

生理条件下的 S 期检查点

苏 华 杭海英*

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 细胞周期检查点在细胞遭遇 DNA 损伤因子的攻击或遇到营养缺乏等不利因素作用时, 能够暂时阻止或减慢细胞周期的进程, 是细胞在长期进化中发展起来的抵御 DNA 损伤的重要机制. 不仅如此, 最近的研究表明, 在正常生理条件下, 存在一种 S 期检查点, 对 DNA 复制的速度进行调控. 从分子水平而言, 这种调控作用可能是通过一系列细胞周期调控蛋白如 ATR、9-1-1 复合体、Chk1、Cdc25A 和 CDK2 等的作用来实现的. 这种调节作用对细胞至关重要, 它使 DNA 复制速度不致于过快, 从而减少复制过程中发生错误的几率, 维护基因组的稳定性.

关键词 细胞周期检查点, DNA 复制, 调节机制

学科分类号 Q253, Q291

1 生理条件下的 S 期检查点是维护基因组稳定性的重要机制之一

正在增殖的真核生物的细胞周期分为四个时相, 即 DNA 合成期 (S 期)、有丝分裂期 (M 期), 以及在这两个时相之间的两个间隔期 (G1 和 G2 期). DNA 合成期和有丝分裂期是细胞周期中的两个关键时相. 细胞在 S 期使遗传物质 DNA 得到复制, 而在 M 期将复制后的遗传物质精确等分到两个子细胞中去, 在这两个过程中的任何错误, 如果不能得到及时纠正, 都会导致严重的后果, 如基因突变、染色体组的不稳定, 甚至癌变^[1,2].

作为这两个关键时相之一的 S 期, 是一个更易发生错误的时期, 因为在 DNA 合成过程中, DNA 对遗传毒性因子尤为敏感, 容易发生 DNA 损伤, 碱基的掺入也会出现偶然的错误. 而且在正常的 DNA 复制过程中, 会有一些固有的、暂时性的类似于 DNA 损伤的情况, 如冈崎片段、单链 DNA、尚未连接起来的复制子等. 细胞有理由发展一种机制对此进行监控, 以最大程度地减少错误的发生, 确保最终形成完整的双链 DNA.

作为这种防御机制的一部分, 细胞中的 DNA 聚合酶本身具有的 3'-5' 外切核酸酶活性能够在 DNA 复制过程中发挥校对功能, 将错误掺入的核苷酸及时去除. 如果错误的核苷酸逃脱了这一校对

机制而被引入了 DNA, 或者 DNA 受到了损伤, 细胞中的细胞周期检查点蛋白和 DNA 修复蛋白能够发挥各自的功能, 对此进行补救. 前者使细胞周期暂时停止或者减慢, 后者直接对错配的碱基或受到损伤的 DNA 进行修复^[3].

以上几种方式都属于被动防御, 或者说错误发生后的补救措施. 细胞中还存在一种主动防御, 即防止错误发生的机制, 那就是由一些细胞周期检查点蛋白所参与的、对 DNA 复制过程的调节作用^[3~9].

细胞周期检查点是细胞周期运行过程中的一些调控通路, 过去认为只有当细胞遭遇内源 (如自由基) 或外源 (如紫外线等) DNA 损伤因子的攻击或者当细胞遇到营养缺乏等不利环境因素时, 细胞周期检查点才被激活, 使细胞周期进程暂时减慢或停止, 以提供给细胞充足的时间用于修复受损的 DNA, 或应对不利的环境因素. 但最近两年来, 越来越多的证据表明, 细胞周期检查点通路很可能也调节着正常的 DNA 复制过程, 如限制着 DNA 复制的速度. 我们将这种调节作用叫做生理条件下的 S 期检查点.

* 通讯联系人.

Tel/Fax: 010-64888473, E-mail: hh91@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2005-08-01, 接受日期: 2005-09-30

该检查点的作用很像在高速公路上值勤警车中的警察, 他们随时监视和限制着车辆的行驶速度, 以防车速过快而引起交通事故, 一旦发生事故时, 它们又要对事故进行处理, 有时可能还需要调集更多的警力. 现在人们逐渐认识到在正常 DNA 复制过程中, 细胞周期检查点随时监视和限制着复制进行的速度, 以防止该过程中错误的出现. 只是在正常生理条件下, 这些细胞周期检查点蛋白的浓度和活性维持在一个相对较低的基础水平, 而当细胞中发生 DNA 损伤时, 这些细胞周期检查点被进一步激活, 以加强“警力”, 迅速处理危机.

除此之外, 另一种主动防御的方式是, 在 DNA 复制完成之前, S/M 检查点能够防止未完成复制的染色质提前凝集, 保证 DNA 复制的完整性.

显然, 这些防御机制在维护基因组稳定性及防止癌症的发生方面非常重要, 毕竟在没有任何遗传毒性因子存在的情况下, 细胞中的 DNA 也面对着各种各样潜在的危险, 动物机体也可以自发地产生癌症. 如果没有这套安全保障措施, 后果可想而知.

2 ATR-Chk1 检查点通路参与调节 DNA 复制的分子机制

ATR、Rad9-Rad1-Hus1 (9-1-1 复合体)、Claspin、Chk1 等是一些已被证实作为 DNA 损伤响应的细胞周期检查点中发挥重要功能的蛋白质. 但越来越多的证据表明, 它们的作用不仅限于由 DNA 损伤所激活的细胞周期检查点功能, 这些蛋白质对生理条件下的 DNA 复制也起着一定的调节作用, 它们通过限制 Cdc25A 的活性和浓度, 将 DNA 复制所需的 CDK2 活性保持在一个较低的水平, 从而限制着 DNA 复制进行的速度.

CDK2 是 S 期的关键性激酶, 它通过与 Cyclin E 和 Cyclin A 形成复合物, 在进入 S 期和 DNA 复制过程中发挥其引擎作用. CDK2 的底物包括许多 DNA 复制所需的蛋白质. 前复制复合体 (pre-replication complex) 的形成、复制起始点的激活和复制起始复合体 (pre-initiation complex) 的形成以及复制过程的其他步骤都离不开 CDK2 的作用^[1, 5, 10~12].

在 DNA 损伤响应中, ATR、9-1-1 及 Claspin 等相互配合, 最终引起 ATR 对 Chk1 的磷酸化和活化. 在 DNA 复制过程中如果遇到 DNA 损伤, 被激活的 Chk1 进一步磷酸化 Cdc25A. 而 Cdc25A 是磷酸酶, 它能够去除 CDK2 上的抑制性磷酸根,

是进入 S 期以及 DNA 复制所必需的. Cdc25A 被磷酸化后, 一方面其活性降低, 另一方面它更易被泛素化而水解, 也更易被运输到并滞留在细胞质中, 而其作用的发挥必须是在细胞核中. 这样, ATR-Chk1 通路最终抑制了 CDK2 的活性, 从而抑制了尚未起始的 DNA 复制起始点的发动. 在正常 DNA 复制过程中, ATR、9-1-1、Claspin 及 Chk1 等可能通过相似的机制限制着 DNA 复制起始点发动的频率 (图 1). 在这两种情况下, 该通路被激活的程度不同, 在正常生理条件下, 该通路保持基础活性, 而在发生 DNA 损伤时, 该通路的活性大大提高. 另外, 下文将要提及, 在正常生理条件下, 该通路的激活信号可能是 DNA 复制起始点处解链而形成的单链 DNA 或 / 和其上所结合的 RPA, 可能还有其他种类的激活信号. 而在 DNA 损伤检查点中, 上游激活信号是各种各样的 DNA 损伤.

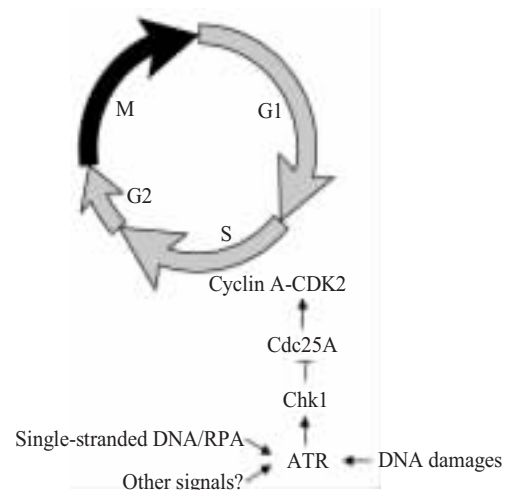


Fig. 1 Mechanism of ATR-Chk1 functioning in physiological S-phase checkpoint

图 1 ATR-Chk1 参与生理条件下 S 期检查点作用的分子机制 ATR-Chk1 通路对正常 DNA 复制的调节作用机制与该通路在 DNA 损伤检查点中的作用机制相似, 都是通过限制 Cdc25A 的活性和浓度, 从而限制或者抑制 DNA 复制所需的 CDK2 的活性. 在正常 DNA 复制过程中这一通路作用的结果是限制了 DNA 复制进行的速度. 而在 DNA 损伤检查点中, 该通路被进一步激活, 最终抑制了尚未起始的 DNA 复制起始点的发动. 在正常生理条件下, 该通路的激活信号可能是单链 DNA 或 / 和其上所结合的 RPA, 可能还有其他种类的激活信号. 在 DNA 损伤检查点中, 上游激活信号是各种各样的 DNA 损伤. (图中箭头表示促进或激活作用, “T”形箭头表示阻碍或抑制作用.)

在细胞周期检查点调控通路中, ATR (ATM and Rad3 related) 是最上游的 DNA 损伤感受因子之

一, 对几乎所有类型的 DNA 损伤都能够作出反应, 包括由紫外线等造成的 DNA 单链断裂、化学物质等引起的碱基破坏和复制叉的停止, 以及电离辐射等引起的 DNA 双链断裂等. 当它感受到 DNA 损伤时, 通过对下游分子如 Chk1 的磷酸化而激活 DNA 损伤检查点活性. ATR-Chk1 信号通路有很多下游底物, 都是细胞周期的重要调节分子, 如 p53、Cdc25A 和 Cdc25C 等. 动物体或细胞缺少 ATR 或 Chk1 是不能存活的, 可能是由于 ATR-Chk1 对于细胞中一些基本的过程起着必不可少的调节作用^[1], 而这其中可能就包括正常的 DNA 复制过程.

事实上, 最近的研究发现, 在生理条件下, ATR 一直处于活性状态, 并在 S 期结合到染色质上^[13], 它通过限制 CDK2 的活性, 控制着 DNA 复制起始点发动的时间和密度, 最终限制着 DNA 复制的速度^[6, 7]. 的确, 当用 RNA 干扰方法降低 ATR 的蛋白质水平时, 导致 Cdc25A 的积累和其磷酸酶活性的提高^[8]. 进一步研究的结果又显示, 用 RNA 干扰的方法降低 Chk1 的表达能够导致细胞中复制起始增加^[9]. 这些现象部分地解释了 ATR 控制 DNA 复制起始频率的机制.

9-1-1 复合体是由 Rad9、Rad1 和 Hus1 组成的三分子聚合体, 它也是 DNA 损伤的感受因子之一, 9-1-1 复合体对于 ATR 磷酸化和激活 Chk1 是必需的. 电镜分析表明, 9-1-1 复合体是一个直径 5 nm、具有 2 nm 孔洞的三聚体环, 类似于 PCNA (proliferating cell nuclear antigen) 三聚体环 (years and authors)^[1]. 9-1-1 复合体以三聚体环的形式套在 DNA 上, 并定位于 DNA 损伤处附近(图 2), 在细胞周期检查点通路中发挥作用.



Fig. 2 9-1-1 complex is located to damage sites on DNA

图 2 9-1-1 复合体以三聚体环的形式套在 DNA 上, 并定位于 DNA 损伤处附近

Rad9 上有一个伸出的小结构域, 它是维持正常细胞周期检查点功能所必需的.

Claspin 是另一种在 ATR-Chk1 检查点通路中发挥作用的蛋白质. 它介导 ATR 与 Chk1 蛋白之间的相互作用, 是 ATR 磷酸化并激活 Chk1 所必需

的^[14].

研究表明, 9-1-1 复合体、Claspin 等也参与对 DNA 复制的调节作用, 当用 RNA 干扰方法使 Rad9、Hus1 或 Claspin 的蛋白质表达水平下降后, 发现细胞中 Cdc25A 蛋白的水平升高^[8].

Zou 等^[15]研究发现, 人的细胞中 9-1-1 复合体通过 Rad9 与单链结合蛋白 RPA (复制蛋白 A) 直接相互作用, 而 ATR 也被发现能够被 RPA 所覆盖的单链 DNA 所激活^[6]. 所以 ATR-Chk1-Cdc25A 通路可能是被 DNA 复制起始点处解开的 DNA 单链或 / 和其上所结合的 RPA 蛋白所激活, 而且很可能 9-1-1 复合体也在该通路中参与对 DNA 复制起始的调控 (我们未发表的数据支持这种推测).

3 ATM-Chk2 检查点通路对 DNA 复制的调节作用

ATM-Chk2 也是十分重要的细胞周期检查点调控通路. ATM 能被 DNA 损伤 (主要是 DNA 双链断裂) 所激活, 并继而磷酸化和激活 Chk2. Chk2 能够磷酸化许多与细胞周期调控有关的蛋白质, 如 p53、Cdc25 等等, 并调节其活性. Gautier 等^[16]用蛙卵提取物系统所做的体外实验初步显示, 在生理条件下的 DNA 复制过程中, ATM 被暂时性激活. 而且当用抗体中和 ATM 的作用时, 发现 DNA 复制的起始增加. 但相对于 ATR-Chk1 检查点通路而言, 有关 ATM-Chk2 检查点通路在调节 DNA 复制方面作用的研究更不成熟, 所以也是一个尚有很多悬念的研究领域.

4 更多有待研究的问题

关于生理条件下 DNA 复制过程中细胞周期检查点的调节作用, 目前的研究才刚刚显露出冰山之一角, 更多的问题尚有待研究.

例如, 这方面已有的研究大多为体外生化实验, 尚缺乏体内实验的结果, 细胞水平的研究也需要进行. 如果能够证实 ATR、9-1-1 复合体、Claspin、Chk1 等发生缺陷的细胞 DNA 复制速度加快, 将是它们参与调节 DNA 复制的有利证据. 事实上, 我们未发表的数据已经显示, Rad9 或 Rad1 的缺失导致细胞中 DNA 的复制加快, 并伴随着细胞中 DNA 损伤的增多.

关于 9-1-1 在生理条件下对 DNA 复制发挥调节作用的分子机制还有待深入的研究. 9-1-1 的上游激活信号是否与激活 ATR 的信号相同? 是否

9-1-1 确实参与控制复制起始点发动的频率? 如果是, 它参与该作用是否依赖于 ATR-Chk1 通路? 这都是悬而未决的问题。

目前尚不清楚 ATR 的激活是否还有其他信号分子, 也不清楚是否单链 DNA 或 RPA 也能直接或间接激活其他的细胞周期检查点蛋白如 Claspin、ATM、BRCA1、p53 等。

前文所提到的 ATM 在调节 DNA 复制起始方面的作用 (体外实验) 在细胞中是否也能被证实? 它是否需要通过调节 Chk2 而实现这种功能? 具体的分子机制是什么?

已有的研究多数集中在 DNA 复制的起始方面, 但既然 ATR、Chk1 等能够调节 Cdc25A, 并最终调节 S 期激酶 CDK2 的活性, 那么这些分子对 DNA 复制的调节作用很可能不仅限于 DNA 复制的起始, 它们是否也对 DNA 复制过程中的链延伸等步骤有着某种调节作用?

另外, 在细胞中, 是否还有其他蛋白质参与对 DNA 复制的调节? 是否还有其他的调节方式? 最新的一篇文章^[16]报道了另一种重要的细胞周期检查点蛋白 BRCA1 在 S 期与拓扑异构酶 II α 相互作用, 参与复制后的一对互相缠绕的 DNA 的分离 (decatenation). 但还不清楚是否 BRCA1 对于 DNA 复制过程本身也发挥某种调节作用。

以上或者更多蛋白质之间的相互作用、作用的方式及动力学特征等等都是重要的、但尚未研究清楚的问题, 这些问题的答案将进一步揭示细胞周期检查点蛋白在调节 DNA 复制过程中的作用机制。

既然存在这样一种维护基因组稳定性的调节机制, 那么当其中的参与蛋白质发生缺陷时, 是否细胞中的 DNA 损伤会增多呢? 是否这些基因的突变会导致癌症的发生? 这些都是十分有趣并有待解决的问题。

参 考 文 献

1 Kastan M B, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*,

2004, **432** (7015): 316~323

- 2 Rajagopalan H, Lengauer C. Aneuploidy and cancer. *Nature*, 2004, **432** (7015): 338~341
- 3 Sancar A, Lindsey-Boltz L A, Unsal-Kacmaz K, *et al.* Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*, 2004, **73**: 39~85
- 4 Shechter D, Costanzo V, Gautier J. Regulation of DNA replication by ATR: signaling in response to DNA intermediates. *DNA Repair*, 2004, **3**: 901~908
- 5 Machida Y J, Hamlin J L, Dutta A. Right place, right time, and only once: replication initiation in metazoans. *Cell*, 2005, **123** (1): 13~24
- 6 Shechter D, Costanzo V, Gautier J. ATR and ATM regulate the timing of DNA replication origin firing. *Nat Cell Biol*, 2004, **6** (7): 648~655
- 7 Marheineke K, Hyrien O. Control of replication origin density and firing time in *Xenopus* egg extracts: role of a caffeine-sensitive, ATR-dependent checkpoint. *J Biol Chem*, 2004, **279** (27): 28071~28081
- 8 Sorensen C S, Syljuasen R G, Lukas J, *et al.* ATR, Claspin and the Rad9-Rad1-Hus1 complex regulate Chk1 and Cdc25A in the absence of DNA damage. *Cell Cycle*, 2004, **3** (7): 941~945
- 9 Syljuasen R G, Sorensen C S, Hansen L T, *et al.* Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage. *Mol Cell Biol*, 2005, **25** (9): 3553~3562
- 10 Takeda D Y, Dutta A. DNA replication and progression through S phase. *Oncogene*, 2005, **24** (17): 2827~2843
- 11 Saxena S, Dutta A. Geminin-Cdt1 balance is critical for genetic stability. *Mutation Research*, 2005, **569**: 111~121
- 12 Pollok S, Stoepel J, Bauerschmidt C, *et al.* Regulation of eukaryotic DNA replication at the initiation step. *Biochem Soc Trans*, 2003, **31** (Pt 1): 266~269
- 13 Dart D A, Adams K E, Akerman I, *et al.* Recruitment of the cell cycle checkpoint kinase ATR to chromatin during S-phase. *J Biol Chem*, 2004, **279** (16): 16433~16440
- 14 Christiano C, Chini S, Chen J. Human Claspin is required for replication checkpoint control. *J Biol Chem*, 2003, **278** (32): 30057~30062
- 15 Wu X, Shell S M, Zou Y. Interaction and colocalization of Rad9/Rad1/Hus1 checkpoint complex with replication protein A in human cells. *Oncogene*, 2005, **24** (29): 4728~4735
- 16 Lou Z, Minter-Dykhouse K, Chen J. BRCA1 participates in DNA decatenation. *Nat Struct Mol Biol*, 2005, **12** (7): 589~593

Physiological S-phase Checkpoint

SU Hua, HANG Hai-Ying*

(Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Cell cycle checkpoints are protective mechanism responding to DNA damages originated from external or internal factors. When cells are exposed to genotoxic stress or when nutrition crisis occurs, cell cycle progression is usually stopped or slowed down by cell cycle checkpoints to allow for DNA repair or for handling the crisis. Besides, recent studies suggest that some cell cycle checkpoint proteins are also involved in regulating

physiological DNA replication via controlling the rate of DNA replication. Cell cycle checkpoint proteins ATR, 9-1-1 complex, Chk1, Cdc25A and CDK2 may participate in this process. This kind of regulation is supposed to be very important for ensuring accurate DNA replication and maintaining genomic stability.

Key words cell cycle checkpoint, DNA replication, regulation mechanism

*Corresponding author . Tel/Fax: 86-10-64888473, E-mail: hh91@sun5.ibp.ac.cn

Received: August 1, 2005 Accepted: September 30, 2005