

功能由基因决定,受到核内遗传物质的控制。而细胞的决定和分化则是在不同的细胞质对细胞核的不断作用下,才能逐步进行。核质之间的相互作用先建立特定的基因表达状态,从而选择性表达发育调控基因或分化基因。发育调控基因产物一旦进入胞质,就可改变原来的基因表达环境,使细胞核进入新的基因表达状态,选择表达新的发育调控基因。如果新的发育调控基因的产物再影响细胞核,改变原来的基因表达状态,其它的发育调控基因的表达就可使胚胎细胞进一步分化。在发育过程中,细胞质和细胞核的这个相互作用不断进行,使控制发育程序的不同基因群在特定的时空中表达,受精卵分裂产生的子细胞才能不断决定和逐步分化,最后形成组成个体所必须的各种细胞类型。

参 考 文 献

- [1] Illmensee, K. and Mahowald A. P., 1974, *RNAS*, 71: 1016—1020.
- [2] Lehmann R., 1992, *Current Opinion in Genetics and Dev.*, 2: 543—549.
- [3] Lee E. et al., 1982, *Dev.*, 91: 163—170.
- [4] Poulson, D. Histogenesis, organogenesis and differentiation in *Drosophila melanogaster*, in *Biology of Drosophila* ed. by Demerec, M., Wiley, New York, 1950, pp. 168—274.
- [5] Nüsslein-Volhard C. et al. 1984, *Roux Arch. Dev. Biol.*, 193: 267—282.
- [6] Jurgens G. et al., 1984, *Roux Arch. Dev. Biol.*, 193: 283—295.
- [7] Wieschause E. et al., 1984, *Dev. Biol.*, 104: 172—186.
- [8] Nüsslein-Volhard C. and Wieschause E., 1980, *Natur.* 287: 795—801.
- [9] Anderson, K. V., 1987, *Trends in Genetics.*, 3: 91—97.
- [10] Anderson K. V. *Genes and Embryos* (Edited by Glover D. M. and Hames B. D.) 1989, pp. 1—38.
- [11] Zhao, D. B., 1993, *Chinese J. of Cell Biol.*, 15(1): 15—22.
- [12] Price, J. V. et al., 1989, *Cell*, 56: 1085—1092.
- [13] Roth, S. et al., 1989, *Cell*, 59: 1189—1202.
- [14] Ingham P. W., 1988, *Nature*, 335: 25—33.
- [15] Zhao, D. B., 1991, *Chinese J. of Cell Biol.*, 13(1): 12—20., 13(2): 57—64.
- [16] Doe, C. Q. and Scott, M., 1988, *Trends in Neurosci*, 11: 101—106.
- [17] St. Johnston, D. and Nusslein-Volhard, C. 1992, *Cell*, 68: 201—229.
- [18] Zhuang, X. H., 1990, *Chinese J. of Cell Biology*, 12(1): 1—5.
- [19] Lawrence P. A., 1992, *The Making of a Fly: The Genetics of Animal Design*. By Blackwell Scientific Publications.

高等真核细胞蛋白质磷酸化与细胞周期 G₁ 向 S 期过渡的调控

王瑞虹 薛绍白

(北京师范大学生物系 北京 100875)

真核生物细胞周期运行涉及三个时期过渡(Phase transitions)的调控:1. G₀ 向 G₁ 期过渡, 2. G₁ 向 S 期过渡, 3. G₂ 向 M 期过渡等的调控^[1]。近年来, 对调控 G₁ 向 S 期过渡的生化事件的研究结果表明, 转录和转录后水平上的

调控机制在其中起重要作用。通过磷酸化与去磷酸化而参与 G₁ 向 S 期过渡调节的蛋白主要有: pRB(retinoblastoma gene product, 视网膜母细胞瘤基因蛋白), p107(pRB related protein, pRB 相关蛋白), p53, RPA(replicati-

on protein A, 复制蛋白 A), 周期蛋白 A (Cyclin A), 周期蛋白 E (Cyclin E), p33^{cdk2}, 以及转录因子 E 2 F。

一、参与 G1 向 S 期过渡调节的 p 33^{cdk2} (cyclin-dependent kinase 2, 依赖周期蛋白激酶 2) 和周期蛋白

以人 HeLa 细胞和小鼠 NIH 3 T 3 细胞为模型发现, cdk 家族中的 cdk 2 mRNA 在晚 G 1 期或早 S 期出现, p 33^{cdk2} 的组蛋白 H 1 激酶活性亦在晚 G 1 期和早 S 期上升, 在 M 期下降。p33^{cdk2} 与周期蛋白 A 形成的复合物可以影响 DNA 复制^[2], 调控着高等真核生物细胞由 G 1 向 S 期过渡。

与调控 G 2 向 M 期过渡的 p 34^{cdc2} 相似, p 33^{cdk2} 的 Thr-14 和 Tyr-15 必需去磷酸化, 而 Thr-161 磷酸化, 且需与周期蛋白 A 结合, 之后才显示组蛋白 H 1 激酶活性。Thr-161 的磷酸化是由 CAK (p 34^{cdc2} activating kinase) 催化而成的。CAK 分子量约为 200 kD, 是爪蟾卵提取液中唯一具有激活 p 34^{cdc2} 和 p33^{cdk2} 的蛋白^[3]。CAK 的组成中初步证实含有与爪蟾 MO 15 基因产物相同或密切相关的蛋白质。在 CAK 的纯化制品中总是含 p 40^{M015}, 以抗 p 40^{M015} 抗体处理, 能抑制 CAK 活性^[3]。CAK 活性可被 PP 2 A (protein phosphatase 2 A, 蛋白磷酸酶 2 A) 抑制。cdk 家族 Thr-14 和 Tyr-15 的去磷酸化是由具磷酸酶活性的 cdc 25 家族承担。在体外, 以 cdc 25 M 2 (the homolog of human CDC 25 B) 处理, 能使与周期蛋白 A 或 B 1 结合的 p 33^{cdk2} 或 p 34^{cdc2} 的 Thr-14 和 Tyr-15 去磷酸化, 致使组蛋白 H 1 激酶活性提高 5—10 倍^[4]。

周期蛋白 A 的合成活动起始于 S 期初期。周期蛋白抗体具有抑制细胞 DNA 合成和进入 M 期的作用。周期蛋白 A 既能与 p 33^{cdk2} 结合; 也能与 p 34^{cdc2} 结合, 但前一复合物的激

酶活性出现在 S 期, 而后一出现在 G 2 期^[5]。脊椎动物周期蛋白 A 和 B 的亚细胞分布不同, 合成后的周期蛋白 A 很快在细胞核内积累, 而周期蛋白 B 先存在于细胞质, 于有丝分裂起步时突然向核内转移。周期蛋白 A 氨基末端即使缺失 100 个氨基酸残基, 不影响它的核定位, 也不影响它与 p 33^{cdk2} 结合和结合后的激酶活化。相反, 截除羧基末端 15 个氨基酸残基, 或是由于内源周期蛋白框 (cyclin box) 功能域的部分缺失, 均会导致周期蛋白 A 上述功能的丢失^[6]。

周期蛋白 A-p 33^{cdk2} 复合物具有与人胸腺嘧啶脱氧核苷激酶 (human thymidine kinase, htk) 基因启动子元件 (25 个碱基对) 结合的能力, 而后者在 G 1-S 期转录调控中起重要作用^[7]。

目前对细胞周期 D 和 E 也开始有所认识。人们普遍认为周期蛋白 E 与 DNA 复制有关, 而周期蛋白 A 似乎具有在周期蛋白 E 降解后取而代之的功效。周期蛋白 D 有 D 1、D 2 和 D 3 三类之分, 它们都在细胞生长并决定是否开始 DNA 复制 (为有丝分裂作出准备) 之际出现的。因此, 它们被视作生长因子感受器 (growth factor sensors), 协助细胞作出有丝分裂的决定。一旦细胞承诺 DNA 合成, 就意味着实现余下的细胞周期事件, 无需有生长因子刺激来激发并完成细胞分裂。这一现象引人深思, 因为癌特征之一正是如此, 它无需外源刺激, 自行决定分裂。已有不少研究小组证实: 周期蛋白 D 1 基因就是 bcl 1 癌基因 (B cell lymphoma gene); 周期蛋白 D 2 和 D 3 具阻止细胞分化的作用^[8,9]。

二、pRB, p 107 与 G 1 向 S 期过渡的调控

pRB 参与细胞周期运行的调控。在晚 G 1 期, S 期, G 2 期和 M 期, pRB 均处于磷酸化状态, 而于细胞由 M 再跨入 G 1 期时, pRB 被去磷酸化。在缺失野生型 RB 的早 G 1 期细

胞内注入纯 pRB, 可产生一种可逆的 G1 期阻断现象: 如在越过中 G1 期的胞内注入 pRB, 则不仅不出现 G1 期阻断, 也不影响 DNA 合成。早 G1 期细胞为 pRB 敏感阶段, 正是在其 pRB 开始磷酸化之前。在晚 G1 期, pRB 是周期蛋白-CDK 复合物的一个关键底物, 它究竟是被周期蛋白 D-CDK 还是周期蛋白 E-CDK 磷酸化还有待证实; 在 S 期 pRB 是被周期蛋白 A-cdk 2 磷酸化。虽然 pRB 被视作调控细胞增殖的关键之一, 但 RB mRNA 的表达却不受细胞状态的影响, 在快速分裂的细胞中有表达, 在静止细胞中亦是如此^[10]。

pRB 导致产生 G1 期阻断的机制是: 1. pRB 专一地与 E2F 结合, 使 E2F 激活转录的能力丧失, 未能提供实现 S 期所需的基因产物; 2. pRB 未被磷酸化。

pRB 与许多病毒癌蛋白结合, 包括腺病毒 E1A, SV40 和多瘤病毒大 T 抗原以及细小病毒 E7 蛋白等^[11], 这种结合具抑制 pRB 阻止细胞增殖的作用。pRB 还能通过延缓周期蛋白 A, E 和 D1 mRNAs 的表达, 致使 pRB 未能磷酸化^[12], 使细胞周期的运行受阻断。

p107 是 pRB 相关蛋白, 也能与 E1A 和 SV40 大 T 抗原结合。根据所克隆到的 cDNA 及测序结果表明, p107 与 pRB 非常相似, 由此推测它们具有作为肿瘤阻遏基因共有的功能。p107 也是一种磷蛋白, 并依赖于细胞周期。如同 pRB, 其核心结构也是由一个间隔区连结两个功能域而组成。pRB 的核心区包括 400 个左右氨基酸残基, 间隔区约为 75 个氨基酸残基, 被分隔的两个功能区可独自与大 T 抗原、E1A 等蛋白结合。以 p107 间隔区或其它无关序列取代该 75 个氨基酸残基组成的间隔区, 并不影响上述功能区的这种结合功能^[10]。p107 核心区含大约 600 个氨基酸残基, 间隔区约为 200 个氨基酸残基, 可与 pRB 的间隔区置换而不影响两个功能区与大 T 抗原和 E1A 的结合, 但丧失了与周期蛋白 A 结合的能力^[13]。

由于 p107 具有与周期蛋白 A 专一结合的能力, 反映了 p107 具调控细胞周期的重要功能。在 G1 期的人体细胞中, pRB 与 E2F 形成复合物, 而进入 S 期, 则形成 E2F-p107-周期蛋白 A 复合物。实际上, 在 E2F-p107-周期蛋白 A 复合物中尚含 p33^{cdk2}^[14]。在人 TK 的启动子上已发现有 p33^{cdk2}-周期蛋白 A-p107 复合物结合^[8]。

三、E2F 与 G1 向 S 期 过渡的调控

E2F 是胞内 DNA 结合蛋白, 分子量 60 kD, 一种转录活化因子^[15]。在 F9 细胞中发现具类似 E2F 的转录因子, 称作 DRTF1, 它们均与 DNA 中 5'-TTTSSCGC-3'(S=G,C) 顺序结合^[16], 其中第 1, 2 位和最后一位碱基的变化并不影响它们与 DNA 的结合, 但亲和力降低。目前已获得一些 E2F 的 cDNA 克隆^[17]。

参与 DNA 结合的区域为含有碱性 helix-loop-helix 的结构域, 显示以二聚体的形式发挥作用。C-末端的 69 个氨基酸残基构成一个具有酸性结构域特征的转录活化结构域; 有趣的是与 Rb 结合的结构域被包含于转录活化结构域中, 因此, Rb 与 E2F 结合能阻断转录活化结构域的功能, 进而干扰 E2F 活化的转录能力。

E2F 能与一些在中、晚 G1 期被激活的基因的启动子结合, 包括 DHFR (Dihydrofolate reductase, 二氢叶酸还原酶)、TK (Thymidine kinase, 胸腺嘧啶激酶)、DNA 聚合酶 α 、cdc 2、胸腺嘧啶核苷合成酶和 c-myc 等基因。

DHFR 启动子有两个能与 E2F 结合的位点, 相互重叠, 介于 DHFR (小鼠的) 启动子 -8 到 +1 的区间中, 并有一个参与位点识别的起始片段 (-3 到 +5), 对提高 DHFR 的转录是必需的。在 DNA 聚合酶 α 基因启动子上也存在类似于 E2F 专一结合的序列 GTTGGCGC,

这与 G_1/S 期交界时聚合酶 α mRNA 的增加有关。

TK mRNA 水平于 G_1/S 期交界处增加。SV 40 病毒转染可激活 TK 启动子, 使转录增加 3—4 倍^[19]。p33^{cdk2}-cyclin A-p107-E2F 复合物可以与 TK 基因启动子上的一个 25 bp 顺序结合, 刺激该基因于 G_1/S 期交界处表达。TK 启动子上 E2F 结合位点的突变, 破坏了 S 期的专一结合, 使血清丧失调控该人 TK 基因启动子的能力^[7]。

cdc 2 mRNA 水平亦是于 G_1/S 期交界处增加。cdc 启动子上 E2F 结合位点的突变, 也使得 cdc 2 转录速率受抑, 如同培养液中未加血清的细胞表现, 所以 E2F 对 cdc 2 基因的调节也很重要。

E2F 同样也调节着 c-myc 的转录活动^[20]。c-myc 的 E2F 结合位点在 -58 和 -65 之间, p2 启动子的上游。以血清刺激静止细胞, 4 小时后的 c-myc 转录增加 3 倍。

胸腺嘧啶核苷合成酶, 核糖核苷还原酶, cyclin A 等基因均也在 G_1/S 相交处被激活, 且在它们的启动子区都至少有一个 E2F 结合位点。

E2F 的水平随细胞周期而变。在静止的 3T3 细胞、T 细胞或小鼠肝细胞中几乎没有 E2F-1 mRNA; 经血清刺激 3T3 细胞, 或有丝分裂素刺激 T 细胞, 或部分肝切除之后的肝脏细胞, E2F-1 mRNA 水平均于 G_1/S 期交界处的上述细胞中增加。

在 G_1 期, E2F 与低磷酸化状态的 pRB 结合。随着晚 G_1 期 pRB 被高度磷酸化, E2F 就被释放, 导致激活基因的转录活动^[21]。故 E2F 具以下功能: 1. 大量表达可以刺激细胞开始 DNA 合成^[22]; 2. 与 pRB 结合起抑制细胞生长的作用; 3. 于 G_1/S 期交界处, E2F/p107/cyclin/cdk 2 复合物形成, 并与启动子联系在一起, 磷酸化起始复合物中的一个因子而刺激转录, 磷酸化底物之一可能就是复制蛋白 A(RPA)中 34 kD 组分^[23]。

四、p53 与 G_1 向 S 期过渡的调控

野生型 p53 为磷酸化蛋白质, 具抑制肿瘤和调节细胞增殖的功能, 表现在: 1. 抑制细胞增殖, 使细胞停滞在 G_1 期; 2. 诱导细胞凋亡 (Apoptosis); 3. 诱导细胞分化。

p53 虽为胞内磷酸化蛋白, 但其磷酸化是否为细胞周期依赖性还有待确证。酪蛋白激酶 II (Casein kinase II) 具体外磷酸化 p53 C-末端丝氨酸的作用, p34^{cdc2} 具磷酸化 p53 312 位丝氨酸的作用, 而双链 DNA 激活的蛋白激酶 (DNA-PK) 具磷酸化 p53 中的 7 和 18 位丝氨酸的作用。

最近的研究揭示, p53 阻断细胞于 G_1 期与其参与转录和 DNA 修复相关。在 DNA 发生损伤时, p53 可以产生信号刺激 DNA 修复, 直到修复完成。如果 DNA 损伤不能得到有效修复或出现畸型 DNA 复制, p53 就诱导细胞凋亡。p53 参与转录的调节有几种方式: 1. 与 p53 反应元件片段结合, 刺激转录, 如野生型 p53 与 p53 反应元件结合, 引起 WAF1/CIP1 (wild-type p53-activated fragment 1/cdk-interacting protein) 的表达, 后者可以直接与 cdk 2 结合, 抑制 cyclin-cdk 2 复合物的酶活性, 从而使细胞停滞在 G_1 期^[6]。2. 在不含有 p53 反应元件的基因上则与 TATA box 结合, 抑制这些基因的转录, 如 c-fos, c-jun, RB, int-6, PCNA 及 p53 自身等基因^[24]。p53 也可结合于 TK 基因的启动子上^[25]。3. 与 RPA 作用, 抑制其 DNA 复制功能^[26]。此外, p53 也具抑制 cyclin A 表达的作用^[27]。

综上所述, 表明细胞周期由 G_1 向 S 期过渡的调控机制很复杂, 而这一调节对于控制细胞的增殖发挥着重要的作用。正常细胞的 G_1 期可视作为功能性阶段, 细胞可以分化或增殖, 多方面定向, 而癌细胞的增殖失控, 复制出现时空偏差。因此揭示细胞 G_1 期向 S 期过

渡调控的秘密,有可能为找到细胞周期正常调控与异常调控的差别,以及为阐明癌变及治疗肿瘤奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Lalande M., 1990, *Exp. Cell Res.*, 186: 332—339.
- [2] Resenblatt J. et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 2824—2828.
- [3] Soloman MJ. et al., 1993, *The EMBO J.*, 12: 3133—3142.
- [4] Sebastian B. et al., 1993, *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 3521—3524.
- [5] Pagano M. et al., 1992, *The EMBO J.*, 11: 961—971.
- [6] Maridor G. et al., 1993, *The Journal of cell Science*, 106: 535—544.
- [7] Li J-L. et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 3554—3558.
- [8] Marx J. 1994, *Science*, 263: 319—321.
- [9] Hunter, T. 1993, *Cell*, 75: 839—841.
- [10] Hollingsworth RE. Jr. et al., 1993, *current Opinion in Genetics and Development*, 3: 55—62.
- [11] Dyson N et al., 1989, *Science*, 243: 934—937.
- [12] Hinds PW. et al., 1992, *Cell*, 70: 993—1006.
- [13] Faha B., et al., 1992, *Science*, 255: 87—90.
- [14] Cao L. et al., 1992, *Nature*, 355: 176—179.
- [15] Kovcsdi I. et al., 1986, *CELL*, 45: 219—228.
- [16] Nevins JR., 1992, *Science*, 258: 424—429.
- [17] Helin K. et al., 1992, *Cell*, 70: 337—350.
- [18] Slansky JE. et al., 1993, *Mol. Cell. Biol.*, 13: 1610—1618.
- [19] Roehl HH, et al., 1993, *J. Virol.*, 67: 4964—4971.
- [20] Moberg KH. et al., 1992, *Oncogene*, 7: 411—421.
- [21] Sherr, C. J., 1994, *Trends in Cell Biology*, 4: 15—18.
- [22] Johnson DJ. et al., 1993, *Nature*, 365: 349—352.
- [23] Cardoso MC., et al., 1993, *Cell*, 74: 979—992.
- [24] Seto E. et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 12028—12032.
- [25] Yuan J-N, et al., 1993, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 191: 662—668.
- [26] Dutta A. et al., 1993, *Nature*, 365: 79—82.
- [27] Yamamoto M. et al., 1994, *Exp. Cell Res.*, 210: 94—101.

高等植物中外源基因表达的转录后调控

李 红 白永延

(中国科学院上海植物生理研究所 200032)

高等植物中基因表达与调控的分子机制是细胞和分子生物学的重点之一,随着植物基因克隆技术以及基因转化系统不断完善,在高等植物中,外源基因可以通过根癌农杆菌或直接基因转移导入高等植物细胞并再生新的植株,转入的基因存在于每个植物细胞中并能遗传。因此转基因植物成为进一步研究基因表达调控的重要手段和对象,这方面的突破与进展有助于人们将更多的外源基因引入到经济作

物中去并获得高表达、稳定遗传的转化植物。

在早期的遗传转化工作中,提高和稳定外源基因表达的研究大多集中在转录水平的调控(例如在外源基因的5'末端连接强启动子,在3'末端连接有效的终止信号)。这当然因为转录过程的调控是基因表达调控中最为重要的一环,转录能否开动是基因能否表达的决定性一步。但是,对于基因的整体表达过程,它包括转录、初级转录产物的加工、运输、mRNA的翻译