

的调控机制,它们涉及到大量的基因,其中以G2/M转换处的调控机制研究得最早也最透彻。另外,APC途径在M中期/后期转化中起着重要作用。

参 考 文 献

- [1] 张四清等,1994,细胞周期调控因子P34^{cdc2}及cyclin的研究新进展,中国国家自然科学基金委员会生命科学部和中国科学院上海文献情报中心编,“细胞生物学新动态”上海科学技术出版社,37-50.
- [2] 张传茂等,1994,细胞有丝分裂期调节研究的历史与现状,中国国家自然科学基金委员会生命科学部和中国科学院上海文献情报中心编,“细胞生物学新动态”上海科学技术出版社,21-36.
- [3] Hutchison C. et al., 1995, *Cell Cycle Control*, Oxford University Press Inc. New York, 1-8, 16-20.
- [4] Fantes P. et al., 1993, *The Cell Cycle a Practical Approach*, Oxford University Press Inc. New York, 69-71, 93-95.
- [5] Marx J., *Science*, 1991, **252**: 1490-1492.
- [6] Draetta G., 1990, *TIBS*, **15**: 378-383.
- [7] Nasmyth K., 1996, *Tig*, **12**(10): 405-412.
- [8] Damagnez V. et al., 1995, *The EMBO Journal*, **14**(24): 6164-6172.
- [9] Nurse P. et al., 1981, *Nature*, **292**: 558-560.
- [10] Piggott J. et al., 1982, *Nature*, **298**: 391-393.
- [11] Labib K. et al., 1996, *Trends in Cell Biology*, **6**: 62-66.
- [12] Pines J., 1994, *Nature*, **371**(27): 742-743.
- [13] Kuentzel H. et al., 1996, *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, **377**(7-8): 481-487.
- [14] Stillman B., 1996, *Science*, **274**(6): 1659-1664.
- [15] King R. W., 1996, *Science*, **274**(6): 1652-1659.
- [16] Murray A. W. et al., 1991, *Scientific American*, 56-63.
- [17] Hartwell L., 1994, *Nature*, **371**(27): 286.
- [18] Labib K. et al., 1995, *J. Cell Sci.*, **108**(10): 3285-3294.
- [19] Moreno S. et al., 1994, *J. Cell Sci.*, **107** Suppl. **18**: 63-68.
- [20] D'Urso G., et al., 1995, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **5**(1): 12-16.
- [21] Huberman J. A., 1996, *Chromosoma*, **105**(4): 197-203.
- [22] Schwob E. et al., 1994, *Cell*, **79**: 233-244.
- [23] Nasmyth K., 1996, *Science*, **274**(6): 1643-1645.
- [24] Murray A. W., 1993, *Current Biology*, **3**(5): 291-293.
- [25] Lu K. P. et al., 1993, *Endocrine Reviews*, **14**(1): 40-58.
- [26] Belenguer P. et al., 1997, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **232**(1): 204-208.
- [27] Means A. R., 1994, *FEBS Letters*, **347**: 1-4.
- [28] Nurse P., 1990, *Nature*, **344**(5): 503-507.
- [29] Gautier J. et al., 1990, *Cell*, **60**: 487-494.
- [30] Lohka M. J. et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 3009-3013.
- [31] Roy L. M. et al., 1990, *Cell*, **61**: 825-831.
- [32] Sagata N. et al., 1989, *Nature*, **342**: 512-518.

Elongin 的转录延伸调控及其与 VHL 肿瘤抑制蛋白的关系

许乃寒 张金红*

(南开大学分子生物学研究所 天津 300071)

长期以来,转录的起始一直被视为基因表达(尤其是人类疾病中错误的基因表达)过程中极重要的调控机制。人类的许多疾病,包括某些癌症都被认为是转录起始受到破坏引起的。例如,染色体易位致使癌基因和调控成分并列而导致的原癌基因不正确表达被归因于转录起始的改变^[1];控制细胞周期进程,发育或凋亡的基

因(如视网膜细胞瘤 Rb 基因或 P53 基因)的突变或缺失而引起的致癌性转化也被归因于转录起始的缺陷。然而,只关注基因转录起始的调控是不够的。事实上,基因的转录是一个包括起始,延伸和终止的连续过程。多年来,人们已经

* 通讯联系人。

认识到在原核生物中基因转录的延伸调控是很重要的调控机制。最近十几年的研究发现越来越多的真核基因也受转录延伸水平的调控^[2]。

我们知道,mRNA的合成需要多种转录因子活化 RNA pol I,转录因子与 pol I 共同组装成基本的转录单位,是 pol I 启动转录所必需的。在转录时至少有 6 种起始因子(TF I A、TF I B、TF I D、TF I E、TF I F、TF I H)能启动 RNA pol I 与启动子的结合而启动基因转录过程^[3],这些转录因子依次参予并逐一与 pol I 装配成转录复合体。当具有激酶活力,能使 RNA pol I 的羧基末端结构域(CTD)磷酸化的 TF I H 参入复合体后,此复合体离开启动子,进入转录的延伸阶段^[4]。

在转录延伸过程中,还存在 3 种能增加 RNA pol I 转录速度的延伸因子(S I、TF I F、S II)。其中 S I 是一种 38kD 的延伸因子,能促进 pol I 通过转录阻遏物(如核蛋白复合体 RNP 等)。TF I F 是一种由 RAP38 和 RAP74 组成的异源二聚体。但酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中的 TF I F 则是一种异源三聚体^[5,6]。S II (Elongin)也是一种异源三聚体,它由分子量分别为 110KD、18KD 和 15KD 的 A、B、C3 种亚基组成。TF I F 和 S II 与 S I 不同的是,它们既不能将双链 DNA 上的 S I ——敏感位点中转录停留位点上的 pol I 释放出来,也不能诱导新生转录本的切割,而可能是通过抑制 RNA pol I 在转录元内许多位点上短暂的停留而加速转录延伸的速度^[7,8]。

VHL(D Von Hippel-Lindau Disease)是一种由于细胞内易感性基因 VHL 肿瘤抑制基因(Von Hippel-Lindau tumor suppressor gene)的突变或缺失而引起的转录调控机制紊乱的一种遗传性癌症综合征,VHL 基因突变的个体^[9]会导致多种癌症的发生,如肾癌、成血管细胞瘤、嗜铬细胞瘤、视网膜血管瘤等^[10]。VHL 基因产物对于 Elongin 有负调控作用,可干扰 Elongin 的转录延伸活力^[11]。

本文将分别从 Elongin 的结构、功能、E-

longin 与 VHL 蛋白的相互作用和调控机制等几个方面来探讨肿瘤抑制和转录延伸调控的关系。

一、Elongin 的结构组成

转录延伸因子 Elongin 是根据其具有增加 RNA pol I 复合体沿 DNA 模板移动速度的酶活力而命名的^[12],它是一种异源三聚体。

Elongin A 不含转录因子的特征性结构如锌指、亮氨酸拉链、螺旋—转角—螺旋等,其氨基末端序列与延伸因子 S I 的氨基末端有相似序列。这两种蛋白质有 29% 左右相同的氨基酸;如果包括保守氨基酸,其同源程度可达 53%,这说明 Elongin A 和 S I 都是转录因子家族的成员。尽管认为 Elongin A 的氨基末端序列在体内起调控作用,但在体外检测中,该序列的调控活力却没有表现出来^[13]。

Elongin B 是一种由 118 个氨基酸组成的蛋白质,属于 UbH 基因家族^[14],Elongin C 是一个含 112 个氨基酸的蛋白质,与大肠杆菌的转录终止蛋白 ρ 因子有同源性^[15]。

二、Elongin 的转录调控作用和各亚基的功能

Elongin 能够抑制 RNA pol I 在转录元内多个位点上的暂停,从而增加 pol I 延伸 RNA 链的总体速度。Elongin 所含的 3 种不同亚基,是怎样执行其延伸功能呢?

通过由各 Elongin 亚基组装成不同的 S II 重组复合体,用腺病毒主要晚期启动子(AdML)测定它们增加全长转录本积累的速度,发现:只有含完整的重组 Elongin 复合体时,才有转录延伸活力,而重组复合体只含 B、C 亚基而无 A 亚基时,则基本不能刺激全长转录本的生成^[16]。这证明,Elongin A 是复合体的催化亚基,而 Elongin B、C 亚基不具有催化活性。

Elongin B、C 对 Elongin 活力的作用可能是增加 Elongin A 的特异性活力或者是充当“分子伴侣”增加功能性 Elongin 复合体的形成

及其稳定性而实现的,那么 B、C 亚基究竟是以何种方式参与调控呢?

首先重建具有转录活力的 Elongin 复合体和各亚单位组装体,在以腺病毒晚期启动子进行的失控转录(AdML runoff transcription)实验中,发现完整的 ABC 复合体存在时,Elongin 的活力最大;只有 BC 亚基而无 A 亚基时,基本上无转录延伸活力;AB 两亚基存在时,转录活力与 A 亚基单独存在时的活力相同;AC 两亚基存在而无 B 亚基时,转录活力介于 ABC 与 A 或 AB 的活力之间,如图 1 所示。以上结果表明:Elongin B 的活力依赖于 Elongin C 的存在,B、C 亚基则是复合体的正调节亚基。

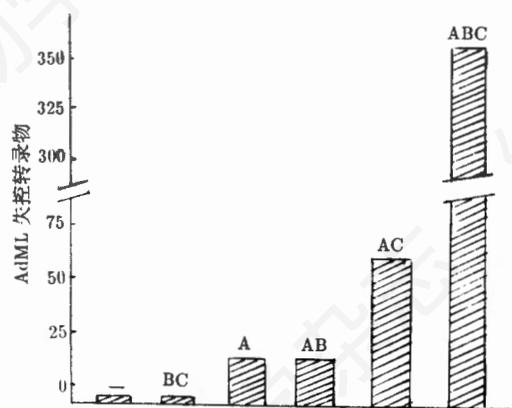


图 1 重组 Elongin(S III)和 Elongin 亚基组装体的转录活性(引自 Teijiro Aso et al., 1995, Science, 269:1440)

各复合体中,亚基的含量分别为:A:150ng;B:30ng;C:30ng;分别取 μ l 复性后的复合体用于转录活性的测定

随后,在 Elongin 的复合体和各亚单位组装体的酶促反应动力学^[16]及其热稳定性的实验中亦观察到:完整的 ABC 复合体的转录活力和稳定性均高于 AC 复合体;ABC 复合体经 28℃ 温育 2 小时后,其活力基本无损失,而 AC 复合体经 28℃ 2 小时温育后,活力大部分丧失。这些结果证明了 Elongin B 能增加复合体的稳定性,促进复合体的装配,而不能增加 Elongin A 的活力,它似乎起着“分子伴侣”的作用^[17]。

Elongin C 在无 Elongin B 存在时也能与 Elongin A 结合成 AC 复合体,具有一定的特异性转录活力,C 亚基可能是 A 亚基的直接激活分子,但它是通过构象变化增加 A 亚基的活力还是与 RNA pol I 新生转录本,DNA 模板或是它们的复合体直接作用,其作用方式尚不清楚^[16]。

Elongin 复合体的装配过程是:Elongin B 与 Elongin C 先结合成 BC 复合体,然后再与 Elongin A 结合成完整的 Elongin 复合体。

三、VHL 蛋白及其对 Elongin 的负调控作用

VHL 肿瘤抑制基因(Von Hippel-Lindau tumor suppressor gene)是一种存在于真核细胞内的肿瘤抑制基因,VHL 肿瘤患者其 VHL 基因发生了突变,突变率约为 1/36,000。人类的 VHL 基因编码一种含 213 个氨基酸的蛋白质^[18],它与已知的蛋白质无任何序列同源性。鼠的 VHL 蛋白与人的 VHL 蛋白有 88% 相同,但鼠的 VHL 蛋白的氨基末端比人 VHL 蛋白氨基末端少一段重复 8 次的酸性五肽结构。VHL 基因突变或高甲基化^[19]引起的 VHL 蛋白的缺陷会导致多种肿瘤的发生^[20],这主要是因为 VHL 蛋白与 Elongin 在许多致癌基因的转录调控上有密切关系。

1. VHL 蛋白与 Elongin 各亚基间的相互关系

过去的研究发现,体外培养的人和鼠的细胞中,VHL 蛋白能与几种功能尚未明确的蛋白形成寡聚体^[19],其中鉴别出一种复合体含 VHL 蛋白和 9KD、16KD 两种蛋白,这两种蛋白均与 VHL 的肿瘤抑制功能有关。通过对 P16 和 P9 的序列分别和鉴定,发现 P9 中 20 个氨基酸里有 19 个与 Elongin C 有相同序列^[15],P16 中 21 个氨基酸里有 20 个与 Elongin B 有相同序列^[14]。免疫沉淀法发现 VHL 能与 P9 和 P16 结合,但不能与分子量 110KD 的蛋白结

合。Elongin A 分子量为 110KD, 这意味着 VHL 不能与 Elongin A 结合。

近来, 人们将编码 VHL, Elongin A、B、C 的 cDNAs 克隆到 PGEM3 载体上, 在转录-翻译体系中合成蛋白产物, 再通过免疫沉淀法检测, 发现无论 Elongin 其他亚基存在与否, Elongin A 都不能与 VHL 结合; VHL 能与 Elongin C 单独结合, 而不能与 Elongin B 单独结合, 当 VHL 与 Elongin B、C 都存在时, Elongin BC 与 VHL 的结合能力明显增强^[15]。VHL 与 Elongin BC 的结合与 Elongin A 和 Elongin BC 的结合是相互竞争的。

2. VHL 与 Elongin B、C 的作用位点

Adam Kibel 等人^[21]在所进行的用表达质粒转染肾癌细胞 786-0 的实验中发现, 有两种蛋白 P14 和 P18 能与 VHL 特异结合, 这种特异性结合与肿瘤的抑制有关; 结合位点位于 VHL 的第 157~172 个氨基酸序列上, 这一段序列被称为 VHL 蛋白的共线性区 (Colinear region of the VHL protein, pVHL)。通过对 P14 和 P18 的序列分析和鉴定, 证实了 P14 和 P18 分别就是 Elongin 的 C、B 两种亚基^[22]。pVHL 与 Elongin B、C 无任何序列同源性, 但 pVHL 与 Elongin A 的第 547-560 氨基酸残基有相同序列。在 VHL 肿瘤患者中, 这一序列发生了突变, 该序列是 VHL 唯一与 Elongin A 相同的区域, 从而推断出这一区域正是 VHL 与 Elongin BC 结合的位点^[23,24]。

3. VHL 对 Elongin 的负调控作用

为了考察 VHL 是否影响 Elongin 的转录延伸活力, 进行了一系列的实验, 结果发现: 在无 Elongin 复合体存在时, VHL 对 pol I 的转录延伸速率无明显的抑制或激活作用; Elongin 复合体存在时, VHL 抑制其转录延伸活力, 转录产物积累量下降^[25]。这证明了 VHL 是 Elongin 的抑制物, 不论是在体外实验还是体内实验中, 它都能抑制 Elongin 的转录延伸活力。如图 2 所示, VHL 与 Elongin 相互作用机制模式。

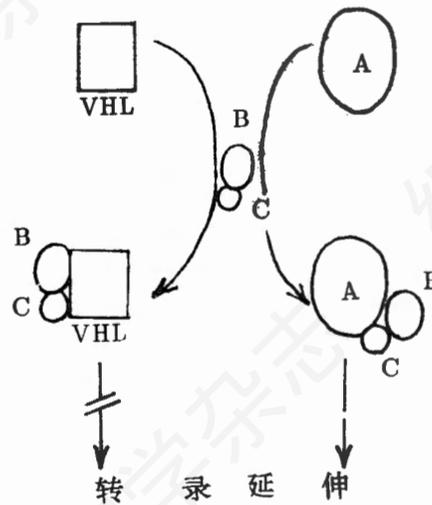


图 2 VHL 与 Elongin 相互作用模型 (引自 D. R. Duan, et al., 1995, Science, 269:1403)

在体外实验中, 如果缺少 Elongin 复合体时, RNA pol I 的转录延伸速度不高, Elongin A 和 VHL 蛋白能相互竞争与 B、C 两亚基的结合, Elongin ABC 刺激转录延伸, 而 VHL-BC 则抑制转录延伸, 两种复合体的比例决定了 RNA pol I 的转录延伸活力。

四、VHL 型肿瘤的抑制和转录延伸水平的调控

在 VHL 型肿瘤中, 由于 VHL 蛋白的缺陷, 使得 Elongin 复合体刺激原癌基因的大量转录, 导致恶性细胞不断分裂; 而在正常细胞中, VHL 蛋白能与 Elongin A 竞争和 Elongin BC 的结合, 使 Elongin 复合体的形成受抑制, 从而导致 RNA pols I 在转录位点上的短暂停留, 原癌基因转录受到抑制。所以, VHL 干扰 Elongin 的转录延伸活力是这类肿瘤抑制的基础^[26], 如图 3。

在分子生物学和分子药理学研究中, 这些发现引起了人们极大的兴趣, 也给人们提出了一些重要的问题和推测, 如: (1) VHL 的靶基因有哪些? 推测一些恶性肿瘤基因如 C-myc,

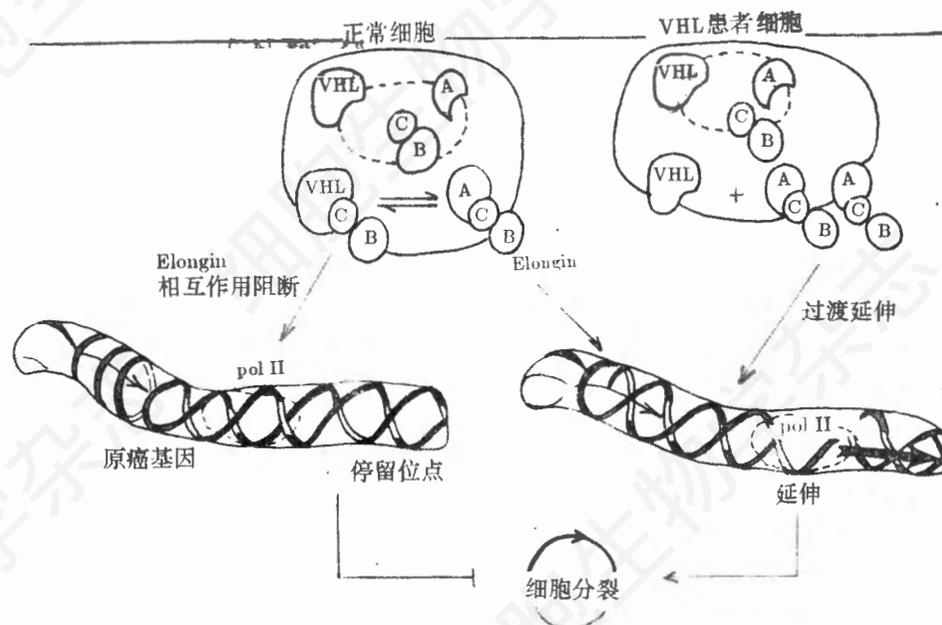


图3 VHL肿瘤抑制因子作用机制模式(引自 Anton Krumm, et al., 1995, Science, 269:1400)

N-myc, L-myc, C-fos 等可能受转录延伸水平的调控,它们或许是 VHL 的靶基因。(2) VHL 能对其他的生化途径发生作用吗?VHL 能与某些尚不确定的蛋白相结合,暗示 VHL 或许在细胞代谢途径中还有其他的功能^[19]。(3) Elongin 的功能如何行使?如何在转录延伸水平上调控基因的表达,细胞的生长和肿瘤的形成等等。

自从 80 年代中期发现了第一个抑癌基因 Rb 基因以来,有人甚至预言“一个肿瘤抑制基因的时代已经到来”。对肿瘤相关基因的研究表明,抑癌基因的失活可能使得正常的转录调控功能中的环节受到破坏,从而导致整体上的细胞代谢和增殖发生紊乱;若能修复这一环节,则有可能逆转肿瘤细胞的恶性表型。一旦上述问题得到进一步的阐明,必将会对肿瘤的基因治疗和探索真核细胞转录调控机制起重要的推动作用。

摘 要

一种新的转录延伸因子 Elongin 能催化哺

乳动物细胞中 RNA pol II 的转录延伸速度。Elongin 复合体是由分子量分别为 110、18、和 15KD 的 A、B、C 三种亚基组成的异源三聚体。VHL 蛋白对 Elongin 的转录延伸作用有负调控作用,VHL 蛋白由 VHL 基因(Von Hippel-Lindau tumor suppressor gene)所编码。VHL 基因的突变会引起 VHL 型肿瘤,一种遗传性癌症综合征。VHL 蛋白能与 Elongin 的 B、C 亚基紧密结合,从而抑制 Elongin 复合体的转录延伸活力,这可能是 VHL 型肿瘤抑制的基础。这些发现表明,VHL 蛋白在 Elongin 的转录调控中起着一定的作用。

参 考 文 献

- [1] T. H. Rabbitts, 1944, *Nature*, **372**:143.
- [2] A. G. Kundson, 1993, *Proc. Natl Acad. Sci USA*, **90**:10914.
- [3] R. C. Conaway, and J. W. Conaway, 1993, *Annu. Rev Biochem*, **62**:161.
- [4] Gene V, 1994, Binjamine Lewin, P861.
- [5] N. L. Henry, M. H. Sayre, R. D. Komberg, 1992, *J. Biol. Chem.*, **267**:23388.

- [6] N. L. Henry et al., 1994, *Genes Dev.*, **8**, 2868.
- [7] J. N. Bradsher et al., *Ibid*, P2559.
- [8] D. H. Price, A. E. Sluder, A. L. Greenleaf, 1989, *Mol. Cell Biol.*, **9**:1465.
- [9] F. Latif et al., 1993, *Ibid*, **260**:1317.
- [10] V. A. Mckusick, 1992, Mendelian Inheritance in Man (Johns Hopkins Uni, Press, Baltimore).
- [11] Anton Krumm and Mark Groudine, 1995, *Science*, **269**:1400.
- [12] J. N. Bradsher, S. Tan, H. McInanry, et al., 1993, *J. Biol. Chem.*, **268**:25587.
- [13] D. Reines, 1992, *J. Biol. Chem.*, **267**:3795.
- [14] K. P. Garrett et al., 1995, *Proc. Natl Acad, Sci USA*, **92**:1772.
- [15] K. P. Garrett et al., 1994, *Proc. Natl Acad, Sci. USA*, **91**:5237.
- [16] Teijiro Aso, William S. Lane et al., 1995, *Science*, **269**:1440.
- [17] D. Finley et al., 1989, *Nature*, **338**:394.
- [18] F. Latif et al., 1993, *Science*, **260**:1317.
- [19] D. R. Duan et al., 1995, *Proc. Natl Acad, Sci USA*, **92**:6459.
- [20] K. Foster et al., 1994, *Hum. Mol Genet.*, **3**: 2169.
- [21] Adam Kibel et al., *Science*, **269**:1444.
- [22] K. Garrett, D. Haque, 1994, *Gene*, **150**:413.
- [23] J. R. Gnarra et al., 1994, *Nature Genet*, **7**: 85.
- [24] A. Kibel, O. Iliopoulos et al., 1995, *Science*, **269**:000.
- [25] D. R. Duan, R. D. Klausnert, 1995, *Science*, **269**:1403.
- [26] A. Kibel, O. Iliopoulos et al., 1995, *Ibid*, P1444.

生殖激素与精子发生中细胞凋亡的调控

沈 凯 杨宇如

(华西医科大学附属第一医院泌尿外科 成都 610041)

唐孝达

(上海市第一人民医院泌尿外科 200080)

30多年来细胞死亡的概念逐渐发展并受到重视,它的深入研究使人们在细胞与分子水平上阐明生命现象的工作又前进了一大步。生命不仅需要细胞增殖,而且还需要细胞死亡。细胞增殖和细胞死亡之间的平衡是维持多细胞生物体内平衡的一种重要方式。国外60年代提出了程序性细胞死亡(programmed cell death)的概念,70年代提出了细胞凋亡(apoptosis)的概念,虽然两种概念在最初的定义上有差别,但目前大多数学者都将它们等同起来看待^[1-4]。

精子发生是进入性成熟发育阶段的睾丸精原细胞在垂体促性腺激素和雄激素的作用下,增殖分化,依次经过精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精子细胞的发展最后形成高度分化的精子的过程。1900年,Regaud首先认识到在精子发生过程中存在精细胞的退化变性(degeneration)。后来,Clermont及其同事的研究为阐明精子发生动力学和激素对它的调控作用奠定了基础。对大鼠等啮齿目动物睾丸的研

究表明,生精过程中实际产生的精子数量比理论上预测的精子数量减少了约25%—75%,精子发生中生精细胞的退变是造成这种生理现象的原因。精子产生的数量取决于退变死亡的生殖细胞与增殖发育并存活生殖细胞之间的比例。这种生殖细胞的退变经证实与凋亡的形式相符。进一步的研究亦显示睾丸生殖细胞出生前的自发性死亡和出生后的退变死亡均属凋亡^[5-7]。

一、生理状态下的生精细胞凋亡

睾丸曲细精管的生精上皮由5—6代生精细胞组成,这些不同发育阶段的各级生精细胞的排列有一定的规律性,形成一定的细胞组合。在曲细精管的一个固定切面上,细胞组合按一定的顺序先后出现,并循环反复,形成生精上皮周期。周期中的每个细胞组合图象称为一个时期。大鼠有14个时期,小鼠有12个,人有6个^[8,9]。在精子发生过程中,始终都存在着细胞