

lats 基因在细胞周期和肿瘤发生中的作用

陈伟丽 邓可京

(上海复旦大学生命科学院

发育生物学实验基地, 上海 200433)

T. S. GREGORY 许田*

(Howard Hughes Medical Institute, Yale University,

School of Medicine, Department of Genetics, New Haven, CT 06536. USA)

摘要 *lats* 基因 (large tumor suppressor gene) 最早在果蝇中发现, 在小鼠和人类中均有同源基因. 该基因的功能从果蝇到人是高度保守的. *lats* 基因的功能包括: 作为肿瘤抑制基因, 其突变会导致肿瘤的发生; 磷酸化的 Lats 与 Cdc2 结合, 参与细胞周期的调控; 通过细胞-细胞间的通讯, 可能参与生物体个体大小的调控机制. 从果蝇到人 *lats* 基因功能的研究, 提供了以果蝇作为模式生物研究哺乳动物基因功能的方法.

关键词 *lats* 基因, 肿瘤抑制基因, 肿瘤, 细胞周期, 细胞周期因子, 大小调控, 果蝇, 模式生物

学科分类号 Q344

了解细胞周期事件的发生和调控是我们深入了解肿瘤抑制基因功能的关键. 这些调控机制的破坏, 可以导致肿瘤的发生. 细胞周期是由依赖于细胞周期因子的蛋白激酶 (cyclin-dependent protein kinases, CDKs) 所驱动的^[1,2], 而细胞周期因子 (cyclins) 的合成与降解调节着 CDKs 的活性, 互逆的磷酸化反应及 CDK 的抑制因子 (CDK inhibitors, CDIs) 也正向或负向调控着 CDKs 的活性, CDIs 在控制细胞周期检验点中起着关键作用^[3]. 人类的肿瘤抑制基因通常具有细胞周期负调因子的功能, 它们能直接或间接调节 CDK/cyclin 复合物的活性. 肿瘤抑制基因的突变会使细胞周期检验点失去功能, 从而导致细胞过度增殖, 肿瘤产生.

lats 基因 (large tumor suppressor gene), 又称 *wts* 基因^[4,5], 最早在果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 中发现, 它可能编码一个丝氨酸/苏氨酸激酶, 是一个肿瘤抑制基因, 随后它在哺乳动物中的同源基因也被证实是肿瘤抑制基因, 并且是 CDKs 负调因子家族中的新成员^[6].

1 *lats* 基因的发现与鉴定

果蝇中有许多和哺乳动物类似、功能保守的参与细胞周期调控的因子. 这种进化上的高度保守性, 使果蝇成为研究肿瘤极其有用的模式生物. 果蝇中的嵌合体筛选法 (mosaic screen), 可以从遗传角度模拟肿瘤病人, 分离引起组织过度增生而在发育早期致死的突变^[4,7].

lats 基因就是通过嵌合体筛选法鉴定的基因之一. 体细胞中的 *lats* 突变, 可引起体细胞过度增殖, 在嵌合体成蝇 *lats*^{-/-} 的各种组织中形成巨大肿瘤. 不同等位基因的 *lats* 突变, 所引起的嵌合体果蝇 *lats*^{-/-} 克隆中细胞过度增殖的程度不同, 最大的 *lats*^{-/-} 的克隆可达身体大小的 1/5. *lats* 不同等位基因突变的纯合子在发育过程中具有不同的缺陷: 强突变使纯合子死于胚胎期, 中等强度突变对处于发育不同阶段的幼虫或蛹致死, 其中有的突变, 可导致果蝇个体巨大, 并伴有显著的组织过度增殖, 而弱突变则引起眼睛粗糙, 眼腹部突出等形态变化^[4].

2 *lats* 突变细胞的增殖显著快于野生型细胞

lats 突变克隆具有与果蝇中其他肿瘤抑制基因, 如 discs large 1 (dlg)^[8] 和 giant larvae (lgl)^[9,10] 突变克隆不同的行为, 后者的突变细胞比野生型细胞增殖慢, 所以在第一龄幼虫期诱导的突变克隆, 在生长过程中很快在与野生型细胞的竞争中消失, 难以在成蝇中形成可以检测到的克隆, 而在同一阶段诱导的 *lats* 突变克隆, 则可在成蝇中形成显著过度增殖的组织, 并且克隆中的细胞能够分化, 而周围野生型的细胞则增殖正常. 这表明

* 通讯联系人. Howard Hughes Medical Institute, Yale University, School of Medicine, Department of Genetics, New Haven, CT 06536. USA. 或: 复旦大学发育生物学基地, 上海 200433.

Tel: 021-65642518, E-mail: Tian.xu@yale.edu

收稿日期: 2001-01-09, 接受日期: 2001-02-23

lats 突变细胞比野生型细胞增殖得快, 而且组织过度增殖的表型不是由于分化被抑制造成的, 而是由细胞自身的过度增殖造成的^[4].

3 *lats* 参与细胞-细胞间通讯的机制

生物体大小调控的机制参与细胞增殖的调节, *lats* 突变的表型说明, *lats* 可能在个体大小调控机制中发挥作用. 在果蝇发育过程中, 器官原基中的增殖细胞通过相互间的通讯, 维持原基的恒定大小. 当切去原基的一小部分时, 器官原基能再生, 从而维持其恒定大小^[11, 12]. 与细胞增殖受局部细胞-细胞间通讯调节观点相一致的是, 在生长的原基中, DNA 的复制和有丝分裂发生在原基中那些无克隆细胞簇的区域中^[13]. 大小调控机制是原基细胞的复杂特性, 这种大小调控机制也同样存在于无脊椎动物中.

lats 突变能显著改变果蝇器官原基的大小及形态. 位于 *lats* 嵌合体原基克隆中的突变细胞, 可过度增殖形成巨大突起, 有时这种突起的大小甚至超过正常的成熟原基. 许多 *lats* 等位基因突变的纯合子果蝇具有较大的体型和明显过度增长的原基, 这与其他影响细胞分裂的基因突变是完全不相同的. 例如, 在 *minute* 嵌合体的原基中, 部分细胞过度增殖而其他细胞则增殖不足, 从而维持原基的恒定大小^[14, 15], 这说明细胞间的通讯介导大小调控机制. *lats* 突变细胞本身的过度增殖表明, 这些突变细胞在接收周围野生型细胞发出的抑制细胞增殖的信号方面存在缺陷.

4 人的 *Lats1* 是具有 *lats* 功能的同源基因

果蝇 *lats* 基因在人的同源基因 (*hLats1*) 已被克隆. *hLats1* cDNA 与果蝇的 *lats* cDNA 一样. 在 *lats* 突变型果蝇中的表达, 可拯救 *lats* 突变引起的致死性, 并可抑制 *lats* 嵌合体果蝇中肿瘤的形成. 这表明人的 *hLats1* 确实是果蝇中肿瘤抑制基因 *lats* 的同源基因^[16].

此外, 小鼠中的 *lats* 同源基因 *mLats1* 也已克隆, 在线虫 (*C. elegans*) 和酵母 (*S. cerevisiae*) 中也分离到 *lats* 样的分子 *ce-Lats-1* 和 *sc-Lats-1*. 这些蛋白质除了具有高度保守的、位于 C 端的激酶域外, 还具有同源的 N 端, 这表明 *Lats* 蛋白可能在所有的真核生物中具有生物学功能.

以前分离得到的激酶 (如出芽酵母中的 Dbf2 和 Dbf20, 人, 果蝇和线虫的细胞核 Dbf2-相关蛋

白 Ndr)^[17~20] 与 *Lats* 蛋白具有很高的序列相似性 (如 *hLats1* 和 Ndr 44% 的氨基酸序列一样), 但是它们缺乏对应于 *Lats* N 端的区域, 因而不是 *Lats* 真正的同源物. 的确, 无论果蝇的 Ndr, 还是 *Lats* 的 C 端部分均不能拯救 *lats* 突变的表型. 以前认为的 *Lats* 在人的同源物肌营养不良激酶^[5, 21], 由于缺乏对应于 *Lats* N 端的区域, 并且它的激酶域也没有 *Lats* 和 Dbf 激酶域所特有的序列, 所以它也不可能是果蝇 *Lats* 在人的同源物.

5 *hLats* 是一个新的细胞周期调控因子

hLats1 的磷酸化依赖于细胞周期. 在有丝分裂前期的后半阶段和有丝分裂中期, *Lats1* 蛋白以磷酸化的形式存在, 在有丝分裂进入后期及在末期开始时, 去磷酸化形式的 *Lats1* 蛋白开始出现. *Lats1* 在 G1, S, G2 和 G0 期一直保持去磷酸化的形式. 有丝分裂过程中的 Cdc2 可与 *Lats1* 发生结合. 在有丝分裂早期与 *Lats1* 发生结合的 Cdc2 最多 (相当于与 cyclinB 形成复合物的 Cdc2 量的 25%), 但在随后阶段中数量递减, G0 期细胞中的 Cdc2 则不与 *Lats1* 发生结合. 因为 Cdc2 在细胞周期中的总量几乎是恒定的, 与 *Lats1* 结合的 Cdc2 数量变化不是由细胞周期中总 Cdc2 数量变化引起的, 这说明只有磷酸化的 *Lats1* 才能与 Cdc2 结合^[16].

Lats1 是通过它的 N 端区域与 Cdc2 结合的, 并且这种结合是专一的, 这说明: *Lats1* 可能是通过负调 Cdc2 活性而发挥肿瘤抑制因子作用的. 在果蝇中, 减少 *cdc2* 的剂量, 能抑制 *lats* 蝇晚期致死等位基因引起的死亡和其他形态学表型. 降低 *cdc2* 的活性, 也能抑制中等强度的 *lats* 等位基因引起的组织过度增殖的表型. 进一步研究表明, *cyclin B* 不与 *lats* 相互作用, *cyclin A* 能抑制 *lats* 突变型的表型, 其方式与 *cdc2* 相似. *lats*, *cdc2* 和 *cyclin A* 之间这种专一的遗传上的相互作用, 支持 *Lats* 通过负调 Cdc2/cyclinA 活性而调节细胞增殖的数据^[6].

6 *Lats* 在哺乳动物中是肿瘤抑制基因

Lats1 基因剔除小鼠 (*Lats1*^{-/-}) 的研究证实, 在小鼠中 *Lats* 也是一个肿瘤抑制基因. 实验显示, 这些 *Lats1*^{-/-} 小鼠表现出几种发育缺陷和激素水平缺陷: 乳腺不发育, 小鼠不育, 生长缓慢, 更重要的是, 这些小鼠长有软组织瘤和卵巢基质细胞瘤,

并对致癌剂高度敏感^[6]。

7 从 *lats* 的生化功能理解 *lats* 突变型的表型

Lats 作为 Cdc2/cyclin A 负调因子的作用, 与果蝇中作为肿瘤抑制基因的 *lats* 突变引起的表型是一致的。在停滞于 G1 期的细胞中过量表达 cyclin A, 以激活 Cdc2/cyclin A, 可以驱动 G1/S 的转变, 并且当 cyclin A 和活化态的 Cdc2 同时过量表达时, 可大大促进这种转变的发生^[22, 23]。在 *lats* 突变细胞中有 cyclin A 的不正常积聚, *lats* 突变表型能被 *cdc2* 和 *cyclin A* 的突变所抑制。 *lats* 表型的特殊性在于: *lats* 突变可下调 Cdc2/cyclin A 活性, 这种下调是专一的, 不影响其他 Cdc2/cyclin 复合物的活性。 *lats* 突变型细胞中的 cyclin A 在有丝分裂晚期被降解, 这表明 *lats* 突变型细胞中细胞周期的许多方面还是正常的。 Lats 特异性地影响 CDK/cyclin 复合物, 这种被 Lats 非正常激活的特殊的 CDK/cyclin 复合物, 影响细胞周期 G1/S 和 G2/M 两个不同的阶段, 而其他的相关基因的突变, 或是激活影响细胞周期一个阶段的 CDK/cyclin 复合物, 或是激活影响细胞周期全过程的 CDK/cyclin 复合物。 Lats 上述特性的综合, 可以解释果蝇 *lats* 突变型过度增殖的表型。

虽然 *lats* 基因的失活可在果蝇和小鼠中引起肿瘤, 但是基因型和表型之间的对应关系是变化的。在嵌合体果蝇中, 每个 *lats*^{-/-} 细胞都过度增殖, 但在 *Lats*^{-/-} 小鼠中, 只有特定组织产生肿瘤。这是哺乳动物和果蝇细胞周期的重要差别。在果蝇中, Cdc2/cyclin A 既参与 G1/S 的调节, 又参与 G2/M 的调节。而在哺乳动物中 Cdc2/cyclin A 复合物只参与 G2/M 的调节, G1/S 的调节则由其他 CDK/cyclin 的复合物来完成。庞大的哺乳动物基因组及其复杂性可能是小鼠和果蝇具有不同表型的原因^[6, 16]。

8 Lats 功能的模型

根据已有的研究结果, 推测 Lats 功能的模式为: 有丝分裂早期 Lats 的磷酸化导致它构象的改变, 破坏了 Lats N 端和 C 端的分子内结合, 使得 N 端游离出来与 Cdc2 结合从而使 Cdc2 失活。假如这个模式正确的话, 确定细胞周期中调节 Lats 磷酸化的蛋白激酶和磷酸化酶是非常必要的, 这一点有助于我们充分理解 Lats 活性的调节机制。

在果蝇和哺乳动物中, 尽管使 Cdc2/cyclins 失

活的精确机制尚不清楚, 但 cyclin A 和 cyclin B 是在有丝分裂的不同时期被降解的。 Lats 可专一性地调节 Cdc2/cyclin A 的活性, 而不调节 Cdc2/cyclin B 的活性, 因此 Lats 可能与有丝分裂不同时期失活不同的 Cdc2/cyclin 复合物密切相关。这种专一性同时也说明, Cdc2 和其他 CDK 可能被不同的蛋白质家族所负调, 也可能是每一个 CDK 的活性都被两种负调因子所调节。

有报道显示, Cdc2 和 cyclin A 在多种肿瘤中过量表达, 在哺乳动物中, CDK/cyclin 的负调因子已被证明是肿瘤抑制基因。有关 Lats 负调 Cdc2/cyclin A 复合物的发现以及在小鼠中 *mLats1* 是肿瘤抑制基因的事实, 说明人的 *Lats1* 的失活可能也与肿瘤的发生有关。这表明尽管果蝇和人的进化距离相差甚远, 但用果蝇作为模型能够直接进行与人类肿瘤相关的研究。从 *lats* 基因的保守性推测, 从果蝇到人, *lats* 途径上的许多基因也应当是保守的。在人中已发现三个 *lats* 基因的同源基因, 但他们的功能有待进一步研究^[24, 25]。找出果蝇中与 *lats* 相互作用的基因, 不但能提供 *lats* 基因是如何发挥作用的信息, 而且能提供在人中参与肿瘤发生的候选基因。

参 考 文 献

- 1 Nasmyth K. Viewpoint: putting the cell cycle in order. *Science*, 1996, **274** (5293): 1643~ 1645
- 2 Elledge S. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science*, 1996, **274** (5293): 1664~ 1672
- 3 Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, 1995, **80** (2): 225~ 236
- 4 Xu T, Wang W, Zhang S, *et al.* Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila lats* gene encodes a putative protein kinase. *Development*, 1995, **121** (4): 1053~ 1063
- 5 Justice R W, Zilian O, Woods D F, *et al.* The *Drosophila* tumor suppressor gene *warts* encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes Dev*, 1995, **9** (5): 534~ 546
- 6 St John MA, Tao W, Fei X, *et al.* Mice deficient of Lats 1 develop soft-tissue sarcomas, ovarian tumors and pituitary dysfunction. *Nat Genet*, 1999, **21** (2): 182~ 186
- 7 Theodosiou N A, Zhang S, Wang W Y, *et al.* Slimb coordinates wg and dpp expression in the dorsal-ventral and anterior-posterior axes during limb development. *Development*, 1998, **125** (17): 3411~ 3416
- 8 Edgar B A, Lehner C F. Developmental control of cell cycle regulations: a fly's perspective. *Science*, 1996, **274** (5293): 1646~ 1652
- 9 Sauer K, Weigmann K, Sigrist S, *et al.* Novel members of the cdc2-related kinase family in *Drosophila*: cdk4/6, cdk5, PFTAIK, and PITSLRE kinase. *Mol Biol Cell*, 1996, **7** (11): 1759~ 1769

- 10 de Nooij JC, Letendre M, Hariharan I. A cyclin-dependent kinase inhibitor, Dacapo, is necessary for timely exit from the cell cycle during *Drosophila* embryogenesis. *Cell*, 1996, **87** (7): 1237~1247
- 11 French V, Bryant P, Bryant S. Pattern regulation in epimorphic field. *Science*, 1976, **193** (4257): 969~981
- 12 Meinhardt H. Biological pattern formation: new observations provide support for theoretical predictions. *Bioessays*, 1994, **16** (9): 627~632
- 13 Milan M, Campuzano S, Garcia-Bellido A. Cell cycling and patterned cell proliferation in the *Drosophila* wing during metamorphosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (2): 11687~11692
- 14 Simpson P, Morato G. Differential Mitotic rates and patterns of growth in compartments in the *Drosophila* wing. *Dev Biol*, 1981, **85** (2): 299~308
- 15 Simpson P. Parameters of cell competition in the compartments of the wing disc of *Drosophila*. *Dev Biol*, 1979, **69** (1): 182~193
- 16 Tao W, Zhang S, Turenchalk G S, *et al.* Human homologue of the *Drosophila melanogaster* *lats* tumor suppressor modulates CDC2 activity. *Natl Genet*, 1999, **21** (2): 177~181
- 17 Johnston L, Eberly S, Chapman J, *et al.* The product of the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle genes DBF2 has homology with protein kinase and is periodically expressed in the cell cycle. *Mol Cell Biol*, 1990, **10** (4): 1358~1366
- 18 Toyn J, Araki H, Saugino A, *et al.* The cell-cycle regulated budding yeast gene DBF2, encoding a putative protein kinase, has a homologue that is not under cell-cycle control. *Gene*, 1991, **104** (1): 63~70
- 19 Millward T, Cron P, Hemmings B. Molecular cloning and characterization of a conserved nuclear serine (threonine) protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (11): 5022~5026
- 20 Zallen J A, Peckol E L, Tobin D M, *et al.* Neuronal cell shape and neurite initiation are regulated by the Ndr kinase SAX-1, a member of the Orb6/COT-1/warts serine/threonine kinase family. *Mol Biol Cell*, 2000, **11** (9): 3177~3190
- 21 Watson K L. *Drosophila* *warts*-tumor suppressor and member of the myotonic dystrophy protein kinase family. *Bioessays*, 1995, **17** (8): 673~676
- 22 Dong X, Zavitz K H, Thomas B J, *et al.* Control of G1 in the developing *Drosophila* eye: *real* regulates cyclin A. *Genes Dev*, 1997, **11** (1): 84~105
- 23 Sprenger F, Yakubovich N, O'Farrell, P H. S-phase function of *Drosophila* cyclin A and its downregulation in G1 phase. *Curr Biol*, 1997, **7** (7): 488~499
- 24 Hirta T, Morisaki T, Nishiyama Y, *et al.* Zyxin, a regulator of actin filament assembly targets the mitotic apparatus by interacting with h-warts/LATS1 tumor suppressor. *J Cell Biol*, 2000, **149** (5): 1073~1086
- 25 Hori T, Takaori-konolo A, Kamikubo Y, *et al.* Molecular cloning of a novel human protein kinase, kpm, that is homologous to warts/lats, a drosophila tumor suppressor. *Oncogene*, 2000, **19** (27): 3101~3109

lats Function in Cell Cycle and Tumorigenesis

CHEN Wei-Li, DENG Ke-Jing

(School of Life Science, Developmental Experiment Base, Fudan University, Shanghai 200433, China)

T. S. GREGORY, XU Tian*

(Howard Hughes Medical Institute, Yale University, School of Medicine, Department of Genetics, New Haven, CT 06536, USA)

Abstract *lats* gene (large tumor suppressor gene), first identified in *Drosophila melanogaster*, has its homologues in mouse and human. The function of *lats* is highly conserved from *Drosophila* to human. Its function includes: as a tumor suppressor gene, *lats* mutation will result in a tumor phenotype; phosphorylated Lats can bind to Cdc2 and regulate cell cycle; Lats may also be involved in size control mechanism via cell-cell communication. The study of *lats* function from *Drosophila* to human can provide a method to study gene functions in mammals using *Drosophila* as a model organism.

key words *lats* gene, tumor suppressor gene, tumor, cell cycle, cyclin, size control, *Drosophila melanogaster*, model organism

* Corresponding author. Howard Hughes Medical Institute, Yale University, School of Medicine, Department of Genetics, New Haven, CT 06536, USA or School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433.

Tel: 86-21-65642518, E-mail: Tian.xu@yale.edu

Received: January 9, 2001 Accepted: February 23, 2001