

酿酒酵母 Cdk1 抑制蛋白的研究进展*

刘雪琴^{1)**} 任 凭^{2)**} 张 择¹⁾ 曾凡力^{1)***}

(¹⁾ 河北农业大学生命科学学院, 保定 071001; ²⁾ 上海科技大学免疫化学研究所, 上海 201210)

摘要 细胞周期蛋白依赖性激酶 1(cyclin-dependent kinase 1, Cdk1)是真核生物细胞周期调控的核心,也是维持基因组稳定性的重要激酶,其活性受到严格调控。CDK 抑制蛋白(cyclin-dependent kinase inhibitor, CKI)是调节其活性的一类关键负调控因子,CKI 功能失活导致细胞不受控制地增殖,促进癌症的发生发展。酿酒酵母作为细胞周期研究的重要模式生物,在揭示 CDK 活性调控机制中发挥着重要作用。酿酒酵母中已发现的 Cdk1 抑制蛋白 CKI 包括 Far1、Sic1 以及最近鉴定的 Cip1 蛋白。这三个 CKI 蛋白在不同细胞时期中,通过抑制 Cdk1 活性调控细胞周期的进程。此外,CKI 还在应对环境胁迫,保持基因组稳定性中发挥重要作用。本文对酿酒酵母 Cdk1 抑制蛋白 CKI 的研究进展,尤其是 CKI 在细胞周期运转及胁迫应答中的作用做出综述,以期对细胞周期及癌症的基础研究提供模式依据。

关键词 酿酒酵母, 细胞周期, Cdk1, CDK 抑制蛋白, Cip1

学科分类号 Q527, Q291

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0432

从单细胞酵母到高等动植物细胞,真核生物均采取类似的细胞分裂周期更新其生命。细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)是真核生物细胞周期运转的核心引擎。在细胞周期调控研究中,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和裂殖酵母(*Schizosaccharomycs pombe*)作为模式生物发挥着关键作用。Hartwell 等^[1]和 Nurse 等^[2]分别利用这 2 种酵母筛选到控制细胞周期运转的 CDK 催化亚基 Cdk1。Hunt 等^[3]发现了 CDK 的调控亚基,周期蛋白(cyclin),共同揭示了真核生物普遍存在的细胞周期调控机制,因此获得 2001 年诺贝尔生理学或医学奖。Cdk1(Cdc28)是酿酒酵母细胞周期调控的唯一且必需的 CDK 激酶。在裂殖酵母中,其同源蛋白为 Cdk1(Cdc2),在高等真核生物中则进化出多个 CDK 激酶,但 Cdk1(Cdc2)仍为细胞周期调控最关键的 CDK 激酶^[4-5]。因为 CDK 调控的高度保守性以及酵母细胞周期调控研究的诸多优势,酿酒酵母和裂殖酵母成为研究细胞周期及 CDK 调控机制的理想模式生物。

酿酒酵母 CDK 复合体包含催化亚基 Cdk1、周期特异性表达的调节亚基 cyclin 和结构亚基 Cks1。除周期蛋白(cyclin)和多重磷酸化对 Cdk1 激

酶活性进行调控外,细胞内还有一些对其活性起负调控作用的蛋白质,称为 CDK 抑制蛋白(cyclin-dependent kinase inhibitor, CKI)。不同的 CKI 在细胞周期的不同阶段与 Cdk1 单独结合或与 cyclin-Cdk1 复合物结合,抑制其激酶活性,从而阻止细胞周期进程。Cdk1 活性的失调直接导致细胞增殖不受控制和基因组的不稳定性,这也是癌症发生发展的重要标志。CKI 抑制 cyclin-Cdk1 复合物的活性,也就是抑制细胞增殖,它们与促进细胞增殖的因子相互协调,共同控制细胞增殖周期进程。然而,由于调节亚基 cyclin 在物种间的多样性,导致与之互作的抑制蛋白 CKI 也很难通过序列保守性被发现。

在之前的研究中,酿酒酵母中仅有 2 个 CKI 蛋白被发现,分别为 Far1 和 Sic1。本实验室通过

* 河北农业大学“百人计划”引进人才启动基金资助项目(ZD201622)。

** 并列第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 0312-7528593, E-mail: fanli.zeng@pku.edu.cn

收稿日期: 2017-11-28, 接受日期: 2018-02-07

蛋白质组学的方法鉴定了一个新的 CKI 蛋白, 命名为 Cip1(Cdk1 interacting protein 1)^[6]. 近期, 本实验室和 Tseng 实验室又分别独立报道了 Cip1 在 DNA 复制胁迫和高渗胁迫应答中的调控作用^[7-8]. 这些最新进展为 Cdk1 激酶的活性调控及细胞周期调控的研究提供了新的补充. 本文对酿酒酵母 Cdk1 抑制蛋白 CKI 的研究进展, 尤其是 CKI 在细胞周期运转及胁迫应答中的作用做出综述, 以期对细胞周期及癌症的基础研究提供模式依据.

1 酿酒酵母 Cdk1 活性调控

Cdk1 活性的调控方式主要包括不同时期特异性 cyclin 的结合、激酶 Cak1 和 Swe1/Wee1 以及磷酸酶 Mih1/Cdc25 的磷酸化调节、抑制蛋白的结合等多个方面. Cdk1 活性调控的主要方式见图 1. 首先, Cdk1 与细胞周期特异表达的 cyclin 结合才具有激酶活性, 决定其在不同时期、不同空间磷酸化不同的底物, 从而执行细胞周期调控的不同功能, 决定细胞周期的有序进行.

酿酒酵母中, Cdk1 和结构亚基 Cks1 的表达水平在整个细胞周期中保持相对稳定, 因此 CDK 活性依赖于时序性表达的 cyclin. 在酿酒酵母中一共有 9 个周期特异性 cyclin, 分别为 G1/S cyclin Cln1、Cln2 和 Cln3; S cyclin Clb5 和 Clb6; 以及 G2/M cyclin Clb1、Clb2、Clb3 和 Clb4. Cyclin 的时序性积累主要受转录及泛素介导的蛋白酶降解系统调控^[9-14]. 结构亚基 Cks1 并不影响 CDK 活性, 而是增强 Cdk1 与底物的结合^[15-17].

此外, Cdk1 的翻译后修饰对其活性的调控也至关重要. 在真核生物中, Cdk1 两个位点的磷酸化调控机制高度保守. 在 Cdk1 的 T-loop 结构域存在一个保守的苏氨酸磷酸化位点, 能被上游激酶 CAK(cyclin dependent kinase activating kinases)磷酸化激活^[18-19]. 在酿酒酵母中 Cak1 作为 Cdk1 的上游激酶, 磷酸化 Cdk1 第 168 位苏氨酸(Thr168), 并且这一磷酸化修饰是 cyclin 结合所必需的^[20]. 然而有意思的是 Cak1 的功能是细胞生长必需的^[18], 但它并不受细胞周期调控^[21], 在 DNA 损伤胁迫中也不被抑制(本实验室未发表数据). 因此, Cdk1 的 T-loop 结构域中苏氨酸磷酸化修饰在细胞周期进程中是持续的. 另外, 在 Cdk1 激酶 ATP 结合位点附近的酪氨酸则是一个保守的抑制性磷酸化位点, 酿酒酵母中对应的 Tyr19 被 Swe1 激酶磷酸化, 导致 M-CDK 活性被抑制^[22-26]. 与之对应的磷酸酶为 Mih1 和其他未确定的磷酸酶^[27-28]. 在受到 DNA 损伤或复制胁迫时, 裂殖酵母及其他物种 M-Cdk1 的酪氨酸被磷酸化, 抑制其激酶活性, 阻断细胞进入分裂期^[29-33]. 然而, 与裂殖酵母不同的是酿酒酵母 Cdk1 的酪氨酸磷酸化突变后, 在胁迫下细胞仍然能保持细胞周期的停滞^[34-35]. 最新研究表明, 在酿酒酵母中与 Cdk1 的酪氨酸磷酸化抑制并行的还存在一条 Rad53 依赖的 Cdk1 调控通路, 保证细胞受到 DNA 损伤胁迫时抑制 Cdk1 活性, 使受损的染色体 DNA 在被修复好前不进行分离, 从而保证了基因组的稳定性^[36]. 此外, 酿酒酵母 Cdk1 还被鉴定到存在 Lys40 位的赖氨酸乙酰化修饰, 其具体功

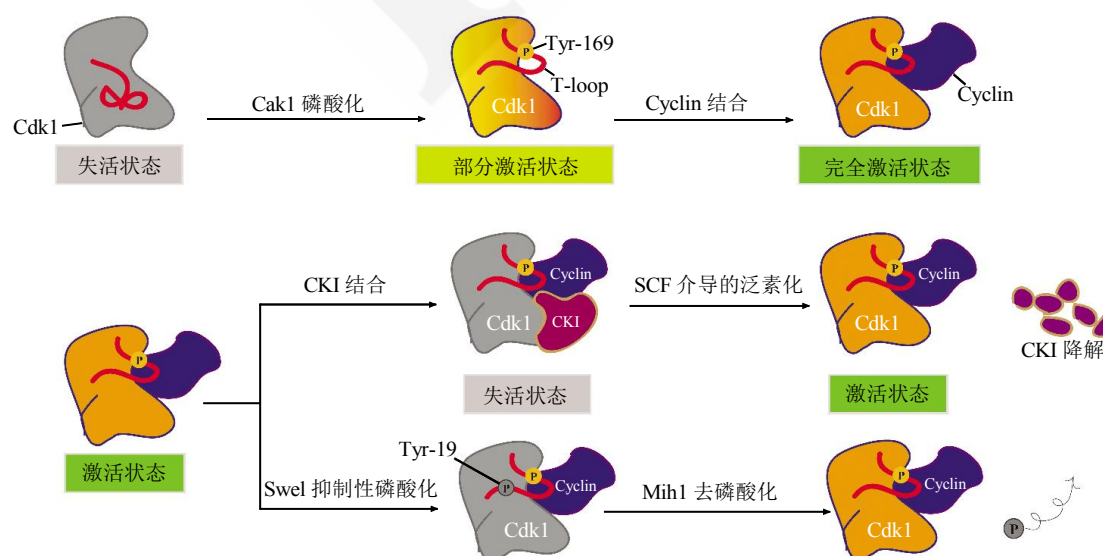


Fig. 1 Activity regulation of cyclin-dependent kinase 1 in budding yeast.

图 1 酿酒酵母 Cdk1 激酶活性主要调控方式

能未知^[37].

Cdk1 第三类主要的活性调控方式则是抑制蛋白 CKI 的负调控. CKI 与 Cdk1 的相互作用, 空间上阻断了底物的结合, 从而抑制 Cdk1 对底物的磷酸化调控. 在人细胞中, CKI 的突变导致细胞不受控制地增殖, 促进癌症的发生发展^[38]. 根据蛋白质结构、同源性及对不同时期 CDK 复合体的亲和力, 可将哺乳类细胞中 CKI 分为两大类家族: INK4 和 CIP/KIP^[39]. 人细胞 INK4 家族成员 p16 (INKa)、p15 (INK4b)、p18 (INK4c) 以及 p19 (INK4d) 仅能与 D 型 cyclin 结合, 特异性抑制 G1-CDK 活性^[40-44]. 而 CIP/KIP 家族成员 p21 (CIP1/WAF1)、p27 (KIP1) 和 p57 (KIP2) 则能广谱性抑制 CDK 活性, 但对 G1-CDK 具有更高的亲和力^[45-48].

2 酿酒酵母 CKI: Far1、Sic1 和 Cip1

目前, 在酿酒酵母中仅有 3 个 Cdk1 抑制蛋白 CKI 被鉴定, 即 Far1、Sic1 以及最近发现的 Cip1 蛋白. FAR1 (factor arrest) 是细胞响应交配信号 α 因子 (α -factor), 阻断细胞周期进程的关键基因^[49]. Far1 通过与 Cln-Cdk1 复合体直接结合, 抑制其活性, 成为 α 因子响应途径的关键步骤^[50]. 在响应来自相反交配型分泌的交配信号过程中, Far1 能阻断单倍体酵母细胞周期, 使之停留在细胞周期限制点 *START* 前, 从而使细胞能与相反交配型酵母结合产生二倍体细胞^[50-51].

Sic1 则是能与 Clb-Cdk1 特异性结合并抑制其活性的 CKI, 在细胞周期 G1/S 过渡中起关键作用^[52]. S 期 cyclin Clb5 和 Clb6 在细胞跨过 *START*, 还处于 G1 期时就开始积累. 此时为了防止 Clb5/6-Cdk1 的过早激活, Sic1 与之形成复合体抑制其活

性. 在 *sic1* 敲除突变体中, 过早的 DNA 复制起始导致基因组的不稳定^[53]. G1 晚期 Cln1/2-Cdk1 活性逐渐积累, 磷酸化 Sic1 的多个位点, 导致 SCF-Cdc4 介导的泛素-蛋白酶降解 Sic1 蛋白, 因此 Clb5/6-Cdk1 被释放激活, S 期起始^[54-56].

由于物种间 cyclin 蛋白缺乏序列一致性, 与之相互作用的 CKI 蛋白也进化出序列多样性. Sic1 与裂殖酵母的同源蛋白 Rum1 仅有 33% 的序列相似性, 与人类同源蛋白 p27^{Kip1} 则为 21% 的相似性. 因此, 很难通过序列同源搜索的方法鉴定新的 CDK 抑制蛋白. 在过去的近 30 年里, 酿酒酵母中仅 Far1 和 Sic1 被鉴定为细胞周期调控 Cdk1 的抑制蛋白. 然而, 在细胞周期的不同时期需要不同的 CKI 蛋白特异性抑制不同的 Cdk1 复合体, 保证细胞周期运转的精密性. 本实验室通过互作蛋白质组学的方法鉴定到酿酒酵母 Cdk1 一系列新的互作蛋白, 其中 Cip1 能特异性地与 Cln2-Cdk1 结合, 抑制其活性, 参与细胞周期调控^[6]. 最近, 本实验室与另一实验室又分别独立报道了 Cip1 能参与包括复制胁迫和高渗胁迫在内的多种胁迫应答反应^[7-8], 其主要调控通路总结如图 2.

Cip1 是最近被鉴定的酿酒酵母 Cln-Cdk1 抑制蛋白^[6]. 研究表明, Cip1 受细胞周期调控. 首先, *CIP1* mRNA 表达受 Mcm1 调控, 呈现 G1 期表达高峰. 在 M/G1 过渡时期, Mcm1 直接结合 *CIP1* 启动子区域 ECB 元件, 调控其转录^[8]. 蛋白水平, Cip1 在 G1/S 过渡中开始积累, 也表现出细胞周期性调控. 除了表达水平的周期性调控, Cip1 蛋白还呈现明显周期性磷酸化修饰. 细胞进入 S 期后, Cip1 能被 Clb-Cdk1 磷酸化, 然而其磷酸化调控的具体功能还有待阐明^[6]. Cip1 蛋白在体内及体外均

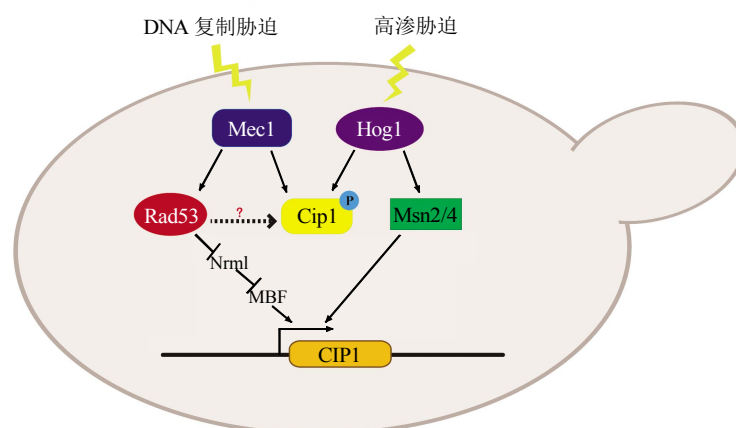


Fig. 2 Cip1 regulation by stresses.

图 2 Cip1 受胁迫应答调控的机制

能特异性结合并抑制 Cln1、Cln2、Cln3 与 Cdk1 分别形成的 G1-Cdk1 活性^[6]。虽然 Cip1 和其他 CKI 一样很难通过序列相似性寻找物种间的同源蛋白, 但是通过保守结构域分析发现 Cip1 与人类 CKI 蛋白 p21(CIP1/WAF1)存在高同源的 CDK 结合结构域。这从结构上暗示, 酿酒酵母 Cip1 很有可能是人 p21 蛋白进化的前端。

3 CKI 在胁迫应答中的作用

细胞周期运转过程中, 时刻都有可能受到来自细胞内部和环境因素产生的损伤或胁迫。这些损伤或胁迫包括 DNA 复制压力、DNA 损伤、高渗胁迫、氧化应激等等。环境产生的遗传毒性的损伤主要包括电离辐射造成的 DNA 双链断裂、UV 照射造成的嘧啶二聚体和烷基化试剂造成的碱基修饰等。这些损伤如果不能及时被修复, 就会造成基因组的不稳定, 增加基因突变频率, 这是导致恶性肿瘤的一个关键因素^[57-58]。目前关于应对外界环境因子引起 DNA 损伤应答的研究在模式酵母中较为深入。为了维持基因组的稳定性, 保证遗传信息精确地复制和传递, 真核细胞在进化中形成了一套保守而有效的应答机制。在持续受到 DNA 损伤因素刺激或 DNA 复制压力时, 细胞激活 S 期检验点通路(S-phase checkpoint), 启动 DNA 损伤或复制压力应答机制, 停止细胞周期进程并启动修复机制以防止受损的 DNA 传递给子细胞。

在真核生物中, 这一应答反应是高度保守的。从单细胞酿酒酵母到高等哺乳类生物, DNA 损伤应答机制均由保守的 ATM/ATR - Chk1/Chk2 信号通路调控。在酿酒酵母中, Mec1/Tel1 是 ATM/ATR 的同源蛋白^[59], 构成 S 期检验点信号转导的中心。Mec1/Tel1 激活下游效应蛋白 Rad53(Chk2)/Chk1^[60], 调节一系列生物学事件应对并修复损伤。Rad53 调节的 S 期检验点应答包括稳定复制叉、抑制未启动的复制元(late origin firing)、防止细胞过早进行分裂、以及控制一系列修复等相关基因的转录^[61-67]。裂殖酵母等一些物种中, 在 DNA 损伤应激下, Wee1 激酶介导的分裂期 CDK 抑制性磷酸化是阻断细胞分裂的关键。然而, 在酿酒酵母中, 这一调控机制的缺失却不足以导致细胞在应激下过早地进入分裂期, 这暗示着还存在其他调控途径。从进化角度来说, 高等哺乳类细胞很可能也是采取这样的多途径方式保证基因组的稳定。目前, 这样的并行机制还不清楚。最近的研究表明, Rad53 下游

未知的 CDK 调控因子可能与 Swe1 基因(Wee1 同源基因)共同调控 M-CDK 的活性。而 Cdk1 未知的抑制蛋白或负调控因子可能是这个未知因子的最佳选择^[36]。

最近的研究中, 我们课题组及 Tseng 课题组发现 Cip1 在包括 DNA 损伤/DNA 复制压力、高渗胁迫、氧化应激等多种胁迫下被快速诱导表达^[7-8]。我们近期的研究表明在羟基脲(hydroxyurea, HU)引起的 DNA 复制压力下, Cip1 受到 S 期检验点蛋白 Mec1 和 Rad53 的多方面调控。首先, Rad53 磷酸化 MBF 的抑制蛋白 Nrm1, 从而使 Nrm1 与转录激活体 MBF 解离, MBF 调控的一系列基因激活表达, *CIP1* 便是其中的一个基因。此外, Cip1 在翻译后还受到 Mec1 的磷酸化。这些结果都暗示, Cip1 作为 Cdk1 抑制蛋白, 在 DNA 损伤应答中起到重要作用。然而, Cip1 特异性抑制 G1-CDK 活性, 不太可能与 Swe1 并行调控 M-CDK 活性, 抑制细胞的有丝分裂。因此, Cip1 在 DNA 损伤应答中的具体功能还有待进一步确定, 并且 Cdk1 未知的抑制蛋白或负调控因子的筛选鉴定仍然是一个重要课题。

除了上述能产生基因毒性的胁迫因子外, 包括高渗胁迫及氧化应激在内的环境胁迫也是机体需要快速响应的一个重要方面。研究相对清楚的是 MAPK 调控的高渗胁迫应答, 这一途径在真核生物中也是高度保守的。在酿酒酵母中, 当细胞暴露在高渗透压的条件时, Hog1 被激活, 激活了的 Hog1 可以通过它的双效功能将细胞阻断在 G1 期^[68-69]。一方面, Hog1 抑制 cyclin 基因 *CLN1* 和 *CLN2* 的转录; 另一方面, Hog1 直接与 Cdk1 抑制蛋白 Sic1 相互作用, 并且磷酸化其 C 端的 Thr173 残基, 这样的磷酸化, 可以干扰 Sic1 和泛素连接酶 SCFCdc4 之间的识别, 从而保持 Sic1 的稳定, 抑制 Clb-CDK 活性。

除了 Sic1 的抑制功能外, 新发现的抑制蛋白 Cip1 在应对环境胁迫中起重要作用^[8]。与 Sic1 不同的是 Cip1 基因的表达受到包括高渗胁迫在内的多种胁迫的快速诱导。研究表明 Cip1 可能与 Sic1 协同抑制细胞周期的进程, 从而应对高渗胁迫的影响。一方面, 胁迫响应的转录因子 Msn2/4 受 Hog1 的调控, 从而诱导 *Cip1* 基因的表达。另一方面, Hog1 直接磷酸化 Cip1 的 Thr65、Thr69、Thr73 3 个氨基酸残基, 促进 Cip1 与 G1-Cdk1 复合体的相互作用, 抑制其活性。

细胞时刻都面对错综复杂的环境变化, 如何保证机体免受损伤是细胞应答的一个重要任务. 细胞周期的阻滞是为细胞赢得反应和修复时间的策略之一. 目前, 已知的细胞周期 Cdk1 抑制蛋白如 Sic1、Cip1 均参与多种胁迫应答, 抑制细胞周期的进程. 然而, 应对胁迫的细胞周期调控机制仍有许多问题还不清楚, 寻找更多 Cdk1 周期特异性抑制蛋白是一个重要思路.

4 展 望

在高等动物中, 癌症的发生发展往往都伴随着 CDK 活性的失调. 细胞周期不同阶段的 cyclin-Cdk 活性都受到严格的控制. 人细胞中 G1 cyclin E 或 cyclin D 的过量表达造成染色体异倍性(an euploidy)的增加、基因扩增(gene amplification)等基因组不稳定现象^[70-71]. 在酿酒酵母中, G1 cyclin 表达的失调同样造成基因组的不稳定^[72]. 此外, 环境营养的缺失、高渗胁迫和氧化应激产生的 DNA 损伤均会阻断细胞周期进程, 使细胞停留在 G1 期^[73-77]. 因此, 细胞周期 G1-CDK 同样需要严格调控来保证基因组的稳定性. Cip1 是 Cdk1 一个新的抑制蛋白, 特异性结合 G1-Cdk1 复合体, 并抑制其活性. 已有研究表明 Cip1 参与 DNA 损伤胁迫、高渗胁迫等反应应答, 但 Cip1 的调控机制还有待进一步深入研究. 例如, Cip1 是如何被降解的? 胁迫应激下 Cip1 磷酸化的具体功能是什么? Cip1 与 Sic1 是如何协同调控细胞周期及维持基因组稳定的?

参 考 文 献

- [1] Hartwell L, Culotti J, Reid B. Genetic control of the cell-division cycle in yeast. I. Detection of mutants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1970, **66**(2): 352-359
- [2] Nurse P, Thuriaux P, Nasmyth K. Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet*, 1976, **146**(2): 167-178
- [3] Evans T, Rosenthal E, Youngblom J, *et al.* Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*, 1983, **33**(2): 389-396
- [4] Haase S, Reed S. Evidence that a free-running oscillator drives G1 events in the budding yeast cell cycle. *Nature*, 1999, **401**(6751): 394-397
- [5] Santamaría D, Barrière C, Cerqueira A, *et al.* Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature*, 2007, **448**(7155): 811-815
- [6] Ren P, Malik A, Zeng F. Identification of YPL014W (Cip1) as a novel negative regulator of cyclin-dependent kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells*, 2016, **21**(6): 543-552
- [7] Zhang Z, Ren P, Vashisht A A, *et al.* Cdk1-interacting protein Cip1 is regulated by the S phase checkpoint in response to genotoxic stress. *Genes Cells*, 2017, **22**(10): 850-860
- [8] Chang Y L, Tseng S F, Huang Y C, *et al.* Yeast Cip1 is activated by environmental stress to inhibit Cdk1-G1 cyclins *via* Mcm1 and Msn2/4. *Nat Commun*, 2017, **8**(1): 56
- [9] Lanker S, Valdivieso M H, Wittenberg C. Rapid degradation of the G1 cyclin Cln2 induced by CDK-dependent phosphorylation. *Science*, 1996, **271**(5255): 1597-1601
- [10] Verma R, Feldman R, Deshaies R. SIC1 is ubiquitinated *in vitro* by a pathway that requires CDC4, CDC34, and cyclin/CDK activities. *Mol Biol Cell*, 1997, **8**(8): 1427-1437
- [11] Schneider B L, Patton E E, Lanker S, *et al.* Yeast G1 cyclins are unstable in G1 phase. *Nature*, 1998, **395**(6697): 86-89
- [12] Landry B D, Doyle J P, Toczyski D P, *et al.* F-box protein specificity for g1 cyclins is dictated by subcellular localization. *Plos Genet*, 2012, **8**(7): e1002851
- [13] Li W J, Wang Y M, Zheng X D, *et al.* The F-box protein Grr1 regulates the stability of Ccn1, Cln3 and Hof1 and cell morphogenesis in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*, 2006, **62**(1): 212-226
- [14] Jackson P K. Climbing the greatwall to mitosis. *Mol Cell*, 2006, **22**(2): 156-157
- [15] Koivomagi M, Ord M, Iofik A, *et al.* Multisite phosphorylation networks as signal processors for Cdk1. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, **20**(12): 1415-1424
- [16] Mcgrath D A, Balog E R, Koivomagi M, *et al.* Cks confers specificity to phosphorylation-dependent CDK signaling pathways. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, **20**(12): 1407-1414
- [17] Tang Y, Reed S I. The Cdk-associated protein Cks1 functions both in G1 and G2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, 1993, **7**(5): 822-832
- [18] Kaldis P, Sutton A, Solomon M J. The cdk-activating kinase (CAK) from budding yeast. *Cell*, 1996, **86**(4): 553-564
- [19] Solomon M J, Lee T, Kirschner M W. Role of phosphorylation in p34cdc2 activation: identification of an activating kinase. *Mol Biol Cell*, 1992, **3**(1): 13-27
- [20] Ross K E, Kaldis P, Solomon M J. Activating phosphorylation of the *Saccharomyces cerevisiae* cyclin-dependent kinase, cdc28p, precedes cyclin binding. *Mol Biol Cell*, 2000, **11**(5): 1597-1609
- [21] Kaldis P, Pitluk Z W, Bany I A, *et al.* Localization and regulation of the cdk-activating kinase (Cak1p) from budding yeast. *J Cell Sci*, 1998, **111**(24): 3585-3596
- [22] Baberfurnari B A, Rhind N, Boddy M N, *et al.* Regulation of mitotic inhibitor Mik1 helps to enforce the DNA damage checkpoint. *Mol Biol Cell*, 2000, **11**(1): 1-11
- [23] Enoch T, Nurse, Paul. Mutation of fission yeast cell cycle control genes abolishes dependence of mitosis on DNA replication. *Cell*, 1990, **60**(4): 665-673
- [24] Rhind N, Furnari B, Russell P. Cdc2 tyrosine phosphorylation is required for the DNA damage checkpoint in fission yeast. *Genes Dev*, 1997, **11**(4): 504-511
- [25] Gould K L, Nurse P. Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2+ protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature*, 1989,

- 342(6245): 39–45
- [26] McGowan C H, Russell P. Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15. *EMBO J*, 1993, **12**(1): 75–85
- [27] Russell P, Moreno S, Reed, *et al.* Conservation of mitotic controls in fission and budding yeasts. *Cell*, 1989, **57**(2): 295–303
- [28] Kennedy E K, Dysart M, Lianga N, *et al.* Redundant regulation of Cdk1 tyrosine dephosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 2016, **202**(3): 903–910
- [29] Draetta G, Piwnicaworms H, Morrison D, *et al.* Human cdc2 protein kinase is a major cell-cycle regulated tyrosine kinase substrate. *Nature*, 1988, **336**(6201): 738–744
- [30] Dunphy W G, Newport J W. Fission yeast p13 blocks mitotic activation and tyrosine dephosphorylation of the *Xenopus* cdc2 protein kinase. *Cell*, 1989, **58**(1): 181–191
- [31] Gautier J, Matsukawa T, Nurse P, *et al.* Dephosphorylation and activation of *Xenopus* p34cdc2 protein kinase during the cell cycle. *Nature*, 1989, **339**(6226): 626–629
- [32] Morla A O, Draetta G, Beach D, *et al.* Reversible tyrosine phosphorylation of cdc2: dephosphorylation accompanies activation during entry into mitosis. *Cell*, 1989, **58**(1): 193–203
- [33] Solomon M J, Glotzer M, Lee T H, *et al.* Cyclin activation of p34cdc2. *Cell*, 1990, **63**(5): 1013–1024
- [34] Amon A, Surana U, Muroff I, *et al.* Regulation of p 34 CDC28 tyrosine phosphorylation is not required for entry into mitosis in *S. cerevisiae*. *Nature*, 1992, **355**(6358): 368–371
- [35] Sorger P K, Murray A W. S-phase feedback control in budding yeast independent of tyrosine phosphorylation of p34 cdc28. *Nature*, 1992, **355**(6358): 365–368
- [36] Palou G, Palou R, Zeng F, *et al.* Three different pathways prevent chromosome segregation in the presence of DNA damage or replication stress in budding yeast. *Plos Genet*, 2015, **11** (9): e1005468
- [37] Choudhary C, Kumar C, Gnäd F, *et al.* Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*, 2009, **325**(5942): 834–840
- [38] Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*, 2009, **9**(3): 153–166
- [39] Cheng M, Olivier P, Diehl J, *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**(6): 1571–1583
- [40] Guan K L, Jenkins C W, Li Y, *et al.* Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev*, 1994, **8**(24): 2939–2952
- [41] Hannon G J, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature*, 1994, **371**(6494): 257–261
- [42] Hirai H, Roussel M F, Kato J Y, *et al.* Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Biol Cell*, 1995, **15**(5): 2672–2681
- [43] Serrano M, Hannon G J, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, 1993, **366**(6456): 704–707
- [44] Sherr C J, Roberts J M. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*, 1995, **9**(10): 1149–1163
- [45] Harper J W, Adami G R, Wei N, *et al.* The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, 1993, **75**(4): 805–816
- [46] Lee M H, Reynisdóttir I, Massagué J. Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev*, 1995, **9**(6): 639–649
- [47] Polyak K, Kato J, Solomon M, *et al.* p27^{Kip1}, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev*, 1994, **8**(1): 9–22
- [48] Xiong Y, Hannon G J, Zhang H, *et al.* p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*, 1993, **366**(6456): 701–704
- [49] Chang F, Herskowitz I. Identification of a gene necessary for cell cycle arrest by a negative growth factor of yeast: FAR1 is an inhibitor of a G1 cyclin, CLN2. *Cell*, 1990, **63**(5): 999–1011
- [50] Peter M, Herskowitz I. Direct inhibition of the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28-Cl_N by Far1. *Science*, 1994, **265**(5176): 1228–1231
- [51] Tyers M, Futcher B. Far1 and Fus3 link the mating pheromone signal transduction pathway to three G1-phase Cdc28 kinase complexes. *Mol Biol Cell*, 1993, **13**(9): 5659–5669
- [52] Mendenhall M D. An inhibitor of p34CDC28 protein kinase activity from *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 1993, **259**(5092): 216–219
- [53] Lengronne A, Schwob E. The yeast CDK inhibitor Sic1 prevents genomic instability by promoting replication origin licensing in late G1. *Mol Cell*, 2002, **9**(5): 1067–1078
- [54] 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**(6863): 514–521
- [55] Skowyra D, Craig K L, Tyers M, *et al.* F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell*, 1997, **91**(2): 209–219
- [56] Verma R, Annan R S, Huddleston M J, *et al.* Phosphorylation of Sic1p by G1 Cdk required for its degradation and entry into S phase. *Science*, 1997, **278**(5337): 455–460
- [57] Hartwell L H, Kastan M B. Cell cycle control and cancer. *Science*, 1994, **266**(5192): 1821–1828
- [58] Kolodner R D, Putnam C D, Myung K. Maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 2002, **297** (5581): 552–557
- [59] 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): 357–360
- [60] Melo J, Toczyski D. A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Curr Opin Cell Biol*, 2002, **14**(2): 237–245
- [61] Santocanele C, Diffley J F. A Mec1- and Rad53-dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication. *Nature*, 1998, **395**(6702): 615–618
- [62] Tercero J A, Diffley J F X. Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature*, 2001, **412**(6846): 553–557
- [63] Cohen-Fix O, Koshland D. The anaphase inhibitor of *Saccharomyces cerevisiae* Pds1p is a target of the DNA damage

- checkpoint pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (26): 14361–14366
- [64] Bastos De Oliveira F M, Harris M R, Brazauskas P, *et al.* Linking DNA replication checkpoint to MBF cell-cycle transcription reveals a distinct class of G1/S genes. *EMBO J*, 2012, **31**(7): 1798–1810
- [65] Jaehnig E J, Kuo D, Hombauer H, *et al.* Checkpoint kinases regulate a global network of transcription factors in response to DNA damage. *Cell Rep*, 2013, **4**(1): 174–188
- [66] Travesa A, Kuo D, De Bruin R A M, *et al.* DNA replication stress differentially regulates G1/S genes *via* Rad53-dependent inactivation of Nrm1. *EMBO J*, 2012, **31**(7): 1811–1822
- [67] Zhou Z, Elledge S J. DUN1 encodes a protein kinase that controls the DNA damage response in yeast. *Cell*, 1993, **75**(6): 1119–1127
- [68] Escoté X, Zapater M, Clotet J, *et al.* Hog1 mediates cell-cycle arrest in G1 phase by the dual targeting of Sic1. *Nat Cell Biol*, 2004, **6**(10): 997–1002
- [69] Zapater M, Clotet J, Escoté X, *et al.* Control of cell cycle progression by the stress-activated Hog1 MAPK. *Cell Cycle*, 2005, **4**(1): 6–7
- [70] Hamada K, Takuwa N, Wei Z, *et al.* Protein kinase C inhibits the CAK-CDK2 cyclin-dependent kinase cascade and G1/S cell cycle progression in human diploid fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1310**(1): 149–156
- [71] Spruck C H, Won K A, Reed S I. Deregulated cyclin E induces chromosome instability. *Nature*, 1999, **401**(6750): 297–300
- [72] Tanaka S, Diffley J F. Interdependent nuclear accumulation of budding yeast Cdt1 and Mcm2-7 during G1 phase. *Nat Cell Biol*, 2002, **4**(3): 198–207
- [73] Newcomb L L, Diderich J A, Slattery M G, *et al.* Glucose regulation of *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle genes. *Eukaryot Cell*, 2003, **2**(1): 143–149
- [74] Braun E L, Fuge E K, Padilla P A, *et al.* A stationary-phase gene in *Saccharomyces cerevisiae* is a member of a novel, highly conserved gene family. *J Bacteriol*, 1996, **178**(23): 6865–6872
- [75] Belli G, Garj E, Aldea M, *et al.* Osmotic stress causes a G1 cell cycle delay and downregulation of Cln3/Cdc28 activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, 2001, **39**(4): 1022–1035
- [76] Nadal E D, Ammerer G, Posas F. Controlling gene expression in response to stress. *Nat Rev Genet*, 2011, **12**(12): 833–845
- [77] Shackelford R E, Kaufmann W K, Paules R S. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic Biol Med*, 2000, **28**(9): 1387–1404

The Progress of Cell Cycle Cdk1 Inhibitors in Budding Yeast*

LIU Xue-Qin^{1)**}, REN Ping^{2)**}, ZHANG Ze¹⁾, ZENG Fan-Li^{1)***}

⁽¹⁾ College of Life Sciences, Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 071001, China;

⁽²⁾ Shanghai Institute for Advanced Immunochemical Studies, Shanghai Tech University, Shanghai 201210, China)

Abstract Cyclin-dependent kinase Cdk1 is the master regulator on eukaryotic cell cycle control and crucial for prevention of genomic instability. Given its essential function in cell cycle progression, Cdk1 is tightly regulated. Among others, CDK inhibitors (CKIs) are important negative factors for CDK activity regulation, lack of which leads to uncontrolled cell division and promotes tumorigenesis. The model eukaryotic organism *Saccharomyces cerevisiae*, budding yeast, in many respects is an ideal organism for eukaryotic CDK regulation research. In budding yeast three Cdk1 inhibitors are known: Far1, Sic1 and recently identified Cip1. Apart from inhibiting Cdk1 activity during cell cycle progression, CKIs also play crucial roles to maintain genomic stability in response to environmental stresses. This paper reviewed the researches on Cdk1 inhibitors, especially their functions on cell cycle progression and stress responses, to provide a model basis for cell cycle and cancer fundamental research.

Key words budding yeast, cell cycle, Cdk1, CKI, Cip1

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0432

* This work was supported by a starting grant from Hebei Agricultural University(ZD201622).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-312-7528593, E-mail: fanli.zeng@pku.edu.cn

Received: November 28, 2017 Accepted: February 7, 2018