

TRENDS IN CELL BIOLOGY

Vol.2.1997

细胞生物学 动态

● 第二卷

翟中和 主编

北京师范大学出版社

细胞生物学动态

Trends in Cell Biology

第 二 卷

(1997)

北京师范大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

细胞生物学动态：第二卷/翟中和主编. —北京：北京
师范大学出版社，1998. 7

ISBN 7-303-04768-9

I. 细… II. 翟… III. 细胞学：生物学-研究 IV. Q28

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (98) 第 11446 号

北京师范大学出版社出版发行

(北京新街口外大街 19 号 邮政编码:100875)

出版人:谢维和

北京师范大学印刷厂印刷 全国新华书店经销

开本:787mm×1092mm 1/16 印张:13.5 字数:321 千字

1998 年 10 月第 1 版 1998 年 10 月第 1 次印刷

印数:1~2 000 定价:18.00 元

编辑委员会

| | | | | | |
|-------|-----------|---------|-----|-----|-----|
| 主 编 | 翟中和 | | | | |
| 副 主 编 | 郝 水 | 王永潮 | 汤雪明 | 王钦南 | |
| 编 委 | (以姓氏笔划为序) | | | | |
| | 丁明孝 | 王亚辉 | 左嘉客 | 庄临之 | 刘树森 |
| | 许智宏 | 邢 苗 | 孙方臻 | 孙敬三 | 李靖炎 |
| | 吴 旻 | 吴祖泽 | 张 博 | 张惟杰 | 陈 竺 |
| | 陈建国 | 陈慰峰 | 杨弘远 | 杨福愉 | 周柔丽 |
| | 贺福初 | 桂建芳 | 贾敬芬 | 徐永华 | 章静波 |
| | 裴 钢 | 薛绍白 | | | |
| 秘 书 | 陈建国 (兼) | 张 博 (兼) | 陈丹英 | | |

出版说明

根据国家自然科学基金委细胞生物学战略课题组专家的建议,并征求国内一些生物学专家的意见,为适应国内外细胞生物学发展的形势,并为制订我国细胞生物学研究战略与计划提供依据,决定出版“细胞生物学动态”年评,每年一卷,主要目的是介绍国际细胞生物学发展与新动态,以最新最活跃的细胞生物学前沿领域与新的热点为主要内容。其中以综述性文章为主,兼顾刊登短评、快讯及国际国内成果和学术会议动态。以科学研究工作者、高校教师、研究生与大学生为主要对象。我们希望“细胞生物学动态”的出版能为促进我国细胞生物学研究的发展、不断提高细胞生物学教学质量做一些铺路的工作。

《细胞生物学动态》编委会

1997. 8.

征 稿 简 则

一、宗旨：《细胞生物学动态》是为适应细胞生物学迅速发展的情势而创办的综合性年评，介绍细胞生物学（包括分子生物学）前沿领域的发展动态与新的热点，以促进国内细胞生物学的研究与国际水平接轨，并为制订我国细胞生物学研究战略与计划提供依据。

稿件类型：以综述性文章为主，兼顾刊登短评、快讯及国际国内成果和学术会议动态。

读者对象：以科学研究工作者、高校教师、研究生与大学生为主要对象。

二、字数：6 000~20 000 字，由作者根据需要酌定。

格式：题目

作者

作者单位及地址

正文

参考文献：择主要的引用，超过 60 篇的不加文章名。以在文中出现的先后顺序附于文末，文中以“上标^[1]”形式出现。具体格式如下（请注意标点符号）：

1. 作者. 题目. 期刊名, 年份, 卷数(期数): 起止页数(起止页数间用“~”)

2. 作者. 题目. 书名. 主编. 出版社所在地: 出版社名称, 年份, 起止页数

注意：作者要引全。

名词术语：在文中第一次出现时最好注明英文名称。

计量单位：采用国际单位制。

插图请用绘图笔在硫酸纸上绘好。

三、以上请严格规范，否则将予以退稿。

四、来稿请用打印件，最好能提供软盘，请存成 TXT 文件。

五、来稿请寄：北京大学生命科学学院翟中和教授或张博博士（邮编：100871）。

本卷内容简介

本卷内容分为细胞周期调控与细胞凋亡、植物生殖机制、细胞骨架、细胞发育与生物活性分子、细胞工程与技术等五个专题。细胞周期调控与细胞凋亡依然是细胞生物学领域的研究热点，本刊在第一卷的基础上继续刊登有关这方面内容的专题，着重介绍细胞周期调控机制研究的新进展，特别是有关细胞固有检验点的研究以及动物胚胎发育过程中的细胞周期调控机制的研究，并首次介绍胞质分裂的调控机理；在细胞编程性死亡方面着重介绍细胞凋亡的基因调控机制，细胞凋亡与疾病的关系，特别是氧化砷诱导白血病细胞凋亡和分化的细胞分子机制。植物生殖机制的研究一直是植物细胞生物学的研究热点，本专题包括被子植物无融合生殖的机制及钙-钙调素信使系统在花粉萌发、花粉生长及生殖细胞分裂中的作用等内容。中间纤维作为细胞骨架的一类，在不同种类的细胞中结构相似但成分各异，纤维装配机制的研究逐渐深入而功能研究仍似雾里看花，由此一直吸引着人们的研究兴趣。在细胞骨架专题中，一方面介绍了中间纤维的一种重要类型——神经丝的结构与功能，另一方面对中间纤维结构与装配的研究进展进行了总结。在细胞发育与生物活性分子专题中集中介绍了与人类自身密切相关的医学细胞生物学的内容，如人肝细胞生成素及其与肝再生的关系，哺乳类红细胞的生成及其分子机制，细胞粘附分子的结构与功能，粘膜表面免疫保护的细胞和分子基础以及一种新的肿瘤抑制因子P16的研究进展。在本卷的细胞工程与技术专题中介绍了人抗体工程研究的新进展及生物技术领域一种理想的细胞体系——花粉与花粉管；随着近年来电脑科技的日新月异，计算机在生物科学研究中的应用也迅速发展起来。研究人员不仅能利用国际互联网(Internet)与国内外同行进行学术交流，及时了解国际细胞生物学的发展动态，而且计算机的多种功能已在他们的研究工作中发挥着无可替代的作用，为此本专题特刊载一文介绍计算机在生物科学研究领域的应用。

目 录

细胞周期调控与细胞凋亡

- 细胞周期调控机制..... 江虹 王永潮(1)
- 细胞周期检验点调控研究进展..... 陈晓波 王永潮(17)
- 动物胚胎发育的细胞周期调控..... 桂建芳(26)
- 胞质分裂..... 李存玺 王永潮(33)
- 细胞凋亡的基因调控机制..... 杨建民 刘连瑞(41)
- 氧化砷诱导白血病细胞凋亡和分化的细胞分子机制研究
- 陈国强 朱军 陈赛娟等(48)

植物生殖机制

- 被子植物无融合生殖的机制..... 刘永胜 孙敬三(53)
- 钙-钙调素信使系统在花粉萌发、花粉管生长及生殖细胞分裂中的作用.....
- 范六民 杨弘远 周嫦(63)

细胞骨架

- 神经丝的结构与功能..... 佟向军 陈建国 翟中和(72)
- 中间纤维结构与装配的研究进展..... 闵光伟 翟中和(84)

细胞发育与生物活性分子

- 人肝细胞生成素及其与肝再生的关系..... 贺福初(95)
- 哺乳类红系细胞的生成及其分子机制..... 刘世广 章静波(101)
- 细胞粘附分子的结构与功能..... 周同 王伟铭 汤雪明(112)
- 粘膜表面免疫保护的细胞和分子基础..... 杨贵波(130)
- P¹⁶——一种新的肿瘤抑制子的研究进展
- 李昱 王艾琳 章静波(155)

细胞工程与技术

- 人抗体工程研究新进展..... 阎锡蕴(159)
- 花粉与花粉管：生物技术领域理想的细胞体系..... 李一勤(167)
- 计算机在生物学中的应用..... 赵允 翟俊辉(189)

细胞周期调控与细胞凋亡

细胞周期调控机制

江虹 王永潮

(北京师范大学生物系细胞增殖与调控生物学开放实验室, 北京 100875)

真核细胞周期最基本的内容就是细胞内遗传物质 DNA 准确地复制并分到两个子细胞中。对应于这两个主要事件, 人们将细胞周期分为 S 期 (DNA 复制), M 期 (姊妹染色单体分离), 以及二者之间的间隔期: G₁ 期 (为 S 期作准备), G₂ 期 (为 M 期作准备)。那么, 细胞周期各时相如何准确有序又周而复始地进行呢? 这是一个引人入胜的问题。几十年来对酵母、海胆、海星、海蛤、蛙卵以及培养细胞的遗传和生化研究, 使人们对这一问题的认识逐步走向深入和明朗。

一、细胞周期引擎 (cell cycle engine)

长期以来对酵母与周期相关温度敏感株及原生动、培养细胞和蛙卵细胞融合的研究, 导致了与细胞周期进程相对应的一套 Ser/Thr 激酶系统-CDKs (cyclin-dependent kinases) 的发现^[1,2]。各种 CDKs 沿周期时相依次交替活化, 磷酸化相应底物, 使周期事件有条不紊地进行下去。例如, 在哺乳类细胞中, CDK4 和 cyclinD 结合, 在限制点 R 起作用; CDK2 和 cyclinD、E 在晚 G₁、早 S 期结合, 在 G₁/S 转换中起作用; 而 CDK2-cyclinA 则在整个 S 期都有活性; CDC2 可以和 cyclinA 或 B (但不会和 cyclinD、E) 在晚 G₂ 或末期 (telophase) 之前形成有激酶活性的复合物^[18,19,153]。

细胞内 CDK 的水平在正常细胞周期中基本保持稳定, 各种 CDK 活性的交替调节主要是在翻译后进行的。CDK 的活化需要与 cyclin 结合并由 CDK-activating kinase (CAK) 磷酸化一个保守的 Thr。有活性的 CDK-cyclin 复合物可以通过磷酸化一对保守的 Thr/Tyr 或者与 CDK 抑制亚基 (CKIs) 结合而受到抑制。许多调节 CDKs 的蛋白组分已被鉴定, 但对这些调控系统内在的生化原理的了解还很不^[3]。

1. CDK 催化亚基

CDKs 是一组在大小 (35~40kD) 和序列 (同源性>40%) 上密切相关, 并能与 cyclin 调节亚基结合且被后者活化的一组蛋白, CDKs 的定义并没有生物功能的限定, 尽管大多数 CDKs 参与了细胞周期调控, 但参与其它功能的 CDKs 也不断出现^[4~7]。

许多蛋白激酶与 CDKs 密切相关, 但只有很少一部分有 cyclin 依赖活性。早先在裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 中, 发现只有 CDC2 起主要作用; 后来在芽殖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中发现了它的同源物 CDC28^[4,8,9,10]。在人细胞中不断增加的 CDKs 现在包括以下基本成员: CDC2 (CDK1)、CDK2 至 CDK7。目前对 CDK 结构和功能的了解主要建立在对几种

CDK 原型的研究基础上,它们是裂殖酵母中的 CDC2,芽殖酵母中的 CDC28 以及脊椎动物中的 CDC2 和 CDK2,但还不清楚它们调控的细节是否在整个家族中保守^[3]。

典型的 CDK 催化亚基包含一个 300aa 的催化核,它在单体和未磷酸化时是完全没有活性的,人 CDK2 脱辅基酶的晶体结构显示,它由至少两个主要的结构上的约束而保持非活性状态:第一,底物结合位点被伸出的 T 绊环封锁;第二,ATP 结合位点内的侧链定向使得 ATP 磷酸根移位,不能有效地进行磷酸传递。迄今为止,对 CDK2 伴随与 cyclin 结合及被磷酸化而来的构象上的改变还一无所知^[3,11,12]。

2. CDK 通过结合 cyclin 活化

CDK 活性的主要调控者是 cyclin,CDK-cyclin 复合物构成了细胞周期引擎^[3,13]。最初 cyclin 定义为浓度水平在细胞周期中摆动的蛋白,现在则更确切地定义为在结构上相关与 CDK 催化亚基结合并使之活化的一个蛋白家族。cyclins 之间的同源性主要局限于相对保守的 100aa 的区域——cyclin box,这一结构负责与 CDK 结合并使后者活化^[14,15]。这一区域的突变同时抑制结合与活化,表明这两项功能是不易分开的。每种 CDK 与特定子集(subset)的 cyclin 结合,尽管这一子集的大小不同。例如,CDC28 和许多不同的 cyclins 结合(9种)^[16],而人的 CDC2 则与较少种类的 cyclins 作用。另外,一种哺乳类 cyclin 有时可以和多种 CDKs 作用^[17]。由于没有对 CDK-cyclin 结合动力学做详尽的分析,我们对这一过程的了解还很有限。

最近对 CDK5(在神经发育过程起主要作用的蛋白激酶)的研究使 cyclin 家族多了一个新分支。CDK5 的活化需要和一种 p35 蛋白结合,而后者显然缺乏 cyclins 中保守的氨基酸结构,p35 可能是新一类 CDK 调节亚基的主要成员^[3,6,7]。

cyclins 的功能主要是通过改变其蛋白水平来控制的,cyclins 水平在细胞周期的特定阶段特征性地改变(实际上 cyclins 通常是以它们表达的时段分类的)。在爪蟾(*Xenopus*)胚胎早期,M 期 cyclinB 的水平摆动是由于 cyclin 降解速率改变而产生的^[20]。在脊椎动物体细胞和酵母中,cyclins 水平还在转录水平得到控制。在哺乳类动物细胞中,几种主要的 cyclins (E, A 和 B)水平时序性摆动很大程度上反应了 mRNA 的水平^[21,23],但产生这些基因表达波动的机制知道得很少。在芽殖酵母中人们知道的多一些,在此一个精细的转录程序控制着 cyclin 的表达: CDC28 被 G1 cyclins (CLNs) 活化导致正反馈活化 CLN1 和 CLN2 的转录^[16]; CDC28 被 CLNs 激活还能使负责降解 M 期 cyclin (CLB) 的机制失活^[24],允许 CLB 水平在 G1 期之后上升;然后 CLB 蛋白帮助抑制 CLN 转录,同时通过另一正反馈环刺激它们自身的转录^[25];结果是 CLB 水平上升导致 CDC28 的 M 期活化,之后又触发 CLB 的降解。

人们认为 cyclins 包含一些区域可以使 CDKs 定向于特异的底物和亚细胞位置。因此,除了简单地活化结合的 CDKs,它们可以提高针对特异底物的活性^[26,27,28]。特定 CDK-cyclin 复合物活性的增强极可能是由于 cyclin 和底物间的相互作用造成的^[26,27,28]。

3. CDK 通过磷酸化而活化

除了和 cyclin 结合,CDK 的彻底活化还需要磷酸化一个保守的苏氨酸残基位点(人 CDC2 为 Thr161,CDK2 为 Thr160)。在 CDK2 中,Thr160 处于封锁蛋白-底物结合位点的 T 绊环中,它的侧链无法与溶液接触,表明绊环必须移动以便于磷酸化^[11,12]。磷酸化可以影响 cyclin 结合位点,因为它加强了一些 CDK-cyclin 对子的结合^[29,30],反过来,结合 cyclin 可能加强磷酸化作用^[3]。

最近,人们做了许多工作来鉴定负责磷酸化 Thr160/161 的酶-CAK (CDK activating kinase)。CAK 是一个多亚基的酶,它的催化亚基是一个高度保守,与 CDK 相关的蛋白激酶,称

为 MO15^[31~37]，人 CAK (CDK7) 的第二个主要的亚基是一个新的 cyclin，称为 cyclinH^[36,38]。体外将纯化的 cyclinH 加入 MO15 重建了 CAK 活性，表明 CAK 像它的底物一样是一个 CDK-cyclin 复合物^[36]。MO15 于是重新命名为 CDK7^[3]。

CDK7 像它的底物一样在 T 缢环内有一个潜在的磷酸化位点(人 CDK7 为 Thr170)，这一残基的突变大大地降低了激酶活性^[35,36]，表明该激酶的活化可能需要这一位点的磷酸化。CAK 还可能被另外的亚基调节：哺乳类的 CAK 看来还包含了比 cyclinH 稍小的第三个亚基^[34,36]。

海星和爪蟾的 CDK7 与哺乳类的 CDK7-cyclinH 复合物一样，可以很容易地磷酸化 CDC2 和 CDK2 与各种 cyclin 结合的复合物^[31,33,36]，而哺乳类的 CDK7 还可以磷酸化关系较远的 CDK4^[37]。因此，一个 CAK 可以活化参与脊椎动物细胞周期调控的所有主要的 CDK-cyclin^[3]。

在正常的脊椎动物细胞周期中，Thr160/161 的磷酸化水平的升降倾向于和结合 cyclin 的状况平行^[39,40]。磷酸化的改变很可能不是由于 CAK 活性的改变，而是由于 cyclin 结合刺激了 CDK 被磷酸化的能力，因为 CAK 活性在细胞周期中并不改变^[34,35,37,41]。cyclin 结合可能促进 T 缢环构象改变，暴露 Thr160/161 侧链，从而提高了 Thr160/161 被磷酸化的潜力。因此，在正常的细胞增殖过程中，CAK 的活性不是限速条件，尽管它的调节在一些生长条件下可能很重要^[3]。

4. CDK 通过磷酸化被抑制

有许多方法可以使 CDK-cyclin 复合物失活。两个最显而易见的方法就是除去 cyclin 或使 Thr160/161 去磷酸化。Thr160/161 去磷酸化的重要性现在还不肯定，但 cyclins 的合成降低或升高在体内很重要^[3]。

CDK-cyclin 复合物通过磷酸化 N 末端附近的两个位点(人 CDC2 和 CDK2 的 Thr14、Tyr15)而被抑制。在 CDK2 中，这些残基的侧链从 ATP 结合位点的上方垂下，被磷酸化时，它们所处的位置肯定会影响激酶活性^[11]。虽然抑制的机理还不清楚，但 Tyr15 磷酸化看来不抑制 ATP 结合^[42]。两个残基都被埋在 T 缢环之下，不能接触溶液，表明 T 缢环必须被移开才能磷酸化。这可能由 cyclin 结合来完成，因为这一磷酸化被认为是 cyclin 依赖性的^[42,43]。

Thr14 和 Tyr15 的磷酸化对 CDC2 在 M 期活化的调控尤其重要。与 Thr161 的磷酸化一样，Thr14 和 Tyr15 的磷酸化与细胞接近 M 期时 cyclinB 水平升高大致平行^[39,43]。Thr14-Tyr15 在 G2 末期去磷酸化活化 CDC2 之前，CDC2-cyclinB 复合物一直保持在一种失活状态，这种突然的去磷酸化反应是由在这些位点起作用的相应的激酶和磷酸酶的活性改变带来的^[3]。

Tyr15 激酶的主要的候选者是 Weel，它最初在裂殖酵母中被鉴定。在体外，Weel 可同时磷酸化多肽底物的苏氨酸和酪氨酸残基，于是人们想到它可能是一个双重特异的激酶，可以同时磷酸化 Thr14 和 Tyr15。然而，Weel 在体外只能磷酸化 CDC2 的 Tyr15 而不磷酸化 Thr14，证明还存在另外的 Thr14 激酶^[44,45]。最近在爪蟾的提取物中检测到了 Thr14 激酶活性^[47]，有趣的是，这种活性与膜相连，能够与可溶部分的 Tyr15 特异激酶活性分开^[46]。

Weel 的活性在 M 期下降，造成了这一阶段的抑制性磷酸化的降低。Weel 在 M 期活性的降低是由于它被磷酸化，虽然起作用的激酶还不清楚，并且可能在不同物种中有所不同。裂殖酵母中，蛋白激酶 Nim1 通过磷酸化 Weel C 末端催化结构域而抑制后者的活性^[48~50]。高等真核生物中 Nim1 的同源物还没有找到，但爪蟾提取物中含有的激酶活性可以磷酸化 Weel 的 N 末端结构域而抑制它的活性^[51]。

Thr14 和 Tyr15 都可以被双重特异性的磷酸酶 CDC25 去磷酸化。CDC25 活性在 M 期上升, 主要是由于其 N 端磷酸化上升^[52]。在 M 期过程中, 负责这一磷酸化的激酶被激活而相应的磷酸酶被抑制。刺激 CDC25 活性的激酶可能就是 CDC2 本身^[26,53], 这构成了在理论上诱导 M 期 CDC2 突然去磷酸化的精细的正反馈系统的基础。正反馈的效果还可以通过其它组分的协同效应而达到: CDC2 可能激活使 Weel 失活的激酶, 同时抑制使 CDC25 失活及活化 Weel 的磷酸酶^[52]。

5. CDK 通过结合 CKIs 而被抑制

CDK 调控的第四种主要的方式就是和 CKIs 结合而被抑制。目前在酵母中, 已知 FAR-1 和 p40 (SIC1/SDB25) 分别抑制 CDC28-CLN 和 CDC28-CLB 复合物, 另外 PHO81 抑制 PHO85-PHO80-一种参与了磷酸酶基因表达的 CDK-cyclin 复合物^[3]。

在哺乳类细胞中有两类 CKIs。一类称为 Cip/Kip 家族^[3,54,66], 包括第一个被克隆的 p53 调节的下游基因产物 p²¹^{CIP1}/WAF1^[55~58], 和另两个 CKIs, p²⁷^{kip1}^[59,60], 和 p⁵⁷^{kip2}^[61,62]。这些抑制因子 N 末端有 60aa 的保守结构域, 负责与激酶结合并抑制其活性^[63,64,65], 而且优先和 G1/S 的 CDKs 结合^[55~64]。p21 是一个双重特异抑制因子, 不仅可以和 CDKs 结合, 还可以和 PCNA 结合抑制 DNA 的复制^[60,65,67,68,69], p27 和 p57 则包含一个密切相关的叫做 QT 结构域的 C 末端序列^[61], 这和 p21 不同, 可能介导与其它蛋白的相互作用^[66]。

Cip/Kip 家族的普遍特征就是抑制 CDK 的活性是 cyclin 依赖性的并且需要多个分子抑制 CDK 活性, CDK-cyclin 包含一个抑制因子分子时, 在体外是有活性的, 这种包含 p21、p57 的有活性的 CKI 复合物很容易在处于周期的培养细胞的提取物中找到^[63,70]。这些多结构域的 CKIs 很可能起衔接者的作用——通过它们的 C 末端结构域引导底物接近有活性的激酶复合物^[66]。

第二个 CKI 家族称为 INK4^[3,54,66], 包括 p¹⁵^{INK4B}, p¹⁶^{INK4A}, p¹⁸^{INK4C} 和 p¹⁹^{INK4D}^[71~76], p16 和 p15 在特定的人肿瘤中有突变和缺失^[73,77,78,79], 而且一些 p16 突变在细胞周期阻断和 CDK4 抑制方面是无功能的^[80,81]。与 Cip/Kip 家族不同的是, INK4 家族成员选择性地和 cyclinD 与 CDK4、CDK6 组成的复合物结合, 并且也不与有活性的激酶复合物结合。INK4 同源物可以和 CDK 单体或其 cyclin 结合形成牢固结合^[75], 与前一类 CKIs 不同^[55]。尽管在体外 INK4 同类物不能将 cyclinD 从事先形成的 CDK 复合物中替换出来^[75], 这些 CKIs 在细胞中可以代替 cyclinD 与 CDKs 形成复合物^[71,74,75], 这表明 p16 同类物在体内可能阻止 CDK-cyclin 的一部分组装^[66]。

我们对 CKI 抑制机理的了解还很粗略。大多数 CKIs 和 Thr160/161 磷酸化的 CDK-cyclin 复合物牢固结合直接抑制激酶活性。在许多情况下, CKIs (FAR1、p40、p21) 被它们结合的 CDK 磷酸化, 表明它们与蛋白底物结合位点有作用^[3]。

6. CDK-cyclin 复合物的下游底物

许多蛋白被认为是不同的 CDK-cyclin 复合物的下游底物, 总的来说, 在体内这些目标蛋白当 CDK-cyclin 活化时其 CDK 特异识别位点被磷酸化。通常, 一个蛋白被公认为底物, 需要满足下列条件: (1) CDK 特异识别位点的磷酸化可在体外重复; (2) 该目标蛋白的磷酸化导致相关的生理变化; (3) 尽管酶复合体及底物之间不需要有稳定的物理相互作用, 但磷酸化发生时它们应在同一亚细胞位置。要阐明一个蛋白底物, 尤其在高等真核生物中, 是一件复杂的事情, 当然也发现了不完全符合上述条件的酶-底物对子^[13]。

研究得最为彻底的 G1 CDK-cyclin 底物是 Rb 抑癌基因产物。pRb 在成视网膜细胞瘤

(retinoblastoma) 以及其它几种哺乳类肿瘤——小细胞肺癌、肉瘤和膀胱癌中缺失或失活^[83]。pRb 依照细胞周期依赖方式磷酸化, 在静止及早 G1 期细胞中为低磷酸化状态, G1 中期至晚期在几个 CDK 特异识别位点被磷酸化。磷酸化的 pRb 或被癌蛋白 E1A、T 抗原、E7 结合的 pRb 失活, 释放转录因子 E2F-1 (或该家族其它成员 E2F-2、E2F-3)。E2F-1 与 DP-1 形成二聚体可以结合特定的 DNA 位点。这些转录因子活化一些基因的转录, 而后的产物为进入 S 期所必需^[84,85,86]。cyclinD 结合 CDK 的活化时间与 G1 中 pRb 的磷酸化相符, 有趣的是, 无功能性 pRb 的细胞似乎不需要 cyclinD 的功能, 这说明 cyclinD 的主要作用是针对 pRb^[87,88], 很可能 pRb 是 CDK-cyclinD 的可靠的直接作用目标。其它在 G1 晚期和 S 期的 CDK-cyclin 也有可能起作用^[13]。

两个 pRb 相关蛋白 p107 和 p130 也是 CDK-cyclin 的底物^[89~91], 两者都和另一 E2F 转录因子家族成员 E2F-4 结合^[92,93]。p130 较 pRb 早完成磷酸化, 提示 p130 应该比 pRb 早失活^[13]。这些发现提出了这样一个模型——E2F 家族成员通过 pRb 相关蛋白磷酸化程度的变化在 G1/S 转化时依次释放出来而表现活性。p107 也是一种磷蛋白, 但还不知道它在细胞周期中是否被磷酸化调节, p107 结合并抑制 E2F-4 是由于 p107 在细胞周期中水平的变化造成的, 这表明在晚 G1 期 p107 代替 p130 作为 E2F-4 的调节者^[92~94]。

CDK-cyclins 可能也参与了解除一些 E2F 活性的作用。例如, cyclinA 结合 E2F-1/DP-1 复合物, 其相关酶磷酸化 DP-1 亚基, 导致 E2F-1 失去 DNA 结合活性^[95,96]。另外还存在几种 CDK-cyclin 底物, 它们大部分在 G2/M 和 M 期被磷酸化, 表明它们是 CDC2-cyclinA/B 的作用对象, 例如磷酸化的 HistoneH1、Lamins 和 Intermediate filaments 可能分别引起染色体凝集、核膜裂解和有丝分裂器组装事件^[2,97,98]。

7. 胞外信号与细胞周期调控

上述的 CDK 调节方式, 都可能成为胞外信号最终作用于细胞周期引擎的实施者。静止的哺乳类细胞可以由生长因子诱导而增殖, 细胞从 G1 期开始到一个特定的称为“Restriction point”(R 点) 的过程中必须要有生长因子的刺激, 之后只要有基本的存活因子即使没有生长因子, 细胞也会继续完成细胞分裂^[99]。另外, 这些细胞在限制点之后就不再对抗有丝分裂信号敏感。不同细胞类型需要不同的一组生长因子来促进 DNA 合成。例如, 正常人成纤维细胞 WI38 需要 IGF-1 和 EGF 或 PDGF, 而 T 淋巴细胞可以被抗原或白细胞介素诱导增殖^[13]。有丝分裂信号通过特定的通路传导至细胞核, 导致应答基因的表达。另外这些信号还可以造成已经存在的直接控制细胞周期引擎的蛋白活性的变化^[13]。在酵母中, G1 期也是与胞外信号整合的细胞周期时相, 例如, 酵母单倍体细胞响应性激素而阻断在 G1 期, 这些性激素最终导致一种抑制因子 FAR-1 的表达, 它与 CDC28-CLN 结合并抑制其蛋白激酶活性, 使细胞阻断在 G1 期^[82,100]; 酵母细胞在达到临界大小之前需要营养物质, 然后可以不依赖于营养物质而进入 S 期。所有的真核细胞在达到 G1 期的特定点之前似乎都受到胞外信号的支配, 这个点在酵母中称为“START”, 在哺乳类细胞中称为“Restriction point”。在高等真核生物中, 由于细胞特化的复杂性造成了与 G1 期相联系的各种信号大量增加, 或者推动细胞周期或者导致细胞能够最终脱离细胞周期进入 G0 和各种分化状态。因此, 高等真核生物需要更为复杂的最终和细胞周期引擎整合的通路网络^[13]。

一些胞外信号最终通过 CKIs 对细胞周期引擎起抑制作用。p21 最先被发现可以由 p53 和衰老所诱导^[57,64,101], 后来又发现 p21 可以不依赖于 p53 表达^[102], 最近的资料显示, p21 的表达与一些细胞系的终端分化相关^[103~105], 尽管 MyoD 和 myogemin 似乎并不为 p21 在体内表

达所必需^[105]，但在成纤维细胞 10T1/2 中，MyoD 已足以诱导 p21 的表达并且不依赖于 p53^[106]。因此，p21 参与了脱离细胞周期的过程，而这一过程是通过应答不依赖 p53 的分化信号诱导 G1 阻断来实现的^[13]。

p27 最早作为 CDK2-cyclinE 的抑制因子在被 TGF- β 处理或接触抑制的 G1 期阻断的 Mv1Lu 水貂细胞中为人们所认识^[107,108]。cAMP 诱导的 G1 期阻断是由 p27 与 CDK4-cyclinD1 结合阻止其被 CAK 活化所介导的^[109]，T 淋巴细胞中加入白细胞介素 2 可降低 p27 的水平最终导致事先存在的 CDK2-cyclinE 的活化^[110,111]。在 Mv1Lu 细胞中，p27 可能通过抑制 CDK2-cyclinE 介导 G1 期阻断，这是由于 TGF- β 抑制 CDK4 的合成而使 p27 从 CDK4-cyclin 复合物中释放出来^[112]；但在人角质细胞 (keratinocytes) 中，TGF- β 处理后，p15 的表达上升了 30 倍^[72]，由此人们提出了 p27 与 p15 协同作用的模式：p15 表达上升增加与 CDK4 或 CDK6-cyclinD 的结合，释放出 p27 与 CDK2-cyclinE 结合从而使细胞阻断在晚 G1 期^[113]。

p57 可以结合并抑制多种 CDK-cyclin，它的过表达可将细胞阻断于 G1 期。终端分化的细胞表达 p57，表明这种 CKI 参与了特定种类的细胞脱离周期。另外，还不知道 p16、p18、p19 是否受胞外信号的调控^[13]。

总之，CKIs 在介导胞外抑制信号造成细胞阻断于 G1 期不同时间点的过程中起着重要的作用，其中一些时间点可能让细胞脱离周期进入特定的分化程序。

二、细胞周期检查点 (Cell cycle checkpoint)

细胞周期检查点是控制细胞周期转换时序的调控通路，它保证像 DNA 复制和染色单体分离这样关键的事件高度准确地完成。检查点通路的组成成员为所有真核生物所共有，说明了细胞周期调控机制的保守性^[114]。

细胞周期事件有条不紊地进行，其必要条件就是后一个事件的发生依赖于前一个事件的完成，这被归为底物和产物的关系^[115]，这种依赖关系是在每个周期中起作用的时序化周期事件的内部机制；而外部机制则是只在检测到缺损时诱导起作用的。这些调控途径特别令人感兴趣，因为它们丧失能减低细胞周期事件（如染色体复制和分离）的忠实性，这种改变减低了单细胞生物体的生殖适应性，而在多细胞生物体中导致增殖失控和癌症^[114]。

检查点就是上述特定内部和外部机制的总称。检查点包括两方面——地点和过程，这种两重性引起了一些混淆，这个词常常用来指细胞周期某个点或转换，但应该是限于指保证依赖关系的生化通路，例如，DNA 损伤检查点是指以下这种机制：检测 DNA 损伤并产生信号以将细胞阻断在 G1 期、减缓 S 期 (DNA 合成)、阻断于 G2 期，诱导修复基因的转录，根据感受损伤的不同时相，细胞可阻断在细胞周期的不同位置^[114]。既然检查点是信号传导通路，它就该包括起始信号 (signal)、感受因子 (sensor)、传导因子 (transducer) 和效应因子 (effector)。以下我们将讨论三个主要的检查点。

1. DNA 损伤检查点 (DNA damage checkpoint)

许多检查点通路最初是通过分析酵母中 cdc (cell division cycle) 突变型鉴定出来的。在芽殖酵母中，RAD9、RAD17、RAD24、MEC3 基因具有与作为信号修饰或感受因子一致的特点，它们响应 DNA 损伤而使细胞阻断于 G1、G2 期，但对 DNA 复制阻断不响应^[116,117]。Rad24 与结合缺口 DNA (gapped DNA) 的蛋白 RFC 相关，所以它被暗示参与损伤识别，虽然它的生化功能还未被阐明^[118]，Rad9 则肯定是 DNA 损伤信号的感受因子或传导因子^[114]。

两个主要的基因组成这一检查点的中心传导通路：MEC1 和 RAD53。MEC1 是 PI 激酶超

家族的成员之一,它的一个同源基因 TEL1 则为保持端粒的长度所必需。MEC1 和 TEL1 在哺乳类中的同源物为 ATM (ataxia telangiectasia mutated) 和 ATR (AT and rad-related)。RAD53 是一种蛋白激酶,它响应 DNA 损伤被磷酸化而活化, Rad53 的磷酸化依赖于 POL2、RAD9 和 MEC1^[114]。

转录应答的效应因子是蛋白激酶 Dun1, DNA 损伤提高 Dun1 的激酶活性依赖于 RAD53 和 MEC1。而 DNA 损伤能诱导细胞周期阻断的效应因子可能是 Pds1, 它是一个后期 (anaphase) 抑制因子^[114]。

哺乳类具有和酵母一样的对 DNA 损伤的细胞周期应答,但不同的是还可能活化细胞的死亡通路。在各种哺乳类的检查点中,只有对 G1 期 DNA 损伤检查点了解一些细节。三个哺乳类基因控制 DNA 损伤检查点: ATM、p53 和 p21^[119~122]。其中, p53 研究得最为广泛。p53 基因是在人癌症中突变最频繁的肿瘤抑制因子,它编码了一个转录因子,响应 DNA 损伤和核苷酸库紊乱而被激活。缺失 p53 的细胞受 γ 射线照射不能将细胞阻断在 G1 期并表现细胞凋亡的减少^[114], p53 将细胞阻断于 G1 期的能力部分通过活化 p21 的转录而实现^[123]。缺乏 p21 的鼠胚胎成纤维细胞表现出 G1 期阻断的部分丧失,但没有 p53 缺失的成纤维细胞严重,说明存在第二条 p53 依赖的 G1 期阻断通路^[114], 虽然还不知道这一通路的性质,但 CDK4 突变的实验表明在响应 UV 照射的过程中 CDK4 酪氨酸的磷酸化是必需的^[124], 所以这可能是除 p21 通路以外的另一条。

p53 如何响应 DNA 损伤而活化还不太清楚,在响应 DNA 损伤时它的稳定性和作为转录因子的特异活性都有所增加,尽管研究的很多,但其确切的机制还需要阐明^[125,126]。ATM 基因可能调控 p53, 缺乏 ATM 的细胞在响应 DNA 损伤表现为减少和延迟 p53 的活化^[127,128], 考虑到 ATM 和 MEC1 的关系,很可能它在把 DNA 损伤信号传导给 p53 时起作用。尽管 ATM 在 p53 上游,但当有 DNA 损伤时, ATM 突变株通过依赖 p53 的细胞凋亡而死亡,因此,一定存在 p53 不依赖 ATM 的活化途径,也许它是由 ATR 控制的^[114]。

2. DNA 复制检查点 (DNA replication checkpoint)

复制复合物内的结构和未复制的 DNA 可以发出信号以阻止细胞进入 M 期^[129]。在芽殖酵母中,三个 DNA 复制基因, POL2、DPB11 和 RFC5, 为 DNA 复制检查点所必需^[130~132], 可能是 DNA 复制的感受因子。

DPB11 为 DNA 复制及响应 HU (hydroxy urea) 阻断所必需, RFC5 是复制因子 C 的一员,可以和缺口 DNA (gapped DNA, 可出现在复制时的后随链中) 结合,然后结合 PCNA,再结合 DNA POL δ 和 POL ϵ 。因为聚合酶处于复制叉,所以它可以起 DNA 复制感受因子的作用^[114]。

POL2 编码 DNA 聚合酶 ϵ (Pole), 它为染色体 DNA 复制所必需^[133]。Pole 在 DNA 前导链中起作用,并参与 DNA 修复^[134,145]。检查 Pole 的突变发现只有影响 Pole C 末端的突变才会取消监视未复制 DNA 的检查点^[130], 并且所有这些都是无意义突变,它们删去了紧接在人和酵母中都保守的锌指结构域 C 端之后的序列^[136];相反,影响该聚合酶 N 端的突变在限制温度下表现出 DNA 复制的缺陷,而在允许温度下阻碍 DNA 复制,细胞可以被正常阻断^[137]。C 末端的锌指结构是 Pole 所唯一特有的,所以不太可能参与所有其它聚合酶都能行使的核苷酸聚合反应,此外,上述检查点突变并不取消 DNA 复制。因此,有理由提出 Pole C 末端触发了一个生化通路最终阻止 M 期的发生,而且,它还可能触发另一通路导致损伤诱导基因的转录激活。因此, Pole 的这一区域在细胞中作为感受因子响应未完成的 S 期,检测 DNA 单链区域,

它的 C 末端可能也参与了激活检查点通路的蛋白-蛋白相互作用,而且这些相互作用只有在 Pole 组装进复制复合物中时才发生^[130,137]。

DNA 复制检查点的信号传导及效应通路是和 DNA 损伤检查点的通路一致的^[114]。

3. 纺锤体组装检查点 (Spindle assembly checkpoint)

正常的染色单体分离需要完成 M 期的一系列事件:必须组装具有两极的纺锤体;染色体必须通过动粒 (kinetochore, 在染色体着丝粒处形成的蛋白结构) 附着到纺锤体上;姊妹染色单体的动粒必须分别结合附着于相对两极的纺锤体;正确附着的染色体必须到达中期板。在这些步骤的正确完成以前,纺锤体组装检查点防止后期(染色单体分离)的开始,一旦这些事件发生,细胞就能执行后期,进入下一个细胞周期^[114]。

这一检查点感受因子的分子基础还不清楚。纺锤体组装包括了许多组分,其中任何一种都能作为信号被感受^[114],感受因子可能感受游离管蛋白的数量、微管组织中心的功能、纺锤体的两极性、微管对动粒的附着、由动粒附着到纺锤体上产生的拉力^[138]。最有希望作为信号的是动粒处的拉力和未附着的动粒^[114]。前者的证据来自于用玻璃针对减数分裂的蝗虫精母细胞进行的显微操作^[139,140],而后者的证据来自于用激光切除未附着的动粒^[141]。另外,在芽殖酵母中编码动粒蛋白的 Ctf13 基因或着丝点本身的突变都会延迟 M 期^[114]。

一种可识别某种未知动粒蛋白磷酸化表位的单克隆抗体 3F3,为动粒感受拉力信号的研究提供了有力的分子探针^[142]。哺乳类和昆虫细胞中的特定动粒蛋白在染色体附着到纺锤体之前是磷酸化的,而在染色体正确附着之后去磷酸化^[143-145]。没有附着的松弛的染色体上的动粒有高度磷酸化的蛋白,但当这一染色体用显微操作针拉扯产生拉力,动粒又变为去磷酸化^[143];反过来,正常附着的有拉力的去磷酸化的动粒蛋白,如果把染色体从纺锤体中拆开,则导致上述动粒蛋白的重新磷酸化^[143]。我们不知道拉力如何使动粒蛋白去磷酸化,一种可能就是拉力对蛋白构象产生了直接作用,就像蛋白结合配体的变构反应一样^[145,146],依据这一观点,实验者或细胞拉扯一个多肽,就可以改变它的构象和活性^[145,147],比如,拉力可以使一种蛋白激酶变构,使它失活,导致磷蛋白的去磷酸化。总之,拉力有两种效应:动粒去磷酸化和向检查点发出向前去的信号;反过来,去除拉力也有两种相反的效应:动粒磷酸化和向检查点发出等候的信号^[143]。

纺锤体检查点信号传导的情况同样也主要来自于芽殖酵母的突变型的研究。Mps1 可能是检查点信号传导的起始,当检查点激活时, Mad1 磷酸化,而这一事件被用来给通路中其它基因排序^[114]。Mps1 可以在体外直接磷酸化 Mad1,而且也为后者在体内磷酸化所必需。但 Mps1 和 Mad1 在信号通路中不一定邻近,因为 Mad1 的磷酸化也依赖于 Bub1、Bub3 和 Mad2^[114]。Mad2 结合 Mad1 并为后者磷酸化所必需^[138], Mad2 可能是这一信号级联的中心蛋白,因为信号通路激活时它在动粒上的位置有所改变。Mad3 和 Bub2 不为 Mad1 的磷酸化所必需,所以它们处于 Mad1 的下游^[114]。纺锤体检查点起作用的一个可能的模式就是:拉力消失或存在游离的微管结合位点, Mps1 或 Bub1 激活并磷酸化动粒上的某个蛋白,这种磷酸化调动 Mad2 蛋白,然后磷酸化 Mad1,再产生阻断信号(可能通过 Mad3 和 Bub2)^[114]。

这一检查点的效应因子可能是 Pds1,它通过 APC (anaphase-promoting complex) 降解,但它的降解是如何被精确控制的,还不清楚^[114]。

三、DNA 复制的细胞周期调控

遗传信息从一代细胞向下一代传递要求 DNA 在 S 期的精确复制以及姊妹染色单体在 M

期忠实地分离。在大多数真核细胞中，这两个事件相互依赖，所以基因组的复制和有丝分裂交替循环往复地发生。DNA 复制是怎样起始的？它为何只限于 S 期？每个细胞周期 DNA 复制为何只发生一次？决定这些的分子机制成为受人瞩目的研究领域^[148]。

人们对控制 DNA 复制的最基本的了解来自于细胞融合实验^[129,149]，细胞同步在不同的细胞周期，然后融合，观察标记核的 DNA 复制及有丝分裂。例如，G1 期和 S 期细胞融合，G1 期核马上开始 DNA 复制，比未融合的核要早得多；G2 期细胞则不能激活 G1 期核；G2 期核也不能被 S 期细胞激活开始 DNA 复制。这些融合实验揭示了三个重要的现象：第一，只有 G1 期细胞的染色体才有能力 (competent) 起始 DNA 复制；第二，只有 S 期细胞，而不是 G1 或 G2 期，包含 DNA 复制起始的激活因子可以对感受态 (competent state) 的 G1 染色体起作用；第三，G2 期核在它们通过 M 期之前不重新复制。目前研究的主要目标就是要了解以下几个问题：感受态的分子基础是什么，它是如何建立起来的？S 期细胞中的激活因子是什么？是什么阻止 G2 期核重新复制^[148]？

在真核细胞中，DNA 复制的起始由顺式作用 DNA 序列 (DNA 中的复制子元件) 和结合至复制子上的反式作用蛋白 (起始蛋白) 决定^[150~152]。真核细胞的染色体太大，不能只从一个起点复制，所以它包含了多个起点 (实际上比复制所需的还要多)^[148]。在芽殖酵母中，复制子包括多个 DNA 功能元件，主要有 A，以及邻近的 B1、B2 和 B3。A、B1 和 B2 形成复制子的核心，B3 则与 Abflp 结合起复制子增强子的作用。A、B1 可以结合起始识别复合物 (ORC)，ORC 在整个细胞周期都与复制起点结合^[1,148]，这些起点在 G2 甚至到 M 期都只单独和 ORC 结合。细胞走出 M 期后或在晚 G1 期，这些位点又结合了第二组蛋白，其中之一为一种不稳定蛋白 Cdc6p，它在 G1 期合成，Cdc6p 的到达催化紧邻的 DNA 序列结合另一组复合物 Mcm 蛋白。以上三者组成了前复制复合物 (pre-replication complex, pre-RC)^[1,148]。由此形成了感受态的染色体。

S 期 CDKs 可以触发已经形成了 pre-RCs 的复制起点开始 DNA 复制，同时又防止 pre-RCs 的再次组装，(M 期的 CDKs 从活化的那一点开始至后期 M 期 cyclin 被降解这段时间内也阻止 pre-RC 的组装)，CDK (和 DDK) 活性上升，促进 DNA 复制，在此过程中 Cdc6p 和 Mcm 从 pre-RCs 中丢失^[1,148]，解除了 DNA 复制的感受态，即 DNA 再次复制的能力。这样 DNA 复制就和周期事件偶合在一起，并且保证了一个细胞周期，DNA 只能复制一次。

四、蛋白质水解与细胞周期

细胞周期事件沿着周期时相依次有条不紊地发生，实际上是特定的蛋白在特定的时间出现并起作用。为达到这一目的，细胞可以通过以下的途径来解决：第一，修饰现有蛋白 (例如，磷酸化与去磷酸化)；第二，合成新蛋白 (例如，cyclin 的周期依赖性合成)；第三，水解多余蛋白 (例如，cyclin 的周期依赖性降解)。

与周期相关的蛋白水解通路必须是底物特异性的通路。人们发现泛素-蛋白酶水解系统 (ubiquitin-proteasome proteolytic system, UPPS) 在细胞周期调控中起重要作用^[154]。泛素是一个小的高度保守的蛋白，它首先在一 COOH 末端与泛素活化酶 E1 形成硫酯键而被活化，然后被转移给 E2 或 UBC (ubiquitin-conjugating) 酶家族的一员，最后直接或通过泛素-蛋白连接酶 E3 把泛素转到目标蛋白的赖氨酸残基上。E3 为在底物上形成多泛素链所必需，这一步骤便于 26S 大小的蛋白酶体 (proteasome) 有效地识别底物。泛素介导的蛋白水解的速率和特异性还可以通过泛素链去组装来控制，这是由一个庞大而知之甚少的去泛素化酶 (deubiquiti-