

CDKs 功能的分子结构基础

王彦明* 左嘉客

(上海市计划生育科学研究所 200032)

真核细胞的细胞周期主要由一些相关联的 Ser/Thr 蛋白激酶所调控, 它们都包含有一个催化亚单位 CDK (cyclin-dependent kinase) 和一个调节亚单位周期蛋白 (cyclin)。细胞周期中的重要事件, 如细胞生长, DNA 复制以及细胞分裂都分别受不同的 cyclin-CDK 复合物

调节。例如, 在 G1 相, 由 cyclinD-CDK4 和 cyclinD-CDK6 调节细胞生长; 在 G1/S 过渡期和 S 相, cyclinE-CDK2 和 cyclinA-CDK2 调节 DNA 复制; 在 G2 和 M 相, 由 cyclinA-CDK1 (cdc2) 和 cyclinB-CDK1 调节细胞分裂 (见表 1)。

表 1 CDK 的主要特性及其细胞功能

| CDK | 分子量(KD) | 调节亚单位 | CKI | 主要的细胞功能 |
|---------|---------|----------------------|--|-----------------------|
| CDK 1 | 34 | Cyclin B Cyclin A | p 21 ^{WAF1/OIP1} | 启动有丝分裂 |
| CDK 2 | 33 | Cyclin A Cyclin E | p 21 ^{WAF1/OIP1} p 27 ^{KIP1} | 调节 DNA 复制 pRb 的磷酸化 |
| CDK 3 | 36 | ? | ? | 调控 G1 相 |
| CDK 4 | 34 | Cyclin D | p 21 ^{WAF1/OIP1} p 27 ^{KIP1} p 16 ^{INK4} p 15 ^{INK4B} | pRb 的磷酸化 |
| CDK 5 | 35 | p 35 Cyclin D ? | p 21 ^{WAF1/OIP1} | 参与脑细胞代谢作用 |
| CDK 6 | 40 | Cyclin D | p 16 ^{INK4} p 15 ^{INK4B} p 18 | pRb 的磷酸化 |
| CDK 7 | 42 | Cyclin H | ? | 激活其他的 CDK |
| p58-GTA | 50-100 | ? | ? | 抗增殖 |

一、CDKs 功能研究的概况

单独的 CDKs 亚基是没有蛋白激酶活性的, cyclin 与之结合可使 CDK 激酶活性部分活化。已知 Cyclins 有许多种, 组成了一个蛋白质家族, 其相对分子量在 30 KD 到 45 KD 之间 (长约 200 到 400 个氨基酸), 均具有一个 cyclin box。CyclinA 和 cyclin B1 尚具有一个 destruction box。Cyclin box 介导 cyclin 和 CDK 之间的结合, destruction box 为依赖泛蛋白的蛋白酶识别位点。Cyclin box 在

cyclinA, B, D 和 E 之间的相似性约为 30--50%。CDKs 也构成一个蛋白质家族, 从 CDK 1 到 CDK 7 之间的同源性约为 40—75%, 均含有一个约 300 个氨基酸的保守性催化核心, 与其他真核细胞蛋白激酶相似。

Cyclin-CDK 复合物的完全活化还得依赖激酶 CAK (CDK-activating kinase) 和特定磷酸酯酶。前者将 CDK 分子 T-loop 上 Thr 160/161 残基磷酸化^[1], 后者将 CDK N 末端 ATP 结合区域的 Thr 14 和 Tyr 15 两个残基去磷酸化。在细胞周期 G2 相时, Thr14 和 Tyr15

* 中科院上海细胞生物学研究所研究生

磷酸化水平升高,与 cyclinB 量的升高大致平行^[2];在 G2 相末, Thr14 和 Tyr15 去磷酸化,届时 cyclinB-CDK 1 复合物的激酶活性急剧升高,促使细胞进入 M 相。

Cyclin-CDK 复合物形成及活性调节的机制是极其复杂而精细的,涉及到多种激酶和磷酸酯酶的复杂相互作用。促进 CDK Thr160/161 磷酸化的 CAK 本身就是一种新确定的 cyclin-CDK 复合物,由一种 CDK 相关蛋白 MO 15(CDK7)^[3,4] 和一种 cyclin (cyclinH) 组成^[5]。在海星、爪蟾和哺乳动物中, cyclin-H-CDK7 复合物能够迅速促使 CDK 1-cyclin-A/B 复合物中 T-loop 的 Thr160/161 磷酸化。Cyclin-CDK 复合物中 Thr 14 和 Tyr15 的磷酸化和去磷酸化,也由相应的激酶和磷酸酯酶调节。在裂殖酵母(*S.pombe*)中, Wee1 是使 Tyr 15 磷酸化的激酶,由于 Wee1 能使多肽底物的 Thr 和 Tyr 均磷酸化,曾认为它是一种具双重专一性的激酶,负责 Thr14 和 Tyr15 的磷酸化。有趣的是,体外实验证实 Wee1 只具有磷酸化 Tyr15 的作用,因此推测存在另外一种能够促使 Thr14 磷酸化的激酶。CDC-25 是一种具双重专一性的磷酸酯酶,负责 Thr14 和 Tyr15 的去磷酸化,从而提高 cyclin-CDK 复合物的活性。CDC25 的磷酸酯酶活性于 M 相迅速升高^[6]。在临近 M 相时,导致 CDC25 磷酸化的激酶被活化,而导致它去磷酸化的酯酶被抑制。越来越多的现象表明,活化 CDC25 的激酶可能就是 cyclinB-CDK1, 它们两者之间相互作用形成的正反馈机制可以用来解释 M 相成批 CDK 1 去磷酸化和活化的原因。

CKIs(CDK inhibitors)是调节 CDK 活性的另一类重要因子,对 cyclin-CDK 起抑制作用(见表 1)。到目前为止,所发现的 CKIs 可归为一个大家族,分别在细胞周期的相应时相中起作用。

二、晶体结构研究

CDKs 所固有的那种复杂而精细的调节机

制,以及 cyclin-CDK 复合物在细胞生长、DNA 复制、有丝分裂和减数分裂过程中所承担的重要角色,使 CDK 家族成为蛋白结晶图谱学研究中的一个重要对象。

1. 催化亚基 CDK2 晶体结构

1993 年, De Bondt 等解析了人催化亚基 CDK2 晶体结构^[7],为理解 CDKs 功能的调节机制奠定了基础。CDK2 主要参与细胞周期 G1 到 S 相过渡的调控,其晶体结构显示它由两叶组成:较小的 N 端叶(N-terminal lobe)包括 5 个反平行的 β -折叠片层结构和一个大的 α -螺旋($\alpha 1$); C-端叶(C-terminal lobe)包括一个假四 α -螺旋($\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 6$), 一个小的 β -带($\beta 6$ - $\beta 8$), 以及另外两个 α -螺旋($\alpha 5$ 、 $\alpha 7$)。在 α -螺旋、 β -折叠或者它们两者之间有 12 个连接区域(L1-L12)。经比较,发现 CDK 的这些核心结构(包括 β -折叠和 α -螺旋束结构),与 PKA 的非常相似。ATP 结合位点、催化中心及镁离子螯合位点均处在两叶之间的催化裂缝中(见图 1)。

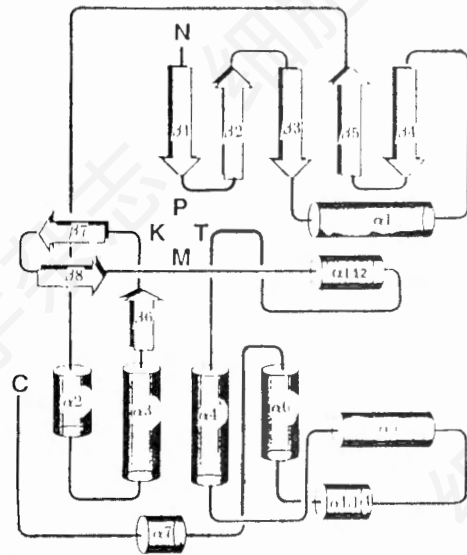


图 1 CDK 2 二级结构模式图

(引自 De Bondt, H.L. et al., 1993, Nature, 363:597)

K 为催化位; P 为磷酸锚着点; M 为 Mg^{2+} 螯合位点; T 为 Thr 160。

通过与 PKA 结构的比较, 揭示了 CDK2 为何必须与 cyclin 结合后才具备活性的两个主要原因: 首先, 在 cyclin 未结合的情况下, CDK 催化亚单位催化裂缝中 ATP 的 β - γ 磷酸键处于一种无法被底物羟基亲核攻击的状态; 其次是其 T-loop(第 146—166 残基)在催化裂缝处形成一种空间障碍, 影响了底物接近 CDK 的催化位点。CDK2 与 PKA 结构的主要差别在于 CDK2 的 L12 连接区中有一个小的 α -螺旋, 称为 α L12(第 146—151 残基), 是 CDK2 所特有的, 它将 ATP 结合位点和 T-loop 维系在一起。De Bondt 等人预测, cyclin 的结合能抵消 α L12 的上述影响, 使 T-loop 离开催化部位, 届时 ATP 结合区的构象类似于 PKA 的。

在 CDK2-Mg²⁺ATP 复合物的晶体三维结构图谱上, ATP 在两叶之间裂缝处与氨基酸残基结合, 即其嘌呤碱基被结合在位于小叶的 β -折叠和连接 β 5、 α 2 的 L7 环的一个疏水性口袋中, ATP 的磷酸基团与 Lys33、Asp145 以及 β 1 和 β 2 之间富含甘氨酸的一段环状连接区形成离子键和氢键结合。每个磷酸残基提供一个氧与镁离子结合。根据 CDK2-Mg²⁺ATP 复合物中 γ 磷酸基团的位置, 推测蛋白底物可能结合在两个叶片间的裂缝处, 以便使底物羟基能靠近 ATP 的 γ 磷酸基团。令人感兴趣的是, CDK2 结合蛋白底物的核心区域几乎完全被一个大环 T-loop (包括 Thr160 磷酸化位点在内)所掩盖, 使得底物无法靠近 CDK2 催化位点。CDK 的抑制性磷酸化位点 Thr14 和 Tyr15 位于 β 1 和 β 2 折叠间富含甘氨酸的 L2 环中部, 由于 Thr14 的羟基和 ATP γ -磷酸基团靠得很近, 所以该位点的磷酸化会直接影响 ATP 结合; 相形之下, Tyr15 的羟基与 ATP 相隔较远, 因此, 还不清楚这个部位的磷酸化是否会对 ATP 的结合产生影响。激活性磷酸化位点 Thr160 位于 T-loop 上, 它的磷酸化可能有利于解除 T-loop 的抑制作用。通过突变研究证明, CDK2 N 端叶几个氨基酸簇的

突变都会影响到 cyclinA 的结合, 所以 N 端可能与 cyclinA 形成多位点的相互作用。

2. CyclinA-CDK2 复合物晶体结构

1995 年, Jeffrey 等人通过解析部分活化的 cyclinA-CDK2 复合物晶体结构^[8], 对 De-Bondt 早先的一些推测给予了有力的支持。为得到稳定的 cyclinA-CDK2 复合物晶体, 他们首先对 cyclinA 的 N 端进行了部分降解, 获得了一个易于结晶的稳定的 cyclinA 蛋白结构域 (29KD, 残基 173—432)。这一片段, 含有 cyclin 家族所共有的 cyclin box 序列, 保留了 cyclinA 与 CDK2 结合并部分激活 CDK2 的功能。由于 CDK2 T-loop 上的 Thr160 残基未被磷酸化, 所以该复合物只具有部分的活性。经分析, 其结合 ATP 的方式与 PKA 极其相似, T-loop 离开催化裂缝, 暴露催化部位, 利于底物结合; Thr160 处在易被磷酸化的位置上, 这可能是 CDK2 结合 cyclin 后才能被 CAK 磷酸化的原因; Thr14 和 Tyr15 进一步移向催化裂缝, 如果它们被磷酸化, 会阻碍 ATP 的 γ -磷酸基团转移到底物上。

为何 CDK 结合 cyclin 后会发生上述的这些变化的呢? 经丙氨酸扫描(alanine scanning)和定点突变分析证明, CDK T-loop 和 α 1 螺旋上的 PSTAIRE 区域(16 个氨基酸的保守序列)起了非常重要的作用。PSTAIRE 区域决定着 cyclin 和 CDK 之间的结合。cyclin 主要结合在 CDK 的 N 末端, 其 α 3 和 α 5 螺旋通过疏水作用以及在 PSTAIRE 的两端形成氢键结合 CDK。这种结合引起下列后果: 导致 PSTAIRE 旋转 90°左右并迁入催化部位; 改变 N 端叶的包装态; 使 α L12 螺旋解开; 更为重要的是 PSTAIRE 区的构象被重新调整, 使 β - γ 磷酸键处于一种适于底物进行亲核攻击的状态(见图 2)。

在完全活化的 CDK 激酶中, Thr160 被磷酸化。该位点被磷酸化后就可与 CDK C 端叶的一些碱性氨基酸残基间形成离子键, 以稳定 T-loop 改变构象后的位置, 届时的状态与

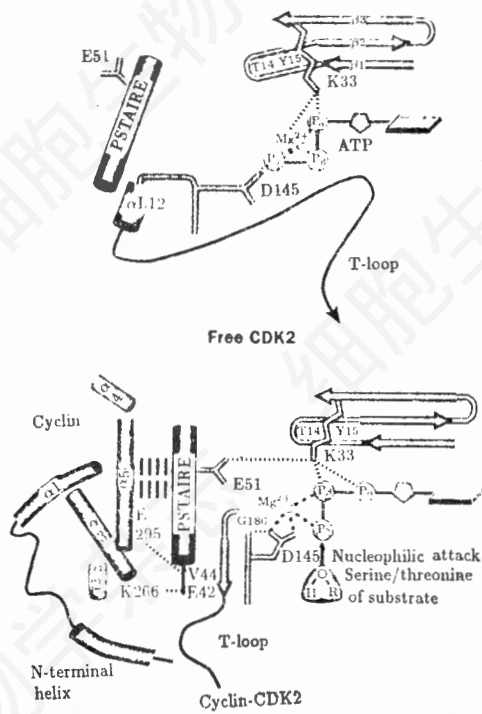


图2 结合 cyclinA 前后的 CDK2 催化活性区的构象模式图

(引自 Pines, J., 1995, *Nature*, 376: 294)

PKA 更为相似；另外，磷酸化的 Thr160 通过离子键与 cyclin 相互作用，使 cyclin-CDK 复合物结构更为稳定。

3. CyclinA 结构的概貌

CyclinA-CDK2 复合物晶体结构的分析，使我们对 cyclin 的结构有了进一步的认识。残基 173—432 组成的 cyclinA 片段是由 12 个 α 螺旋组成的球形结构，它具有两段分别由 90 个左右的氨基酸(残基 208—303 和残基 309—399)形成的相似折叠。每个折叠包括一个右手性三 α 螺旋束 ($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ ； $\alpha 1'$ 、 $\alpha 2'$ 、 $\alpha 3'$)，另外两个 α 螺旋 ($\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ ； $\alpha 4'$ 、 $\alpha 5'$) 靠在螺旋束的一侧。该两个重复结构非常相似，其 90 个氨基酸中的 78 个氨基酸残基 C_{α} 原子能相互重叠。除了上述两个重复结构的 10 个 α 螺旋外，还有一个 N 端 α 螺旋和一个 C 端 α 螺旋。cyclin box(残基 209—310)包

含 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 和 $\alpha 5$ 螺旋，是 cyclinA 与 CDK 2 相互作用的重要组份。CyclinA 结构很保守，例如，人 cyclinA 的第一个重复结构与青蛤 cyclinA 的具有 78% 的同源性。值得注意的是，第二个重复结构虽然与 cyclin box 仅有 12% 的序列一致性，却与 TFIIB 和 Rb 蛋白家族中出现的这类重复结构非常相似^[9]。

综上所述，我们不难理解，CDK 可通过下列途径被激活或被抑制：(1) CDK 只有结合 cyclin 才能被活化；(2) CAK 能催化 cyclin-CDK 复合物 T-loop 上 Thr 160/161 磷酸化，使酶活化；(3) 抑制性磷酸化位点 Thr 14 和 Tyr 15 的磷酸化和去磷酸化由激酶 WEE 1 和酯酶 CDC25 分别实现的，从而调节着 CDK 的功能；(4) 通过泛蛋白介导的蛋白酶水解途径，可使活化的 cyclin-CDK 复合物中的 cyclin 降解，从而使 CDK 的激酶活性消失；(5) CDK 抑制因子(CKI)结合活化形式的激酶，形成 cyclin-CDK-CKI 复合物，也是一种使酶失活的另一途径。

参 考 文 献

- [1] Fisher, R. P. and D. O. Morgan, 1994, *Cell*, 78: 713—724.
- [2] Krek, W. and E. A. Nigg, 1991, *EMBO J.*, 10: 305—316.
- [3] Fesquet, D. et al., 1993, *EMBO J.*, 12: 3111—3121.
- [4] Poon, R. Y. C. et al., 1993, *EMBO J.*, 12: 3123—3132.
- [5] Parker, L. L. and H. Piwnica-Worms, 1992, *Science*, 257: 1955—1957.
- [6] Dunphy, W. G., 1994, *TICB*, 4: 202—207.
- [7] De Bondt, H. L., 1993, *Nature*, 363: 595—602.
- [8] Jeffery, P. D., 1995, *Nature*, 376: 313—320.
- [9] Gibson, T. J. and J. D. Thompson, 1994, *Nucleic Acids Res.*, 22: 946—952.