

检验点激酶 1 的研究进展

李昌军 刘凯于 杨东叶 余泽华 彭建新* 陈文 谢飞

(华中师范大学昆虫学研究所, 武汉 430079)

摘要 检验点激酶 1 (checkpoint kinase 1, Chk1) 为一种进化保守的蛋白激酶, 是细胞检验点的转导因子。当电离辐射、紫外线等引起细胞 DNA 损伤或者 DNA 复制叉停滞时 Chk1 活化, 诱导细胞产生细胞周期阻滞、DNA 修复或细胞凋亡等特征。现对 Chk1 的结构、功能以及病毒通过 Chk1 调控宿主细胞周期等方面进行简述。

关键词 检验点激酶 1; ATR; DNA 损伤检验点; 促成因子; DNA 损伤信号 / 修复蛋白

在真核细胞中, 除了基因组复制的过程中会产生 DNA 损伤以外, 内源(如代谢产物)或外源遗传毒性物质(如紫外线、电离辐射等)也会损伤细胞 DNA。如果这些 DNA 损伤不能被修复, 将严重威胁细胞遗传信息的精确传递。真核细胞在长期的进化过程中发展一套能够检测 DNA 损伤、维护细胞遗传稳定性和完整性的机制, 这个机制被称为 DNA 损伤检验点(DNA damage checkpoint)^[1]。细胞 DNA 损伤检验点的信号转导途径由三部分组成: 感受器(sensors, 如 ATM、ATR 等)、信号转导蛋白[transducers, 如检验点激酶 1 (checkpoint kinase 1, Chk1)、Chk2 等]、效应器(effectors, 如 Cdc25C、Cdc25A 等)^[2]。感受器检测 DNA 损伤或其他不正常的 DNA 结构, 启动细胞 DNA 损伤反应的信号, 信号转导蛋白将此信号放大并传递给效应器, 效应器随后执行一系列的功能, 引起细胞的多种反应, 如: 细胞周期阻滞、受损 DNA 的修复或细胞凋亡等。细胞检验点在进化上高度保守, 广泛存在于各种真核生物中^[3]。目前研究较多的细胞 DNA 检验点感受器分子为 ATM (ataxia telangiectasia mutated) 和 ATR (ATM and Rad3-related), 一般认为, ATR、ATM 通过直接磷酸化分别活化效应器 Chk1、Chk2, 遗传毒性胁迫(如电离辐射)产生双链断裂的 DNA 损伤主要激活 ATM-Chk2 信号通路, 而遗传毒性胁迫(如紫外线、电离辐射等)产生单链断裂的 DNA 损伤、复制叉的停滞等主要激活 ATR-Chk1 信号通路^[4]。最近发现 ATM、ATR 的信号转导路径部分重叠, 电离辐射损伤 DNA 时, ATM 也能活化 Chk1。研究还发现当病毒感染细胞时, 病毒增强宿主 Chk1

的活性, 活化细胞检验点, 将细胞阻滞在 G₂ 期; Chk1 不仅执行 DNA 损伤检验点功能, 还是脊椎动物胚胎发育的必需因子^[5]。

1 Chk1 的结构

Chk1 激酶首先在裂殖酵母中发现并被鉴别出来, 以后在哺乳动物、昆虫、芽殖酵母等真核生物细胞中陆续发现 Chk1 的同源物。迄今为止, 所发现的真核生物的 Chk1 在结构和功能上都很保守。Chk1 一般由 4 个结构域——N 端保守的激酶活性结构域(kinase domain, KD, 约 270 个氨基酸残基), 中间连接区(约 50 个氨基酸残基), 含有许多保守 Ser-Glu(SQ)或 Thr-Glu(TQ)的结构域, 以及功能不明确、保守性较差的 C 端结构域构成^[5,6]。人类的 Chk1 是由 476 个氨基酸组成的核蛋白, 它的激酶活性结构域包括两个亚结构域(88 个氨基酸残基的 N 端结构域和 210 个氨基酸残基的 C 端结构域), N 端结构域主要由 β 折叠构成, C 端大部分为 α 螺旋结构, 活性位点位于这两个亚结构域的连接区上^[7]。非洲爪蟾的 Chk1 C 端存在与典型核定位序列不同的双分型核定位序列(bipartite NLS), 它的两簇碱性氨基酸残基被 80 个氨基酸残基序列隔开, 研究表明这段氨基酸序列与 NLS 共同指导 Chk1 的定位^[5]。

2 Chk1 活性的调节

影响 Chk1 活性的因素有很多。人们发现不仅

收稿日期: 2005-08-15 接受日期: 2005-11-21

* 通讯作者。Tel: 027-67862431, Fax: 027-67861497, E-mail:

jianxinpeng@21cn.com

DNA 的损伤能活化 Chk1, 有些病毒的感染也能活化 Chk1, 此外, Chk1 还能调节自身的活性。

2.1 Chk1 活性的自身调节

研究 Chk1 及其与 AMP-PNP (ATP 类似物)形成的复合物, 发现这两种情况下 Chk1 的 KD 几乎没有差别, KD 的 ATP 结合位点、催化活性序列及活化环(activation loop)整齐有序, 且它们的 KD 结构与活化的激酶结构相似, 这些结果提示了 Chk1 的活性不需要 KD 的磷酸化, 进一步实验发现保留 KD 的截短型 Chk1 比重组完整的 Chk1 的激酶活性高 20 倍以上^[8]; 以后的研究也发现小鼠 Chk1 的 C 端中部能与 KD 相互作用; 非洲爪蟾的 Chk1 C 端存在活性自我抑制区(AIR), 体内实验保留 AIR 的截短型 Chk1 能与保留 KD 的截短型 Chk1 (不是完整的 Chk1)相互作用, 抑制 KD 的活性^[5], 因此 Chk1 的 C 端可能对 Chk1 的活性起负调节作用。

目前认为 ATR/ATM 磷酸化 SQ/TQ 结构域内的位点是 Chk1 在 DNA 复制/损伤检验点活化的必需条件(如人类 Chk1 活化表现为 Ser317、Ser345 等位点的磷酸化^[9]), 有研究发现 SQ/TQ 的磷酸化可能与解除 Chk1 的 C 端对 KD 活性的抑制有关: 非洲爪蟾 Chk1 SQ/TQ 的模拟磷酸化, SQ/TQ 内 Ser344 (人类 Chk1 对应的位点为 Ser345)的模拟磷酸化, 都能阻止 AIR-GST 与 KD-Myc 的相互作用, 但是后者(AIR-GST, Ser344 磷酸化)不如前者(AIR-GST, SQ/TQ 模拟磷酸化)强烈。研究还证实完整的 Chk1 上述 SQ/TQ 相应位点的模拟磷酸化只能微弱增强 Chk1 的活性^[5], 相反 HeLa 细胞截去 Chk1 的激酶结构域能引起 Ser345 的磷酸化, 这些研究结果表明 Chk1 的活化不仅仅由 SQ/TQ 的磷酸化引起, Chk1 活化还需要其他因子的共同作用^[5,6]。

2.2 病毒感染对 Chk1 活性的影响

病毒的增殖必须依赖宿主进行核酸的复制。在此过程中, 病毒常常调控宿主的细胞周期, 其中的一种调控方式便是活化 Chk1 将细胞阻滞在特定的时期^[10,11]。研究发现呼肠孤病毒(reovirus)、人类免疫缺陷性病毒(human immunodeficiency virus, HIV)及猴免疫缺陷性病毒(simian immunodeficiency virus)编码蛋白活化 G₂ 期检验点^[12], 上述病毒的感染均使 Chk1 磷酸化从而增强 Chk1 的激酶活性; 同时使 CycinB1/Cdc2 的活性因为 Cdc2 的超磷酸化而被抑制^[13~16]。

HIV-1 诱导宿主细胞周期阻滞在 G₂ 期与病毒编码的 Vpr 蛋白有关, 慢性病毒属载体 Phr-Vpr 转染

多种细胞系证实了这个结论^[17]。ATM、ATR 的抑制剂咖啡因, Chk1 的抑制剂 UCN-01, 缺失 ATR 或 siRNA 降低 Chk1 的表达量均能解除或部分解除细胞 G₂ 期阻滞^[16], 这些研究结果表明 Vpr 可能通过 ATR-Chk1 途径影响细胞周期。Vpr 影响 Chk1 的机制还不清楚, 可能是 Vpr 引起 DNA 的损伤, Vpr 和其他蛋白质一起作用影响复制叉的移动或者 Vpr 影响 DNA 损伤反应的感受器^[14], 也可能是反转录病毒整合到宿主上引起 ATR 的活化^[18]。体外试验发现 Vpr 能与 Cdc25C 结合而抑制 Cdc25C 去磷酸化活性^[17], 这与前面报道的 Vpr 可能通过 ATR-Chk1 途径活化 Chk1 从而抑制 Cdc25C 活性相矛盾, Vpr 活化 Chk1 的机制还有待进一步研究。

II 型腺相关病毒(adeno-associated virus 2, AAV2)感染细胞后也将宿主细胞阻滞在 G₂ 期。研究发现此现象只与病毒的 DNA 结构有关, 推测病毒基因组的发夹结构与单链 DNA 一起诱导产生了 DNA 损伤信号^[18]。人细小病毒 B19 与 AAV2 的 DNA 结构相似, 过去曾认为该病毒编码的 NS1 蛋白诱导了细胞 G₂ 期阻滞, 最新发现该现象也只与 DNA 结构有关^[19]。虽然上述的病毒还未见有关 Chk1 的报道, 但人细小病毒将细胞阻滞在 G₂ 期的现象能被 ATM、ATR 的抑制剂咖啡因解除^[18,19], 因此上述病毒感染也可能增强 Chk1 的活性。

3 Chk1 的功能

3.1 Chk1 与 DNA 的复制

当 S 期的细胞 DNA 复制受到胁迫或 DNA 受到损伤将引起细胞检验点反应, 这些反应包括使细胞 DNA 复制停滞、阻止复制叉不可逆的崩溃、启动 DNA 修复和延迟进入有丝分裂等。Aphidicolin (S 期检验点激活剂)在离体条件下能诱导非洲爪蟾的 Chk1 磷酸化, 在体内能使缺失 Chk1 基因的非洲爪蟾细胞提前进入有丝分裂期(和诱导正常细胞相比), 缺失 Chk1 基因的哺乳动物细胞在 S 期对 DNA 复制的抑制不敏感, 这些试验结果表明 Chk1 的活性为 S 期检验点所必须^[3]。

3.2 Chk1 与 MPF 的活化

Chk1 通过磷酸化 Cdc25 调节促成熟因子(MPF)的活性。MPF (cyclinB/Cdc2)是控制有丝分裂的关键因子, 它通过改变自身的核质定位和对 Cdc2 的磷酸化调控有丝分裂。在 G₂ 期, cyclinB 从细胞核主动转运到细胞质, 在细胞质中 cyclinB 与 Cdc2 构成 MPF 复合物, 此时 MPF 的活性由于 Wee1/Myt 磷

酸化 Cdc2 的 Thr14 和 Thr15 而被抑制。M 期起始时, Cdc25 被活化(如 plk1 激活 Cdc25C), 活化的 Cdc25 使 Cdc2 的 Thr14 和 Thr15 去磷酸化激活 MPF, 活化的 MPF 最早出现在中心体上。当 MPF 受到某种调节时(有人认为 plk1 磷酸化 cyclinB), 活化的 MPF 在 M 期前期末快速从细胞质转移到核内, 在核内磷酸化下游蛋白质, 完成 G₂ 到 M 期的信号转导^[13,20,21]。有趣的是, Cdc25C 和 plk1 活化 MPF, 而活化的 MPF 能进一步增强 Cdc25C 和 plk1 的活性, MPF 与 Cdc25C、plk1 构成一个正反馈回路, 因此维持 MPF 及它的正调控因子的无活性状态是阻止细胞进入 M 期的关键^[13]。Chk1 通过抑制 MPF 的活化来介导 G₂/M 期检验点。Chk1 调控 MPF 的机制是 Chk1 通过磷酸化 Cdc25 的多个位点来抑制 Cdc25 的活性。哺乳动物细胞的 Cdc25 有 3 种类型: Cdc25A、Cdc25B 和 Cdc25C。Chk1 磷酸化 Cdc25A 使其通过泛素化途径快速降解; Chk1 磷酸化 Cdc25C Ser216 位点, 14-3-3 蛋白在此位点与 Cdc25C 结合从而抑制 Cdc25C 的活性, 同时 Chk1 还调节 Cdc25C 上游激酶的活性。

除了在 G₂/M 期检验点抑制 MPF 的活性外, 正常细胞中的 Chk1 还可能通过中心体上的定位来调节 MPF 的活性。研究发现许多真核细胞(包括二倍体成纤维细胞)的中心体上在有丝分裂间期定位有 Chk1, 免疫染色显示, 细胞通过分裂前期末以后, 伴随中心体的分离, Chk1 明显地从中心体上消失, 这种现象一直持续到 M 期结束。细胞内与此现象在空间、时间相关的事件有 MPF 在分裂间期的中心体上聚集, 活化的 MPF 最早出现在分裂前期末的中心体上, 因此中心体上的 Chk1 可能抑制 MPF 的活性。UCN-01 或 CEP3891 (Chk1 的抑制剂)抑制 Chk1 的活性导致中心体的提前分离, 与中心体相关的 MPF 提前活化, 将突变后无活性的 Chk1 永久地定位在中心体上可使 MPF 提前活化, 而当正常的 Chk1 永久定位在中心体上时, 细胞出现多倍体、多个中心体的 MPF 活性缺陷型的表型, 这些结果证实了前面中心体上的 Chk1 抑制 MPF 活性的推论。研究还发现有丝分裂前期末中心体上 Cdc2 的活化可能与细胞质中的 Cdc25B 有关, 因此, 正常细胞中定位在中心体上的 Chk1 在保护中心体上的 MPF 不被细胞质中的 Cdc25B 提前活化、保证有丝分裂起始事件的时序性方面起着重要的作用^[20]。

3.3 Chk1 与 Pds1 的降解

最新研究发现 X 射线损伤果蝇成神经细胞 DNA

后, 纺锤体检验点蛋白 BubR1 与 DNA 损伤检验点蛋白 Grp/Chk1 (Grp 为 Chk1 的同源物)共同作用, 阻止细胞进入分裂后期^[22], 该研究表明在果蝇成神经细胞中 Chk1 介导 M 期中-后期检验点。在芽殖酵母中 DNA 的损伤也能通过活化 Chk1 来激活 M 期中-后期检验点。活化的 Chk1 磷酸化分裂后期抑制蛋白 Pds1, 阻止 Pds1 被后期促进因子(APC)识别后降解, Pds1 在细胞内的积累使细胞周期停滞在分裂中期^[31]。

3.4 Chk1 与 p53 的磷酸化

p53 又被称为肿瘤抑制蛋白, 在胁迫的诱导下, p53 常常发生翻译后修饰(包括磷酸化和乙酰化等), 这些修饰使 p53 活化并不易被降解。活化的 p53 作为转录因子结合到靶基因的启动子上, 促进靶基因的转录, 靶基因的表达使细胞出现细胞周期阻滞或凋亡等特征^[12]。早期有研究者发现在多种肿瘤细胞系中采用 siRNA 降低 Chk1/Chk2 的表达量对 DNA 损伤后 p53 反应(p53 磷酸化、p53 在细胞内的积累、p53 下游靶蛋白的转录水平等)没有影响, 推测 p53 介导的 DNA 损伤反应不需要 Chk1/Chk2 的作用^[2], 但也有研究者发现高氧环境(hypoxia)胁迫能通过 ATR-Chk1 途径使 p53 磷酸化^[9], 最新研究表明 Chk1 参与 p53 N 端、C 端的磷酸化, 间接调节 p53 的乙酰化状态。当 siRNA 降低 Chk1 的表达量时, p53 的 N 端 Ser15、Ser20 磷酸化稍有减少、C 端 Ser366、Ser378、Thr387 磷酸化消失, 下游靶基因的转录水平明显降低。以上研究结果的差异可能是由于供试细胞的微环境不同造成, 这些研究结果表明在某些细胞中 Chk1 通过调节 p53 磷酸化和乙酰化水平增强 p53 的活性^[12]。

3.5 Chk1 调控 DNA 损伤信号 / 修复蛋白在核灶区(nuclear foci)积累

有研究报道 DNA 的损伤不能直接引起 ATR 的活化, ATR 的活化可能需要 ATR 相互作用蛋白(ATRIP)、单链 DNA 上的复制蛋白 A (RPA)的共同作用^[23]; ATR 磷酸化活化 Chk1 也需要其他蛋白的共同作用(如 *S.pombe* 的 Crb2 蛋白, 非洲爪蟾的 Claspin 蛋白), 这些蛋白质可能招募 Chk1 到 ATR/ATM 或者为 ATR/ATM 磷酸化 Chk1 的发生提供反应的平台。当 DNA 损伤后, DNA 损伤信号蛋白和修复蛋白在核灶区积累, 这些蛋白质包括 ATR、Mell1/NBS1/Rad50 复合物、BLM、Rad51、RPA、Rad9-Rad1-Hus1 (9-1-1)复合物、Rad17、Brcal、TopBp1。这些蛋白质在核灶区聚集的功能还不明

确,有人推测可能为标记DNA损伤位点,帮助起始DNA损伤信号,修复损伤的DNA,最近的研究也证实了这些蛋白质在核灶区积累是起始DNA损伤信号不可缺少的因素^[18]。

AAV2是单链DNA病毒,它感染宿主诱导DNA损伤反应;紫外线处理后的AAV2失去了复制能力,但它也能活化细胞检验点,使宿主细胞Chk1活化,引起DNA损伤信号/修复蛋白在核灶区积累,将细胞阻滞在G₂期^[18]。HIV-1感染也能引起宿主DNA损伤反应,也观察到DNA损伤信号/修复蛋白在核灶区积累^[14]。当采用siRNA降低Chk1的表达量时,上述蛋白质在核灶区积累的现象消失,提示Chk1不仅是DNA损伤信号向前传递的靶向蛋白,也是反馈信号招募DNA损伤信号/修复蛋白进入特定核位点的调控因子^[18]。

4 展望

从目前已有的研究资料来看,Chk1作为细胞检验点的信号转导蛋白在保持基因组的完整发挥着重要的作用。虽然Chk1的结构、功能等已经逐渐清晰,但还有许多问题尚待解决:如脊椎动物Chk1是胚胎发育必不可少因子,DNA修复完成后Chk1活性降低,病毒调节Chk1的机制等。Chk1的研究也为癌症的治疗带来了契机。在临床上由于肿瘤细胞在化疗中逃避凋亡,许多通过损伤DNA使细胞凋亡的癌症治疗方案在疗效上十分有限,而细胞逃避凋亡与细胞周期检验点的活化有关,因而现在有研究者正试图通过抑制细胞周期检验点来增强肿瘤细

胞对化疗药物的敏感性。国外研究报道Chk1特异性抑制剂UCN201处理细胞后不仅增加细胞对替莫唑胺(TMZ抗癌药物)的敏感性,而且阻断TMZ诱导的Chk1活化和短暂的G₂/M阻滞,从而增加细胞凋亡;国内也报道用Chk1/Chk2反义核苷酸转染人红白血病细胞系k562能明显提高细胞对药物治疗的敏感性^[24]。因此,继续深入研究Chk1,对肿瘤的治疗将带来帮助。

参考文献 (References)

- [1] 江瑞胜等. *细胞生物学杂志*, 2004, **26**: 209
- [2] Zhou BB *et al. Nature*, 2000, **408**: 433
- [3] Chen Y *et al. DNA Repair (Amst)*, 2004, **3**: 1025
- [4] Cortez D. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 37139
- [5] Katsuragi Y *et al. Mol Biol Cell*, 2004, **15**: 1680
- [6] Ng CP *et al. J Biol Chem*, 2004, **279**: 8808
- [7] Zhao B *et al. J Biol Chem*, 2002, **277**: 46609
- [8] Chen P *et al. Cell*, 2000, **100**: 681
- [9] Das KC *et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, **286**: 87
- [10] 王颖等. *中国病毒学*, 2002, **17**: 132
- [11] Zhou R *et al. Virus Res*, 2004, **105**: 113
- [12] Ou YH *et al. Mol Biol Cell*, 2005, **16**: 1684
- [13] Okubo EJ *et al. J Virol*, 2003, **77**: 1257
- [14] Zimmerman ES *et al. Mol Cell Biol*, 2004, **24**: 9286
- [15] Poggioli GJ *et al. J Virol*, 2002, **76**: 2585
- [16] Roshal M *et al. J Biol Chem*, 2003, **278**: 25879
- [17] Goh WC *et al. Virology*, 2004, **318**: 337
- [18] Jurvansuu J *et al. J Virol*, 2005, **79**: 569
- [19] Davy CE *et al. J Virol*, 2002, **76**: 9806
- [20] Morita EJ *et al. J Virol*, 2001, **75**: 7555
- [21] Kramer A *et al. Nat Cell Biol*, 2004, **6**: 884
- [22] Royou A *et al. Curr Biol*, 2005, **15**: 334
- [23] Ward IM *et al. J Biol Chem*, 2004, **279**: 9677
- [24] 黄伟等. *中国实验血液学杂志*, 2004, **12**: 563

Progress in Checkpoint Kinase 1

Chang-Jun Li, Kai-Yu Liu, Dong-Ye Yang, Ze-Hua Yu, Jian-Xin Peng*, Wen Chen, Fei Xie
(Institute of Entomology, Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

Abstract Checkpoint kinase 1 (Chk1), an evolutionarily conserved protein kinase, is an effector of cell DNA damage checkpoint. When DNA was damaged or DNA replication fork halted by ionization radiation or ultraviolet radiation, Chk1 was activated, which induced cell cycle arrest, DNA repair or cell apoptosis. In this review, we described the structure and function of Chk1 and discussed how the virus regulate the cell cycle of host cell by manipulating Chk1.

Key words Chk1; ATR; DNA damage checkpoint; MPF; DNA damage signaling/repair protein