

The Multiple Functions of Molecular Chaperones. YU Jun, MA Kang-tao, ZHANG Nai-heng (*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*).

Abstract The members of the molecular chaperone families are widely distributed from prokaryotes to eukaryotic cells. The molecular chaperones function *in vivo* to recognize and stabilize unfolded or partially folded polypeptides, and protect polypeptides from inappropriate intra- or interchain interaction. In some circumstances,

the chaperones interact with native proteins and promote rearrangement of oligomeric complexes. Stemming from their ability to recognize and modulate the state of folding of polypeptides within cells, the molecular chaperones serve many functions including mediating mitochondrial protein translocation, regulating signal pathway and being involved in microtubule nucleation.

Key words molecular chaperone, protein translocation, signal pathway, microtubule nucleation

细胞周期的关卡调控途径研究进展

张平波 洪锡钧 刘 堰

(西南师范大学生命科学系, 重庆 400715)

摘要 目前已从不同物种、不同种类细胞中筛选到很多关卡基因和蛋白质, 如 ATM、RAD53、CHK1 等. 有关它们在具体关卡调控途径中的作用, 以及和癌变发生的关系已有许多报道.

关键词 细胞周期, 关卡调控途径, 细胞癌变

学科分类号 Q28

细胞周期是指连续分裂的细胞从一次有丝分裂结束到下一次有丝分裂完成所经历的整个序贯过程. 在这一过程中, 遗传物质复制, 各组分加倍, 然后平均分配到两个子细胞中. 细胞周期的概念最早于 50 年代由 Howard 和 Pelc 等提出, 并将细胞周期划分为四个时期: G1 期 (DNA 合成准备期) 和 S 期 (DNA 合成期)、G2 期 (有丝分裂准备期) 及 M 期 (有丝分裂期). 细胞在细胞周期中顺序经过 G1 → S → G2 → M 而完成其增殖. 早期对细胞周期各时相具体的形态变化和生化事件已有详细的研究, 尤其是发现了有丝分裂的成熟促进因子 (maturation promoting factor, MPF)、周期蛋白 (cyclin) 和细胞分裂周期 (cell division cycle) 基因等, 掀起了从基因水平、分子水平

研究细胞周期的调控机制的热潮. 80 年代末, Murray 和 Hartwell 等^[1,2] 研究了细胞周期中按时序发生的各事件的相互依赖关系后, 提出细胞周期的关卡调控 (checkpoints control) 的概念. 这种关卡调控的功能是保证细胞周期在上游事件正确完成的前提下才启动下游事件.

1 关卡调控研究的材料及方法

两栖类、软体动物等的卵母细胞和早期胚胎, 哺乳动物的躯体细胞, 低等真核细胞酵母等是研究细胞周期关卡调控的最常用的材料. 目前用辐射 (紫外线、 γ 射线) 或 DNA 烷化剂处理分裂细胞造成 DNA 损伤或阻断 DNA

收稿日期: 1996-12-11, 修回日期: 1997-06-06

复制，使细胞周期停滞（arrest）于某个特殊时期，从解除了细胞周期前后依赖关系的辐射敏感或温度敏感突变株中筛选到关卡基因，纯化关卡基因蛋白，按细胞周期被阻断的时相来推断出关卡基因及其蛋白作用的先后活化序列关系，即关卡调控途径（checkpoint control pathways）。

涉及检查 DNA 完整性的关卡基因有四大类：阻断新一轮细胞周期启动点（start）的 G1/S 关卡基因、阻断 DNA 合成的 S 期进程关卡基因、DNA 损伤阻断有丝分裂的 DNA 损伤关卡基因和 G2/M 转换处（G2/M transition）的 G2/M 的关卡基因（表 1）。

表 1 细胞周期不同时相被阻断的关卡基因

停滞时期	关卡基因
G1 相	染色体浓集调节因子 1(RCC1) 细胞不适时转换基因 5(Cut5) 非有丝分裂的耦联的复制基因 1(rum1) 有丝分裂入口关卡基因 1(MEC1) 细胞分裂周期基因 16, 18, 23, 27(cdc16, 18, 23, 27) p53
S 相	羟基腺敏感基因 12, 16(Hus12, 16) 辐射停滞缺陷基因 53(RAD53) POL 2/PUN2
G2/M 相	辐射停滞缺陷基因 9, 21, 24, 27(RAD9, 21, 24, 27) p53 有丝分裂入口关卡基因 1, 3(MEC1, MEC3) 毛细血管扩张性共济失调症基因(ATM) ^[3]

2 ATM 调控途径（ATM pathway）

一般认为关卡调控途径由监测上游事件的感受器、信号传导以及由细胞周期引擎组成的反应元件等构成的^[4]。ATM 基因是一种人类常染色体隐性遗传的致死疾病——毛细血管扩张性共济失调症（ataxia telangiectasia, AT）病人上鉴定的，并已被序列分析^[3]。人类中大约有 1% 的人是 ATM 缺失的异源合子，并发现对电离辐射的极度敏感，有诱发患癌症的危险性。

ATM 基因编码一种具有和 3'-磷酸酰肌醇激酶的催化亚基类似序列的蛋白质，而且

ATM 基因也表现为周裂殖酵母（*S. pombe*）中的 rad3 基因的序列相似性^[5]。从 AT 症病人来源的细胞对损伤 DNA 的物质，尤其是电离辐射和放射性表现出很高的敏感性，有类似于 rad3 突变体的表型特征，提示结构改变必然影响功能。这种高度敏感性导致细胞不能在 DNA 损伤关卡处停滞分裂，细胞继续进行 DNA 复制，因而使细胞迅速死亡。芽殖酵母（*S. cerevisiae*）也有两种与 ATM 蛋白相关的基因产物：有丝分裂入口关卡（mitosis entry checkpoint）蛋白 1（MEC1），它是有丝分裂关卡所必需的一种基因蛋白质，又名 ESR2 或 SAD3，它和裂殖酵母的 Rad3 有同源性；另一种产物是端粒酶 1（Tel1），它与端粒结构的保护有关。尽管 Tel1 突变体在各种关卡中不表现缺失，但 Mec1 和 Tel1 有一些相互重叠的功能^[6]。现有许多实验表明 ATM 蛋白是 DNA 损伤检测器的一个成分，其发挥作用的时间在 p53 蛋白之前，而且还参与 G2/M 关卡调控，提示 ATM 为每个细胞周期转换传递着不同的信号到产应分子上^[7,8]。因此，ATM 很可能就是 G2/M 关卡的一个生化标志。

3 RAD53 基因

辐射停滞缺陷（radiation arrest defective）基因 53（RAD53），又叫 SAD1、MEC2 或 SPK1。Sanchez 及其同事的工作证实：RAD53 基因是 mec1⁻致死基因的抑制基因，为多拷贝的。RAD53 蛋白是 DNA 损伤关卡，S 期关卡以及 DNA 损伤诱导反应所必需的成分，在 MEC1 突变细胞中，RAD53 不发生损伤依赖性的磷酸化作用，与 mec1⁻有重叠功能的 TEL1 基因的过度表达又能恢复 RAD53 蛋白的磷酸化作用。RAD53 蛋白在几个关卡的信号传导途径中有多种功能，其发挥作用的序列处在 Mec1 和 Tel1 的下游，它能激活细胞周期转换的特异性的反应元件如 CHK1 和 p53（G1/S 转换）。

现以酵母中 DNA 损伤信号传导途径来说明（图 1）：

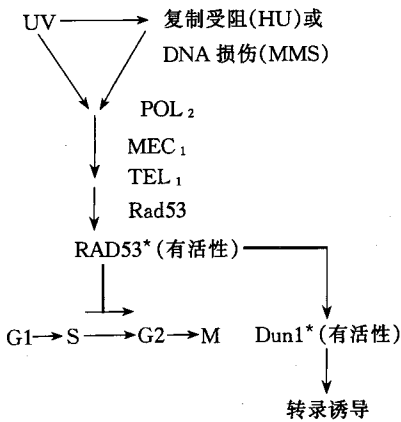


图1 酵母DNA损伤信号传导途径模型^[6]

紫外线造成的DNA损伤信号被某个未知感受器感受；S期时甲基磺酸甲酯（methyl methane sulfonate, MMS）引起的DNA损伤和羟基脲（hydroxyurea, HU）引起的核苷酸缺失或DNA多聚酶突变失活引起的DNA复制受阻，这些信号立即被多聚酶2（POL2）感受；由POL2和其他感受器产生的关卡活化信号通过MEC1和TEL1激酶传导，引起RAD53蛋白磷酸化表现出活性（用Rad53*表示）。随后活化的Rad53*引起细胞周期停滞或使Dun1激酶活化，活化的Dun1诱导损伤诱导性基因表达。

4 Chk1 (RAD27)

裂殖酵母中与有丝分裂细胞周期停滞相关的DNA损伤关卡需蛋白激酶p56^{chk1}。目前已

经知道紫外光、γ射线或DNA烷化剂诱导的DNA损伤会导致p56^{chk1}的磷酸化^[9]，而且当其他关卡基因失活时不发生p56^{chk1}的磷酸化。因此，p56^{chk1}发挥作用的时间似乎在其他关卡基因如rad3的下游。当Chk1基因编码的蛋白激酶在每个细胞中存在许多拷贝时，p56^{chk1}可抑制由于编码p34^{chk2}的基因发生特殊的等位基因突变而产生的生长停止。p34^{chk2}是高度保守的周期蛋白依赖性的激酶，其作用是控制细胞周期进程。虽然p56^{chk1}对正常实验条件下的营养生长不是必需的，但是当紫外线、γ射线造成DNA损伤或DNA连接酶活性受限制时，p56^{chk1}对细胞生存来说又是必需的。因为缺少p56^{chk1}的细胞如果带着受损DNA进入有丝分裂，细胞肯定会死亡。chk1基因已从辐射敏感的突变体，rad27·T15细胞株得到克隆。p56^{chk1}蛋白是细胞周期停滞所必需的，但不是修复DNA损伤所必需的，DNA损伤时chk1被磷酸化。而当用羟基脲抑制S期时chk1并不被磷酸化。chk1突变体的遗传分析提示chk1是反应元件的成员，与细胞周期的调控机制相关。通过检查各个关卡突变体在受辐射后chk1的磷酸化程度，Walworth和Bernards正式将chk1蛋白排在裂殖酵母中绝大多数关卡蛋白的下游，至今仍未有鉴定出存在于chk1下游的关卡基因的事实也支持chk1的确是作为反应元件的认识。

上面这些基因及其产物在酵母有丝分裂关卡调控途径中的关系可见图2。

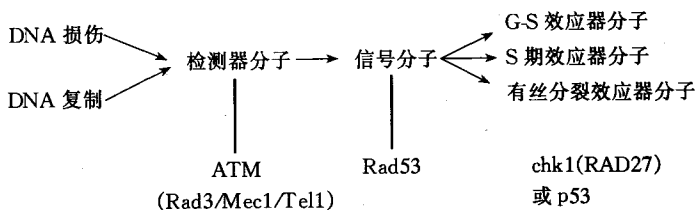


图2 酵母关卡调控途径检测器、信号传导及效应器分子

5 关卡调控途径与细胞癌变

流行病学和分子生物学研究结果表明细胞

的癌变需要一些突变基因的积累，其中以细胞增殖阻遏基因的失活突变最为重要，这种突变一般都是通过有丝分裂过程中染色体重组或丢

失而致野生型基因失活或丢失的情况下发生的。编码细胞周期蛋白依赖性激酶 (cyclin dependant kinase, CDKs) 的抑制因子 (CKIs) 的基因, 诸如以分子质量命名的 p15, p16, p21, p27, p40, p53 等均被认为是肿瘤抑制基因, 这些抑制基因的失活可导致 CDKs 的活性异常升高, 进而引发无限制的增殖。

p16 是 1994 年由 Kamb 和 Carson^[10, 11] 两实验室几乎同时发表的肿瘤抑制基因, 定位在人染色体 9P²¹ 的由 MTS₁ 编码的 16 ku 的蛋白质。p16 基因的完整编码序列包括 2 个内含子和 3 个外显子, 其中 5' 端 12 bp 区域为外显子。虽然 p16 缺失在原发肿瘤中是否是一种频发事件仍有争论, 但是它在大多数肿瘤细胞株中显示出的重排, 缺失或突变则是被确认了的事实。最近 Utah 研究小组证实 p16 能直接与 CDK₄ 结合, 竞争性抑制 CDK₄ 的活化因子 (周期蛋白 D₁) 与 CDK₄ 的结合, 从而使细胞周期停滞在 G1/S 关卡处。

p21 是 1992 年 Xiong 等发现的一种抑制因子, p21 基因 Cipl 是通过酵母二次杂交筛选体系鉴定出的与 CDK₂ 相互作用的基因。El-Deiry 等用杂交法鉴定出 p21 在人细胞中为野生型 p53 激活的基因 WAF1, 它们都定位于人染色体 6P²¹ 区。p21 能与各种 cyclin、CDK 及 DNA 聚合酶的 δ 亚单位 PCNA (核增殖抗原) 组成四聚体, 该复合体只存在于正常细胞, 而不存在于转化细胞。p21 具有抑制 CDK 活性、抑制 DNA 合成、受野生型 p53 调控, 并发挥其监视基因组完整性的功能, 它在 G1 期限制点和 G1/S 关卡调控中发挥重要作用。p21 是 p53 下游的一个靶分子, 其启动子具有 p53 的结合位点, 将含有 p53 结合位点的 WAF1 启动子与报告基因连接可构建为受 p53 诱导的报告基因表达质粒。Pulic 和 Leonardo 等的实验证实以 γ 射线照射人的二倍体成纤维细胞 (NDF) 时, NDA 有少量未修复的断裂, 细胞表现为类似老化细胞的 G1 期长期阻断, 而不进入 S 期, 同时伴有 p53、p21 长期高水平表达。于是可假设 DNA 受诱导, p53 表达,

p53 又调控 p21 表达, p21 通过抑制 cyclinD₁-CDK₄、cyclinE-CDK₂ 和 cyclinA-CDK₂ 引起细胞阻断在 G1 期限制点或 G1/S 关卡处, 使受损 DNA 有修复的机会。

但是, 对体外培养的肌细胞分化过程的研究表明, p21 的表达也有不依赖 p53 的方式, 而为肌源性转录因子 D (myogenic D, MyoD) 调控。同时在诱导白血病细胞向单核及巨噬细胞分化过程中, p21 表达增加未见 p53 表达增加, 表明此过程 p21 的表达以不依赖 p53 的方式进行。

综上所述, 关卡基因及蛋白起着监测细胞周期分子事件的程序, 确保细胞周期转换的正确性。在关卡处, 一些特异性的细胞周期蛋白与 CDKs 瞬时结合, 以及各类外源性信号, 由于环境因素或发育刺激整合进入细胞周期。而许多关卡在癌变过程中发生了负调控, 特别是起始点的负调使得细胞生长和分化对外源性信号的感受和传导变得迟钝, 表现出某些 cyclins 的异常表达或 CDKIs 的缺失和失活, 细胞带着损伤的 DNA 通过正常的限制进入 S 期, 使未能完成修复的细胞复制, 由此而累积起来的遗传改变则生成特定的肿瘤表型。总之, 对关卡中各基因和蛋白质及其相互作用的具体调控途径的研究将有助于加深对细胞增殖的分化、衰老、编程死亡和癌变的认识。

参 考 文 献

- 1 Murray A W, Kirschner M W. Dominoes and clocks: the union of two views of the cell cycle. *Science*, 1989, **246** (4930): 614~ 621
- 2 Hartwell L H, Weinert T A. Checkpoints controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, 1989, **246** (4930): 629~ 634
- 3 Savitsky K, Shira A B, Gilad S *et al.* A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to P-3 kinase. *Science*, 1995, **268** (5218): 1749~ 1753
- 4 Murray A W. Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature*, 1992, **359** (6396): 599~ 604
- 5 Jimenez G, Yucel J, Rowley R *et al.* The rad3⁺ gene of *Schizosaccharomyces pombe* is involved in multiple checkpoint functions and in DNA repair. *Proc Natl Acad Soc USA*, 1992, **89** (11): 4952~ 4956
- 6 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** (5247): 357~ 359
- 7 Lydall D, Weinert T. Yeast checkpoint genes in DNA damage processing: implications for repair and arrest. *Science*, 1995, **270** (5241): 314~ 315
- 8 Carr A M. Checkpoints take the next step. *Science*, 1996, **271** (5247): 314~ 315
- 9 Walworth N C, Bernards R. Rad-dependent response of the chk1-encoded protein kinase at the DNA damage checkpoint. *Science*, 1996, **271** (5247): 353~ 356
- 10 Kamb A, Gruis N A, Feldhaws J W *et al.* A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*, 1994, **264** (5157): 436~ 439
- 11 Nobori T, Milura K, Wu D J *et al.* Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*, 1994, **368** (6473): 753~ 756
- 12 Skapek S X, Rhee J, Spicer D B *et al.* Inhibition of myogenic differentiation in proliferating myoblasts by cyclinD-dependent kinase. *Science*, 1995, **267** (5200): 1022~ 1023
- 13 Haley O, Novitch B G, Spicer D B *et al.* Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science*, 1995, **267** (5200): 1018~ 1020

- 14 Parker S B, Eichele G, Zhang P *et al.* p53-independent expression of p21^{cdi} in muscle and other terminally differentiating cells. *Science*, 1995, **267** (5200): 1024~ 1027

Progress in the Studies of Checkpoint Control Pathways of Cell Cycle. ZHANG Ping-bo, HONG Xi-jun, LIU Yan (*Department of Life science, Southwest Normal University, Chongqing 400715, China*).

Abstract Many checkpoint genes and proteins have been screened from different species and cells until now, such as ATM, RAD53, CHK1 etc. There are a lot of reports about their function in checkpoint control pathways as well as the correspondances with cancers.

Key words cell cycle, checkpoint control pathway, cell carcinogenesis

寡糖分离和结构分析进展

张剑波 田庚元

(中国科学院上海有机化学研究所, 上海 200032)

摘要 寡糖, 尤其是糖缀合物中的寡糖链, 在生命过程的细胞识别、信号传导和受体调节现象中扮演着重要的角色. 高效液相色谱、毛细管电泳、质谱、核磁共振、荧光标记糖电泳和试剂阵列分析方法等新技术的应用使得寡糖的分离和结构鉴定变得更为快速、简便和准确; 同时多种有力工具的联合运用将更深刻地揭示极微量寡糖的结构-功能关系成为可能.

关键词 寡糖, 分离, 结构分析

学科分类号 Q53

因为糖缀合物上的寡糖链在生命过程的重要作用, 所以开展寡糖的结构与功能关系研究显得非常重要. 在寡糖的分离与分析方面已经有了许多很好的综述, 下面只对近年来这方面的研究进展作一简单评述.

1 寡糖的分离

寡糖链的分离和纯化, 是寡糖结构分析的关键环节. 寡糖自身在组成、连接、衍生化、微观不均一性等方面的高度复杂性及其检测上

的困难, 使得寡糖混合物的分离一直困扰着糖化学家. 因此选择合适的方法对收集到的混合糖链进行分离, 是一项摸索性很强的工作. 下面就最近几年糖的分离手段的主要进展分述如下.

1.1 石墨化碳柱的高压液相色谱

与糖类高压液相色谱分析中常用的正相、反相和阴离子交换柱的分离原理不同的是, 石

收稿日期: 1996-12-13, 修回日期: 1997-06-23