

- 666.
- [33] Finley D., et al., 1989, *Nature*, **338**: 394-401.
- [34] Tentsch S., 1992, *Annu. Rev. Genet.*, **26**: 179-207.
- [35] Seufert W. and Jentsch S., 1990, *EMBO J.*, **9**: 543-550.
- [36] Jungmann J., et al., 1993, *Nature*, **361**: 369-371.
- [37] Rechsteiner M., et al., 1993, *J. Biol. Chem.*, **265**: 6065-6068.
- [38] Erdmann R., et al., 1991, *Cell*, **64**: 499-510.
- [39] Bohley P. and Seglen P. O., 1992, *Experientia*, **48**: 1519-1557.
- [40] Chiang H. L., et al., 1989, *Science*, **246**: 382-385.
- [41] Dice J. F., et al., 1994, *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*. New York Cold Spring Harbor Laboratory Press, 137-151.
- [42] Xu C-S, et al., 1997, *Comp. Biochem. Physiol.*, **117B**: 169-178.
- [43] Ronit G., et al., 1991, *J. Biol. Chem.*, **266**: 3601-3610.
- [44] Laszlo L., et al., 1990, *FEBS Lett.*, **261**: 365-368.
- [45] Dice J. F., 1987, *FASEB J.*, **1**: 349-357.
- [46] Schwartz A. L. and Ciechanover A., et al., 1988, *EMBO J.*, **10**: 2961-2966.
- [47] Doherty F. G. and Usborn N. V., et al., 1989, *Biochem. J.*, **263**: 47-55.
- [48] Dunn W. A., et al., 1990, *J. Cell Biol.*, **110**: 1923-1933.
- [49] Dunn W. A., et al., 1990, *J. Cell Biol.*, **110**: 1935-1945.

## 转录因子 E2F 在细胞周期调控中的重要作用

姜 勇\* 涂晓明 施蕴渝

(\*中国科学院结构生物学开放实验室 合肥 230026 中国科学技术大学生命科学学院 合肥 230026)

转录因子 E2F 是细胞周期中 G1 期向 S 期过渡的重要调控因子。它通过与 pRb 及相关蛋白等多种依赖细胞周期的蛋白质及酶的相互作用调控着细胞的增殖。同时, E2F 与肿瘤发生, 细胞凋亡以及抑制肿瘤都有着紧密的关系。因此, 对于它的研究意义重大。本文将从几个方面对 E2F 研究进展等进行综述。

### 一、E2F 的确定及它的 cDNA 克隆

1986 年 Kovsdi<sup>[1]</sup>等利用胶滞后 (gel shift mobility assay) 实验研究腺病毒感染细胞的核抽提物与腺病毒的 E2 启动子相互作用时, 发现了一个与 SP1 等已确定的细胞内转录因子不同的新的转录因子, 命名为 E2F。应用足迹法 (Dnase I footprinting) 实验确定了这种转录因子相结合的 DNA 序列为 TTTCGCGC。同时, 在非腺病毒感染的细胞中也探测出了这种转录因子。说明, 这种与 E2 启动子相结合的转录因子

是胞内转录因子。Yee<sup>[2]</sup>等进一步确定 E2F 与 DNA 特异性结合后的刺激转录作用。直到 1991 年, 分别有几个不同的研究小组发现了 pRb 和 E2F 的相互结合, 及这种结合的复合物与细胞增殖控制的密切关系。利用 E2F 与 pRb 相结合的特性, 两个研究小组几乎同时分别从 Nalm6 细胞的  $\lambda$ gt11 表达文库和 Akata 细胞的  $\lambda$ gt11 的表达文库中, 筛选了一个编码 E2F 的 cDNA 克隆<sup>[3,4]</sup>。这种克隆产物的抗体可与细胞抽提物中的 E2F 活性蛋白免疫沉淀; 当细胞抽提物与 pRb 抗体免疫沉淀时, 这种克隆产物也能被免疫共沉淀。这种克隆产物表达蛋白也和含 E2F 识别序列的 DNA、RB 蛋白、腺病毒 E4 产物结合。这种克隆产物表达在转染的细胞内能刺激依赖 E2F 位点的转录。所有结果都说明这种产物就是 E2F。称之为 E2F-1。

本课题受中国科学院“九五”基础性研究基金资助, 项目号: J-6-07。

最初有关 E2F-1 的功能的研究,已经确定它的 cDNA 序列的几个结构域(见图 1)。它的 pRb 结合结构域缺少典型的与 pRb 结合 leu-x-cys-x-Glu 特征序列。而这种特征序列存在于 RB 结合蛋白如致癌基因蛋白 E1A, T 抗原和 E7 等中。所以 E2F 与 RB 的相互作用采取了不同的方式。

## 二、E2F 家族

1993 年, Ivey 等人<sup>[8]</sup>用 E2F-1 的 DNA 结合结构域的 DNA 顺序设计的探针, 去寻查

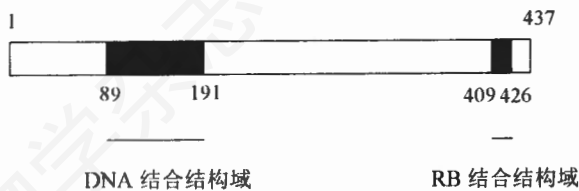


图 1 E2F 蛋白质结构<sup>[3]</sup>

Hela 细胞的 cDNA 文库。发现了一种具有 E2F 性质的新的蛋白, 命名为 E2F-2。它和 E2F-1 相比有 46% 的氨基酸是相同的。特别是它与 DNA 和 RB 结合的结构域部分与 E2F-1 相比较是保守的。与此同时, Lees. J. A 等<sup>[6]</sup>分离到了两个不同于 E2F-1 的 cDNA 克隆。其中一个与 E2F-2, 完全一致。另一个称为 E2F-3。Lees. J. A 等分别对 E2F-2, E2F-3 进行了染色体定位, 其中, E2F-2 位于 1p36, E2F-3 位于 6q22。E2F-2 的 E2F-3 都可结合野生型的 E2F 识别位点。

研究表明, E2F-1, E2F-2, E2F-3 都具有与 pRb 结合的特性, 在细胞中, 它们均定位于细胞核中。都具 cyclin/cdk 的结合位点。

1994 年, 两个研究小组分别同时克隆出一个与 E2F-1 有很强同源性的 413 个氨基酸残基大小的转录因子, 称为 E2F-4。它与前三种 E2F 的不同之处在于, 它只能和 pRb 相关蛋白 P107 结合, 而不能与 pRb 结合。它在整个细胞周期中各个时期均有表达, 而不同于前三种 (E2F-1, -2, -3) 只是大量出现于 G1-S 过渡时

期。E2F-4 和 DP1 在 SaoS-2 细胞过量表达可使细胞从 G1 期到 S 期和从 G2 期到 M 期。在大鼠的胚胎成纤维细胞中, 它和激活的 ras 癌基因作用引起转化, 说明 E2F-4 有癌基因的活性。

1995 年, Hijmans E. M 等克隆了一个与 RB 相关蛋白 p130 结合的具 E2F 转录激活作用的蛋白, 称 E2F-5, 它的 cDNA 编码 346 氨基酸的蛋白, 预计分子量为 38Kd。它和 E2F-4 有 78% 的同源性, 但和 E2F-1 相比只有 57% 的同源性。E2F-5 像 E2F 家族中的其他成员一样能和 DP-1 一起结合 DNA 上的 E2F 识别序列。E2F-5 只能和 p130 结合而不能与 pRb 相结合, 这一点类似于 E2F-4。当 E2F-4 和 E2F-5 过量表达时, 主要是分布在细胞质中<sup>[6]</sup>。这一点也不同于 E2F-1, E2F-2, E2F-3。总之, E2F 家族的不同成员通过不同的途径对细胞增殖进行调控, 它们在细胞内可能组成一个复杂的网络。

## 三、E2F-1 与 DNA 的结合

1993 年, Huber. H. E<sup>[7]</sup>等人用 DNA 亲和柱从 Hela 细胞中纯化了与 DNA 结合的蛋白。将收集峰走 SDS-PAGE 时显示多条蛋白带。用合成的腺病毒 E2 启动子去探测每个蛋白的 E2F 的 DNA 结合活性, 发现结合活性都很低。然而, 将不同的蛋白组份混合后 E2F 的结合活性会上升 100 至 1000 倍。他们得到了五个蛋白组份, 按表观分子量将其分成两组, 60K 左右一组共有两个蛋白, 50K 左右一组有 3 个蛋白。而合适的结合活性至少需要每组各出一个蛋白组成的异二聚体。利用 DNA 结合特异性, DNA 足迹法, 以及和 pRb 结合等特性的研究表明, 那一组 60K 左右蛋白可能就是 E2F。而和他组成异二聚体的另一组成与 E2F 有很大的不同。当时, 他们并不知道另一组成就是一种随着细胞分化而减少的转录因子, DRTF-1, 即现在普通称为 DP-1 的蛋白。

几乎与此同时, Girling<sup>[8]</sup>等人从 F9 细胞中用生化方法纯化出了 DP-1 蛋白, 并测出这个

蛋白的部分氨基酸顺序,利用这个顺序设计的探针,分离出了DP-1的cDNAs。用免疫沉淀法显示出DP-1是pRb(或P107)和E2F/DRTF1复合物与DNA结合的组分,具有与E2F位点特异性DNA结合的结构域。在此之后,几个研究小组分别发现了DP-1和E2F-1与DNA结合及转录激活的协同作用。尽管DP-1与E2F相比,有着很大区别,但在它们DNA结合结构域的C端区域却有着顺序相似性。二级结构预测发现了这个顺序相似区域可能形成一种两亲螺旋,说明它们参与形成异二聚体。而许多已确定的转录因子,它们在形成二聚体时,并不需要相互结合的蛋白有这种序列相似性。这一点充分说明E2F-1和DP-1的DNA结合结构域可能组成一种全新的DNA结合结构。

DP-1也有其家族。迄今为止,已确定了有DP-2,DP-3的存在,并且它们已被克隆并进行了研究。

#### 四、E2F与pRb的相互作用 及G1到S期的过渡调控

E2F-1对G1期-S期过渡的调控主要是按下列方式进行的。pRb与E2F-1/DP-1异二聚体相结合,抑制了E2F-1/DP-1的转录激活作用。在G1的中后期去磷酸化的pRb被cyclinD/cdk4/6和cyclinE/cdk2所催化而磷酸化;导致了E2F-1/DP-1的释放。这种异二聚体与DHFR,TK,DNA聚合酶 $\alpha$ ,cdc2和C-myc等和S期DNA合成有关的基因启动子上的E2F位点结合,激活了它们的转录。使细胞进入S期,在S期cyclinA/cdk2催化E2F-1/DP-1的磷酸化,这种磷酸化导致了E2F-1,DP-1与上述基因启动子结合活性的丧失,使这些基因的转录又受到抑制。但E2F-1对细胞增殖控制的方式,可能远远不是这么简单。因为在E2F-1的活性被完全抑制的细胞或在缺乏E2F-1功能的小鼠中<sup>[11,12]</sup>,它们的生长发育很正常,DNA的合成速度及细胞周期的进程也不

受影响。说明,E2F家族在细胞周期的调控中存在着不同的路径。Lukas.J等人的研究成果的确说明了这一点。当分别向静止的细胞注入E2F-1、E2F-2、E2F-3时,它们都可单独诱导细胞进入S期。相反,异位表达与P107和P130相结合的E2F家族成员必须与DP-1一起才能使静止细胞进入S期。

异位的E2F-4和-5主要位于细胞质中。Geoffrey等人<sup>[6]</sup>发现编码p107,p130或DP-2的表达载体的共转化将导致E2F-4和-5在核中的定位。而且,E2F-4的转录活性也显著地提高。相反,当该蛋白从核中被释放出时,其活性随之降低。这意味着E2F-4的转录功能依赖于其细胞的定位。同时,当细胞经过G0期时内源E2F-4的核/细胞质的比例发生了变化,在G0期和G1早期比例很高,而接近S期时细胞质的比例明显提高。因此可以认为,细胞在G0期的滞留有赖于E2F-4在核中的浓度,而细胞的推进需要它从核中的排除。共转化的p107,p130利于E2F-4和E2F-5在核中的定位表明了它们在E2F-4和-5介导的转录抑制中扮演的重要角色。

#### 五、E2F与肿瘤的关系

当细胞被致癌病毒感染时,E2F的作用大体可能是如下方式。腺病毒E1A蛋白,SV40大T抗原和人类的乳头状瘤病毒蛋白的E7蛋白都能与pRb结合,从而阻断pRb与E2F-1/DP-1的结合。而它们参与分离pRb的区域都是使细胞无限增殖所必需的部分。因为pRb有抑制E2F-1/DP-1激活转录的作用,所以当致癌病毒蛋白与pRb结合,就使E2F-1/DP-1从pRb上释放下来。这使得病毒感染的细胞逃过了正常的生长控制。这个过程可见图2<sup>[3]</sup>。

事实上,E1a和SV40大T抗原除了肿瘤蛋白的功能外,当病毒自身复制,它们也有调控病毒和细胞基因表达的功能。它们必须克服E2F-1/DP-1/pRb的抑制作用。因为E2F-1/DP-1控制的基因都是病毒复制所必须的。当腺

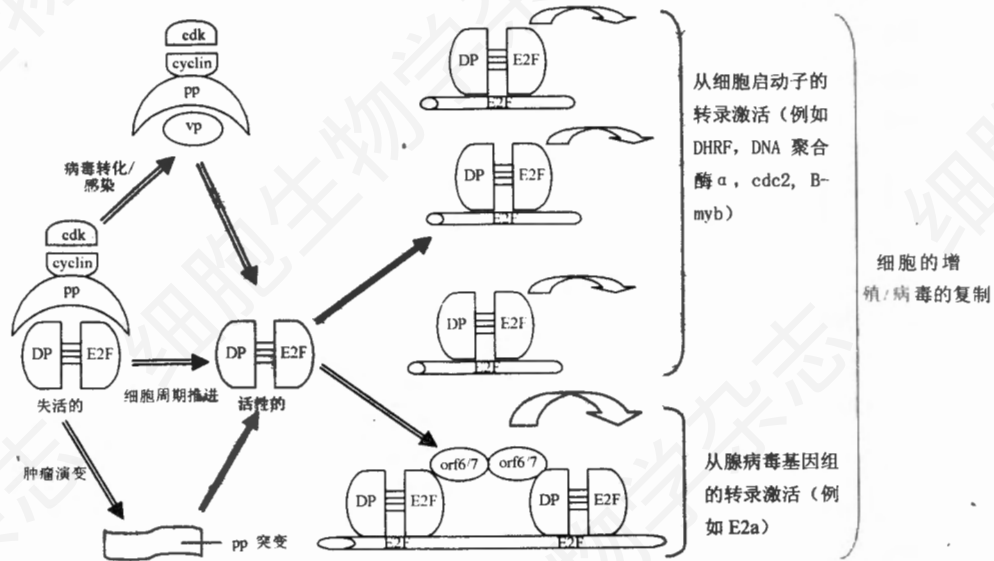


图2 E2F-1/DP1在细胞周期中的调控作用<sup>[13]</sup>

病毒感染时,另外一种调控作用是由病毒E4转录单位编码的orf6/7蛋白完成的。orf6/7可结合两个E2F-1/DP-1异二聚体,使得它们与DNA上存在的两个适当距离的E2F位点特异结合。由于这种启动子的方式在病毒基因组常存在,如E2a启动子,所以这种结合方式更加利于在感染细胞中腺病毒基因表达,从这一点上看orf6/7有点像是病毒编码的异二聚体。

正常的细胞中E2F情况如何呢? Singh等人发现在大鼠胚胎成纤维细胞中,E2F-1的过量表达会导致肿瘤的转化。这种转化被确定与转基因的E2F-1组成型高表达,以及依赖于E2F的基因的转录增加和E2F-1/DP-1与DNA结合的加强有关系。E2F-1的癌基因的潜在作用是依赖于它的DNA结合和转录激活结构域,而与pRb无关。这些结果均说明持续的E2F-1的表达失控会导致细胞增殖的失控。

从上述可看出E2F-1似乎是个癌基因,然而,人们也发现了与此相反的证据。首先,不像在许多肿瘤中都探测出了E2F-4的突变,Nakamura从406个癌症病人的DNA样品中利用PCR方法,在E2F-1与RB的结合结构域

内,未能探测出任何突变。特别值得提到的Yamasaki. L和Seth. J等人的工作<sup>[11,12]</sup>。他们将E2F-1结构基因的第3个外显子上插入PGK-neo盒,并使第四个外显子完全缺失。并通过杂交、自交的方法得到了纯种的E2F-1<sup>-/-</sup>小鼠。这种小鼠的E2F-1基因转录出的蛋白是没有E2F活性的。他们得到一种无E2F-1的等位基因的纯种小鼠。结果发现小鼠缺乏E2F-1后生长和繁殖都正常,只是有睾丸萎缩和外分泌腺的发育不良。但这种小鼠却产生了不常见的肿瘤。这个实验说明当缺乏E2F-1也会产生肿瘤;那么E2F-1的作用可能就是抑癌基因,这与以前发生的结果相比是一种新的发现。说明E2F-1在肿瘤发生和抑制方面都有作用。而这种作用发生主要依赖细胞内E2F-1的含量。

## 六、E2F-1与细胞凋亡(apoptosis)

在HBL-100细胞中,当抑止了内源性E2F-1的活性,使用显性负突变子在依赖四环素表达载体控制下,即使在培养基血清不足的情况下,这些负突变子的细胞也不会出现细胞

凋亡,而对照的细胞在 24 小时内就会出现死亡。说明 E2F-1 与细胞凋亡有关。这种阻止在某些免疫性缺陷的小鼠中会导致肿瘤,说明了 E2F-1 的肿瘤抑制作用,以及细胞凋亡与这种抑制的关系。而 Shan<sup>[14]</sup>等使用四环素控制的表达载体,在 Rat-2 或纤维细胞中过量表达细胞内源性 E2F-1。这种表达加速了细胞进入 S 期,但随后却会导致细胞凋亡。这种细胞凋亡的发生与 E2F-1 之间存在着剂量依赖性的关系。生长在低血清浓度的细胞对 E2F-1 的细胞凋亡诱导作用更敏感。这些结果说明存在着一条新的途径刺激细胞凋亡,它可能和不成熟的进入 S 期有关。

Shan. B<sup>[15]</sup>等使用酵母双杂交系统。分离了一些不能与 pRb 结合的 E2F-1 的点突变。序列分析可知在 E2F-1 与 pRb 结合的 18 个氨基酸残基内,五个残基 Tyr411, Glu419, Asp-leu-Phe423-425 是重要,在 E2F 家族中它们也是保守的。五个氨基酸的任一个突变都会导致 E2F-1 与 pRb 相结合能力的丧失。这些突变与野生型相比会加速细胞进入 S 期后随后的细胞凋亡,上述的结果都说明了 E2F-1 与细胞凋亡的关系。在我们前面提到过的 E2F-1<sup>-/-</sup>小鼠中,Field. S 等发现了这种小鼠胸腺的增大<sup>[11,12]</sup>,这种增大实际上是 T 细胞的过量的积累,造成这种现象的原因就是由于 T 淋巴细胞成熟阶段缺乏了细胞凋亡的功能。这个发现充分说明了 E2F-1 对细胞凋亡的调控功能。

## 七、E2F 活性的调控

E2F 看来是一个矛盾的集合体,它既可控制细胞的增殖,又能诱导细胞的凋亡;既能促进肿瘤的发生,又有抑制肿瘤发生的作用,既有转录激活作用,又有转录抑制作用。所有关于这些矛盾的解释,只能从两个方面入手,一是 E2F 的双重调节功能是相互独立的,二是 E2F 起什么调节作用与其量的水平有很大关系。Krek 等<sup>[16]</sup>的研究已证实,E2F-1 作为细胞周期过程

的调控因子和细胞凋亡的调控因子的作用是相互独立的。E2F-1 的转录激活机制我们已熟知,有关它的相反的一面远远不是我们所知道的那么简单,实际上,E2F-1 与 pRb 结合后可与含 E2F-1 位点的 DNA 相结合,这种结合将 pRb 带到了 DNA 上再与相邻启动子的转录因子结合,从而阻碍它们的基因转录,这种作用是一种主动的转录抑制作用,它与 E2F-1 的转录激活是相独立的。

第二个原因,可能与 E2F 的表达量有重要关系,E2F 的表达量在体内分别在转录水平、转录后水平受到调控。E2F-1 的启动子已被分离,它上面也含有 E2F-1 的识别位点。因此,在转录水平上 E2F-1 的启动子受到依赖于 E2F-1 本身的负反馈调控。在 G<sub>0</sub> 期和 G<sub>1</sub> 期结合了 pRb 的 E2F-1 通过与 E2F-1 启动子上的 E2F 位点结合而抑制转录。Johnson. P. G<sup>[17]</sup>的研究说明这个启动子还受到 P130 的抑制和 cyclin 依赖的蛋白激酶 D 的激活。当然,实际的控制可能要比现在知道的更为复杂,对 E2F 的表达调控可能存在着一个网络,这个网络至少包括一个癌基因(cyclinD1)和几个潜在的肿瘤抑制基因。

在转录后的水平上,E2F-1 主要是通过通过与 pRb 及相关蛋白结合而进行调控的。细胞内自由的 E2F-1 很少存在,原因就在于 E2F 转录后除了与 pRb 及相关蛋白结合外,自由的 E2F-1 常可被泛素-蛋白酶途径(Ubiquitin proteasome pathway)的水解作用所水解<sup>[18-19]</sup>。这种水解是在 E2F-1 的 C 末端的转录激活区,水解后的 E2F-1 将失去它的转录激活作用。但是 pRb 以及相关蛋白与 E2F-1 的结合可保护 E2F-1 免受这种蛋白酶的水解。这说明,细胞内存在这一种机制,调控 E2F-1 活性水平的稳定性,从而满足细胞的正常生理需要。

有关 E2F 的研究已取得了很大的进展。然而,要有更新的突破,就必须依赖于对 E2F 本身以及它与 DNA、pRb 等相结合的空间结构的了解。由于 E2F-1/DP-1 异二聚体与 DNA 的结

合可能是一种新的方式,所以对它们空间结构的研究完全可能提出一种全新的 DNA 与蛋白结合模式。除此以外,由于 E2F 在细胞周期调控,肿瘤发生,细胞凋亡以及抑制肿瘤等方面的重要作用,对于 E2F 的深入研究可能会导致关于这一系列事件分子机制的新突破。因此,关于 E2F 的研究具有重大的理论意义。

### 摘 要

转录因子 E2F 在细胞周期调控中起重要作用。E2F 的活性受到 pRb, 细胞周期素和细胞周期素依赖性激酶的控制。近年来,许多有关 E2F 研究的新进展揭示了 E2F 与肿瘤发生、细胞凋亡、肿瘤抑制等均有密切关系。

### 参 考 文 献

- [1] Imre K et al., 1986, *Cell*, **45**:219-228.  
 [2] Yee A. S. et al., 1989, *Mol. Cell Biol.*, **9**:578-585.  
 [3] Helin K et al., 1992, *Cell*, **70**:337-350.  
 [4] Kaelin W. G. et al., 1992, *Cell*, **70**:351-364.

- [5] Lees J. A. et al., 1993, *Mol. cell Biol.*, **13**(12):7813-7825.  
 [6] Geoffrey J. L. et al., 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **94**:5095-5100.  
 [7] Huber H. E. et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**(8):3525-3529.  
 [8] Girling R et al., 1993, *Nature*, **362**:83-87.  
 [9] La Thangue N. B., 1994, *Trends Biochem. Sci.*, **19**:108-114.  
 [10] Krek W et al., 1994, *Cell*, **78**(1):161-172.  
 [11] Field S. T. et al., 1996, *Cell*, **85**(4):549-561.  
 [12] Yamasaki L et al., 1996, *Cell*, **85**(4):537-548.  
 [13] Nicholas B and la Thangue., 1994, *Curret Opinion in Cell Biology*, **6**:443-450.  
 [14] Shan B and lee W. H., 1994, *Mol. Cell Biol.*, **14**(12):8166-8173.  
 [15] Shan B et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **93**(2):679-684.  
 [16] Johnson D. G., 1995, *Oncogene*, **11**(9):1685-1692.  
 [17] Krek W et al., 1993, *Science*, **262**:1557-1560.  
 [18] Hateboer G et al., 1996, *Genes Dev.*, **10**(23):2970-2980.  
 [19] Hofmann F et al., 1996, *Genes Dev.*, **10**(23):2949-2959.

## 真核基因转录与染色质修饰机制及转录因子间的关系

章正琰 薛社普

(中国医学科学院、中国协和医科大学 基础医学研究所 北京 100005)

真核细胞基因的转录调控是真核基因表达诸级调控中的重要环节,是当前在基因调控研究中最活跃的领域。基因的表达调控发生在不同层次上,即转录前的染色质结构水平上的调控,转录水平的调控,转录后调控及翻译水平的调控等。越来越多的实验证明,染色质的结构状态对 RNA 聚合酶 I 介导的转录作用具有调节作用。染色质基本结构单位是核小体,其核心是由组蛋白八聚体(H2A, H2B, H3, H4 各两个分子)和包绕于其外周的 DNA 链所构成,核心之间的连接部位(linker)是组蛋白 H1,它是与染色质凝集和折叠有密切关系的组分。组蛋白的

去磷酸化和去乙酰化,可引起染色质凝集和折叠。已知当基因包装于染色质内时,可抑制转录的发生,而转录激活因子至少可以部分抵消染色质组装因子所造成的转录抑制作用。因而,转录因子通过何种途径作用于处于阻抑状态的染色质模板,而核小体在启动子区域及其他转录调节区域发生何种变化以有利于转录等等便成为研究染色质结构和转录关系的热点之一。基因转录与染色质结构之间的关系甚为复杂,涉及染色质、RNA 聚合酶 I 复合物、染色质重修饰机制、染色质组装因子,以及组蛋白乙酰转移酶和去乙酰化酶等。