, Diehl M, et al. The p21^{Cip1} and p27^{Kip1} CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J*, 1999, 18: 1571~1583

15 Pardee A B. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974, 71: 1286~1290

16 Helin K, Harlow E, Fattaey A. Inhibition of E2F-1 mediated transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol*, 1993, 13: 6501~6508

17 Sellers W R, Rodgers J W, Kaelin W J. A potent transrepression domain in the retinoblastoma protein induces a cell cycle arrest when bound to E2F sites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 11544~11548

18 Adnane J, Shao Z, Robbins P D. The retinoblastoma susceptibility gene product represses transcription when directly bound to the promoter. *J Biol Chem*, 1995, 270: 8837~8843

19 Brehm A, Miska E, McCance D J, et al. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature*, 1998, 391: 597~601

20 Magnaghl-Jaulin L, Groisman R, Naguibneva I, et al. Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature*, 1998, 391: 601~605

21 Nieisen S J, Schneider R, Mauer U, et al. Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature*, 2001, 412: 561~565

22 Cheng L, Rossi F, Fang W, et al. Cdk2-dependent phosphorylation and functional inactivation of the pRB-related p130 protein in pRB(-), p16^{INK4A}(+) tumor cells. *J Biol Chem*, 2000, 275: 30317~30325

23 Herrera R E, Sah V P, Williams B O, et al. Altered cell cycle kinetics, gene expression, and G₁ restriction point regulation in Rb-deficient fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 1996, 16: 2402~2407

24 Wu J R, Gilbert D M. A distinct G₁ step required to specify the Chinese hamster DHFR replication origin. *Science*, 1996, 271: 1270~1272

25 Wu J R, Gilbert D M. The replication origin decision point is a mitogen-independent, 2-aminopurine sensitive G₁-phase step that precedes restriction point control. *Mol Cell Biol*, 1997, 17: 4312~4321

26 Wu J R, Keezer S M, Gilbert D M. Transformation abrogates an early G₁-phase arrest point required for specification of the Chinese hamster DHFR replication origin. *EMBO J*, 1998, 17: 1810~1818

27 Hartwell L, Weinert T. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, 1989, 246: 629~634

28 De la Torre-Ruiz M A, Green C M, Lowndes N F. RAD9 and RAD24 define two additive, interacting branches of the DNA damage checkpoint pathway in budding yeast normally required for Rad53 modification and activation. *EMBO J*, 1998, 17: 2687~2698

29 Green C M, Erdjument-Bromage H, Tempst P, et al. A novel Rad24 checkpoint complex closely related to replication factor C. *Curr Biol*, 1999, 10: 39~42

30 Navas T A, Zhou Z, Elledge S J. DNA polymerase epsilon links the DNA replication machinery to the S phase checkpoint. *Cell*, 1995, 80: 29~39

31 Wang H, Elledge S J. DRC1, DNA replication and checkpoint protein 1, function with DPB11 to control DNA replication and the S-phase checkpoint in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 3824~3829

32 Jiang M R, Yang Y, Wu J R. Activation of DNA damage checkpoints in CHO cells requires a certain level of DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 287: 775~780

33 Zhou B S, Elledge S J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 2000, 408: 433~439

34 Liu Q, Guntuku S, Cui X S, et al. Chk1 is an essential kinase that is regulated by ATR and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev*, 2000, 14: 1448~1459

35 Chaturvedi P, Eng W K, Zhu Y, et al. Mammalian Chk2 is a downstream effector of the ATM-dependent DNA damage checkpoint pathway. *Oncogene*, 1999, 18: 4047~4054

36 Shieh S Y, Ahn J, Tamai K, et al. The human homologs of checkpoint kinase Chk1 and Cds1(Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev*, 2000, 14:

- 289~300
- 37 Furnari B, Blasina A, Boddy M N, et al. Cdc25 inhibited in vivo and in vitro by checkpoint kinases Cds1 and Chk1. *Mol Biol Cell*, 1999, 10: 833~845
 - 38 Vogelstein B, Lane D, Levine A J. Surfing the p53 network. *Nature*, 2000, 408: 307~310
 - 39 Innocente S A, Abrahamson J A, Cogswell J P, et al. p53 regulates a G₂ checkpoint through cyclin B1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 2147~2152
 - 40 Dua R, Levy D L, Campbell J L. Role of the putative zinc finger domain of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase epsilon in DNA replication and the S/M checkpoint pathway. *J Biol Chem*, 1998, 273: 30046~30055
 - 41 Davey S, Han C S, Ramer S A, et al. Fission yeast rad12⁺ regulates cell cycle checkpoint control and is homologous to the Bloom's syndrome disease gene. *Mol Cell Biol*, 1998, 18: 2721~2728
 - 42 Sanchez Y, Desany B A, Jones W J, et al. Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways. *Science*, 1996, 271: 357~360
 - 43 Pelliccioli A, Lucca C, Liberi G, et al. Activation of Rad53 kinase in response to DNA damage and its effect in modulating phosphorylation of the lagging strand DNA polymerase. *EMBO J*, 1999, 18: 6561~6572
 - 44 Lopes M, Cotta-Ramusino C, Pelliccioli A, et al. The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. *Nature*, 2001, 412: 557~561
 - 45 Rieder C L, Cole R W, Khodjakow A, et al. The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *J Cell Biol*, 1995, 130: 941~948
 - 46 Clarke D J, Giménez-Abian J F. Checkpoints controlling mitosis. *BioEssays*, 2000, 22: 351~363
 - 47 Hoeijmakers J H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 2001, 411: 366~374
 - 48 Schär P. Spontaneous DNA damage, genome instability, and cancer — when DNA replication escapes control. *Cell*, 2001, 104: 329~332
 - 49 Morgan D O. Principles of CDK regulation. *Nature*, 1995, 374: 131~134
 - 50 Solomon M J. The function(s) of CAK, the p34^{cdc2}-activating kinase. *Trends Biochem Sci*, 1994, 19: 496~500
 - 51 Gautier J, Solomon M J, Booher R N, et al. Cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2. *Cell*, 1991, 67: 197~205
 - 52 Michael W M, Newport J. Coupling of mitosis to the completion of S phase through Cdc34-mediated degradation of Wee1. *Science*, 1998, 282: 1886~1889
 - 53 Martinho R G, Lindsay H D, Flaggs G, et al. Analysis of Rad3 and Chk1 protein kinases defines different checkpoint responses. *EMBO J*, 1998, 17: 7239~7249
 - 54 Walworth N C. Rad9 comes of age. *Science*, 1998, 281: 185~186
 - 55 Nash P, Tang X, Orlicky S, et al. Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication. *Nature*, 2001, 414: 514~521
 - 56 Lopez-Girona A, Furnari B, Mondesert O, et al. Nuclear localization of Cdc25 regulated by DNA damage and 14-3-3 protein. *Nature*, 1999, 397: 172~175
 - 57 Stepanova L, Leng X, Parker S B, et al. Mammalian p50Cdc37 is a protein kinase-targeting subunit of Hsp90 that binds and stabilizes Cdk4. *Genes Dev*, 1996, 10: 1491~1502
 - 58 Diehl J A, Cheng M, Roussel M F, et al. Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev*, 1998, 12: 3499~3511
 - 59 Diehl J A, Zindy F, Sherr C J. Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev*, 1997, 11: 957~972
 - 60 Jackman M, Firth M, Pines J. Human cyclin B1 and B2 are localised to strikingly different structure: B1 to microtubules, B2 primarily to the Golgi apparatus. *EMBO J*, 1995, 14: 1646~1654
 - 61 Sherr C J. Mammalian G1 cyclins. *Cell*, 1993, 73: 1059~1065
 - 62 Koepp D M, Harper J W, Elledge S J. How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell*, 1999, 97: 431~434
 - 63 Mudryj M, Devoto S H, Hiebert S W, et al. Cell cycle regulation of the E2F transcription factor involves an interaction with cyclin A. *Cell*, 1991, 65: 1243~1253
 - 64 Dynlacht B D, Moberg K, Lees J A, et al. Specific regulation of E2F family members by cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol*, 1997, 17: 3867~3875
 - 65 Giaccia A J, Kastan M B. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev*, 1998, 12: 2973~2983
 - 66 Wang Y, Prives C. Increased and altered DNA binding of p53 by S and G2/M but not G1 cyclin-dependent kinases. *Nature*, 1995, 376: 88~91
 - 67 Banin S, Moyal L, Shieh S, et al. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*, 1998, 281: 1674~1677
 - 68 Tibbetts R S, Brumbaugh K M, Williams J M, et al. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev*, 1999, 13: 152~157
 - 69 Nigg E A. Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control? *Curr Opin Cell Biol*, 1996, 8: 312~317
 - 70 Feaver W J, Gileadi O, Li Y, et al. CTD kinase associated with yeast RNA polymerase II initiation factor b. *Cell*, 1991, 67: 1223~1230
 - 71 Laney J, Hochstrasser M. Substrate targeting in the ubiquitin system. *Cell*, 1999, 97: 427~430
 - 72 Peters J. SCF and APC: the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis. *Curr Opin Cell Biol*, 1998, 10: 759~768
 - 73 Krek W. Proteolysis and the G1-S transition: the SCF connection. *Curr Opin Genet Dev*, 1998, 8: 36~42
 - 74 Feldman R M, Correll C C, Kaplan K B, et al. A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sicp. *Cell*, 1997, 91: 221~230
 - 75 Morgan D O. Regulation of the APC and the exit from mitosis. *Nature Cell Biol*, 1999, 1: E47~E53
 - 76 Page A M, Hieter P. The anaphase-promoting complex: new subunits and regulation. *Annu Rev Biochem*, 1999, 68: 583~609
 - 77 Peters J. Subunits and substrates of the anaphase-promoting complex. *Exp Cell Res*, 1999, 248: 339~349
 - 78 Parry D H, O'Farrell P H. The schedule of destruction of three mitotic cyclins can dictate the timing of events during exit from mitosis. *Curr Biol*, 2001, 11: 671~683
 - 79 Sorensen C S, Lukas C, Kramer E R, et al. A conserved cyclin-binding domain determines functional interplay between anaphase-promoting complex-Cdh1 and cyclin A-Cdk2 during cell cycle progression. *Mol Cell Biol*, 2001, 21: 3692~3703
 - 80 Shteinberg M, Hershko A. Role of Suc1 in the activation of the cyclosome by protein kinase Cdk1/cyclin B. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 257: 12~18

(2001-12-12 收稿, 2002-02-21 收修改稿)