

孪蛋白与真核生物DNA复制起始

代尚昆[#] 贺晓艳[#] 刘硕硕[#] 邓磊 王碧莹 范丽菲^{*}

(内蒙古大学生命科学学院, 呼和浩特 010021)

摘要 真核生物DNA复制起始受多种协同机制的严格调控, 以保证DNA复制起始在每个细胞周期内仅发生一次。其中, 孪蛋白(Geminin)介导的一系列对DNA复制起始抑制的机制为高等真核生物所特有, 对真核生物遗传物质忠实、稳定的传递至关重要。该文以孪蛋白与真核生物DNA复制起始的关系为核心, 简要介绍了真核生物DNA复制起始的过程以及孪蛋白的结构、时空调控, 详细论述了目前发现的孪蛋白参与真核生物DNA复制起始调控的途径及其机制, 对前人的研究成果进行了总结, 并提出了一些关于未来孪蛋白研究方向的思考。

关键词 孪蛋白; DNA复制起始; 调控途径; 分子机制

Geminin and Eukaryotic DNA Replication Initiation

Dai Shangkun[#], He Xiaoyan[#], Liu Shuoshuo[#], Deng Lei, Wang Biying, Fan Lifei^{*}

(School of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China)

Abstract To ensure the initiation of DNA replication occurs only once per cell cycle, the initiation of DNA replication of eukaryotes is strictly regulated by multi-cooperative mechanisms. One mechanism is the Geminin mediated inhibition of DNA replication initiation, which is limited to higher eukaryotes and is vitally important for the faithful and stable transition of genetic material. Here, focusing on the relationship between Geminin and eukaryotic DNA replication initiation, we simply introduce the process of eukaryotic DNA replication initiation and the structure, spatio-temporal regulation of Geminin. Additionally, we detailedly discuss the way and mechanism of how Geminin regulates or inhibits eukaryotic DNA replication initiation. At last, we briefly summarize the opinions displayed and raise several questions about Geminin and eukaryotic DNA replication initiation, which require further researches and explorations.

Keywords Geminin; DNA replication initiation; regulatory pathway; molecular mechanism

真核生物的DNA(deoxyribonucleic acid, DNA)复制, 起始于染色体上的多个DNA复制起始位点(DNA replication origins), DNA复制起始过程可以人为地划分为两个独立的步骤: 解旋酶装载[(helicase loading), 又称执照过程(licensing)]以及解旋酶激活(helicase

activation)^[1]。首先, 当细胞进入G₁期后, ATP结合的DNA复制起始位点识别复合体(origin recognition complex, ORC)识别并定位到DNA复制起始位点上, 然后募集ATP结合的Cdc6(cell division cycle 6), 两者共同组装成ORC-Cdc6复合体。然后, 通过ORC与

收稿日期: 2015-07-27 接受日期: 2015-09-14

内蒙古自然科学基金(批准号: 2013MS0505)、内蒙古大学高层次人才科研任务启动费(批准号: 30105-125128)、中国博士后科学基金第7批特别资助(批准号: 2014T10237)和内蒙古自治区高等学校科学研究项目(批准号: NJZY14005)资助的课题

[#]共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0471-4992971, E-mail: lifei.fan@imu.edu.cn

Received: July 27, 2015 Accepted: September 14, 2015

This work was supported by the Natural Science Foundation of Inner Mongolia (Grant No.2013MS0505), Program of Higher-Level Talents of Inner Mongolia University (Grant No.30105-125128), China Postdoctoral Science Foundation Funded Project (Grant No.2014T10237) and Higher Scientific Research Project of Inner Mongolia Autonomous Region (Grant No.NJZY14005)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-471-4992971, E-mail: lifei.fan@imu.edu.cn

网络出版时间: 2015-12-11 14:44:17 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20151211.1444.002.html>

Cdc6之间的相互作用募集两个Cdt1(cdc10-dependent transcript 1)/Mcm2-7(minichromosome maintenance 2-7)复合体, Cdc6结合的ATP的水解导致Mcm2-7双六聚物分别装载到复制起始位点上, 从而形成前复制复合体(pre-replication complex, pre-RC), 最终完成解旋酶装载过程^[1-2]。当细胞进入S期后, DDK(Dbf4-dependent Cdc7 kinase)磷酸化Mcm2-7, 从而导致Cdc45(cell division cycle 45)和Mcm2-7的相互作用; S-CDK(S-phase Cyclin-dependent kinase)与Sld2、Sld3靶向作用, 并介导Sld2、Sld3与Dpb11相互作用, 最终导致GINS(Slf5-Psf1-Psf2-Psf3 complex)、DNA Pol ϵ (DNA polymerase ϵ , DNA Pol ϵ)到Mcm2-7的募集, 从而激活Mcm的解旋酶活性, 完成解旋酶激活过程^[2]。最后, Mcm2-7以Cdc45和GINS(go ichi ni san)为辅助因子, 发挥解旋酶活性, 解开DNA双螺旋, 然后募集DNA复制元件开始DNA的复制^[2-3]。

为了协调成百上千个DNA复制起始位点上的DNA复制起始过程, 真核生物进化出一套严格的调控机制, 保证每个DNA复制起始位点在每个细胞周期内仅仅“开火(firing)”一次, 染色体的DNA片段既不能重复复制、也不能不复制, 从而保证真核生物基因组DNA的完整性和遗传的稳定性^[1]。总的来说, 真核生物有以下几种控制DNA复制起始执照过程的途径: (1)CDKs(cyclin-dependent kinases)介导Mcm(minichromosome maintenance)发生磷酸化, 从染色体上解离(酵母中被转运至细胞核外); (2)CDKs介导Cdc6发生磷酸化, 转运至细胞核外(酵母中发生降解); (3)G₂/M转换期活性升高的CDKs通过阻止pre-RC的组装, 从而阻断DNA的重复复制; (4)对Cdt1的调节, 包括CDKs依赖的对Cdt1转录水平的调控, 以及泛素-蛋白酶系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)依赖的对Cdt1的降解: SCF-Skp2复合体途径、DDB1-Cul4复合体途径^[3-4]。此外, 高等真核生物中存在的李蛋白通过结合Cdt1, 从而抑制Cdt1执照活性的途径。基于李蛋白对真核生物DNA复制起始抑制的重要作用, 下面就目前发现的李蛋白参与调控DNA复制起始的机制进行整理、论述。

1 李蛋白的结构与功能

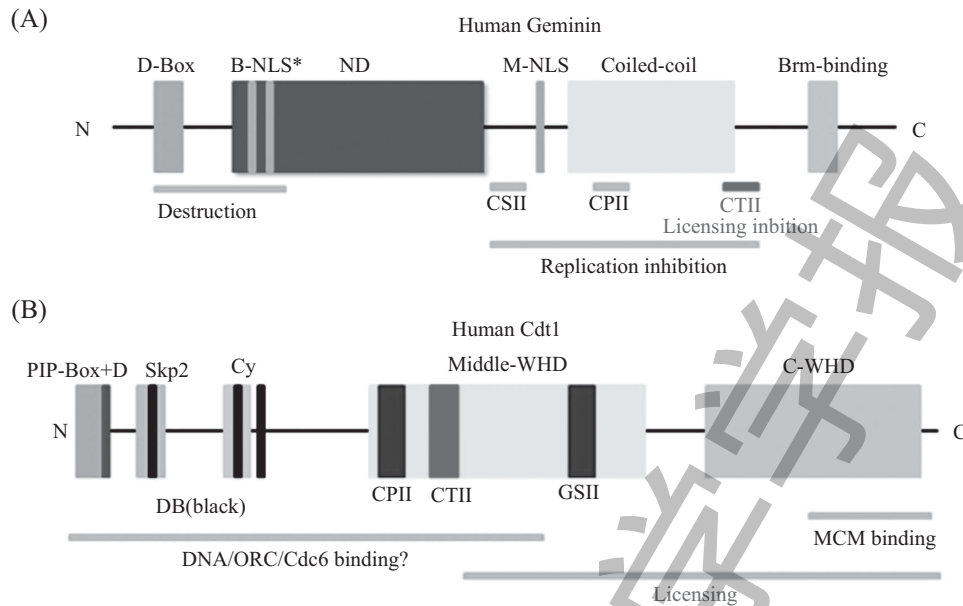
1.1 李蛋白的结构

李蛋白是一种大小约为25 kDa的蛋白质, 最初是在非洲蟾蜍卵提取物中进行有丝分裂期可降解

的蛋白质筛选时发现的^[5]。利用删除突变、晶体结构等方法, 根据李蛋白各区域的功能, 可以将李蛋白划分为: 降解结构域、神经分化结构域、DNA复制抑制结构域、Brahma结合结构域^[6-9]。降解结构域包括降解盒子(destruction box, DB)和核定位信号(nuclear localization signal, NLS), 降解盒子能被有丝分裂时期的后期促进复合体(anaphase promoting complex/cyclosome, APC/C)识别, 从而介导李蛋白的降解。非哺乳动物的NLS是一种二重核定位信号(bipartite nuclear localization signal, B-NLS), 哺乳动物的NLS则是位于中央区域的精氨酸-精氨酸-赖氨酸(arginine-arginine-lysine, RRK)序列, 并且非洲蟾蜍突变的B-NLS会导致李蛋白在细胞质中的异常积累, 不能被正常降解^[5-6,9]。神经分化结构域(neutralizing domain, ND)能够诱导未定型的胚胎细胞分化成神经元, 但ND对李蛋白抑制DNA复制不是必需的^[6-7]。李蛋白DNA复制抑制结构域包括中央卷曲螺旋结构域(central coiled-coil domain)和Cdt1结合结构域。李蛋白的卷曲螺旋结构域由两个通过左手超螺旋结合的 α 螺旋构成, 参与蛋白的寡聚化作用, 比如李蛋白二聚体的形成等^[5-6,8]。Cdt1结合结构域则是李蛋白与Cdt1结合的主要区域, 人李蛋白的Cdt1结合区域位于氨基酸残基76~160, 并且缺失氨基酸残基145~160的人李蛋白不能抑制DNA复制起始; 因此, 人李蛋白中结合Cdt1的结构域中的氨基酸残基145~160对Cdt1执照活性、DNA复制起始的抑制是决定性的, 并且非洲蟾蜍李蛋白的氨基酸残基140~160(对应于人李蛋白氨基酸残基132~152)对染色体复制抑制是至关重要的^[5-6,8-9](图1)。

1.2 李蛋白的功能

李蛋白既能抑制DNA的复制, 也能参与调控发育过程中细胞的增殖与命运决定^[10]。李蛋白可以结合并抑制Cdt1的执照活性, 阻止Mcm2-7到pre-RC的组装, 抑制DNA复制起始, 从而调控DNA复制^[4]。李蛋白参与发育过程中细胞增殖与命运决定的途径包括: (1)李蛋白结合并阻断Six3(Six homebox 3)、HOX转录因子的活性, 从而调控视网膜细胞的增殖、体轴的模式形成; (2)在神经分化过程中, 李蛋白与SWI/SNF(switch/sucrose non-fermentable)染色质重塑复合体的Brg1、Brahma催化亚基结合, 抵消它们促进碱性螺旋-环-螺旋蛋白(basic-helix-loop-helix, bHLH)依赖的靶基因转录激活作用, 使神经祖细胞保持未分



A: 人孪蛋白的结构。D-Box: 降解盒子; B-NLS*: 二重核定位信号, *表示这个区域仅在非哺乳动物中存在; ND: 神经分化结构域; M-NLS: 哺乳动物核定位信号; Coiled-coil: 孪蛋白的中央卷曲螺旋结构域; CSII: Cdt1结合第二接触面区域; CPII: Cdt1结合第一接触面区域; CTII: Cdt1结合第三接触面区域; Brm-binding: 结合Brahma(Brm)催化亚基的区域。B: Cdt1的结构。PIP-Box: PCNA结合基序盒子; D: 降解基序; Skp2: Skp2的识别位点; Cy: Cy基序精氨酸-精氨酸-亮氨酸; DB(black): 三个降解盒子; Middle-WHD: 中央翼型螺旋结构域; C-WHD: C-末端翼型螺旋结构域; GPII: 孪蛋白结合第一接触面区域; GSII: 孪蛋白结合第二接触面区域; GTII: 孪蛋白结合第三接触面区域。

A: the structure of human Geminin. D-Box: destruction box; B-NLS*: bipartite nuclear localization signal, * means this region only appears in non-mammalian; ND: neutralizing domain; M-NLS: mammalian nuclear localization signal; Coiled-coil: central coiled-coil domain of Geminin; CSII: Cdt1 secondary interface interaction region; CPII: Cdt1 primary interface interaction region; CTII: Cdt1 tertiary interface interaction region; Brm-binding: regions of binding Brahma (Brm) catalytic subunit. B: the structure of Cdt1. PIP-Box: PCNA-interaction motif box; D: degron motif; Skp2: recognition site of Skp2; Cy: Cy-motif RRL; DB(black): three destruction box; Middle-WHD: the middle winged helix domains; C-WHD: the C-terminal winged helix domains; GPII: Geminin primary interface interaction region; GSII: Geminin secondary interface interaction region; GTII: Geminin tertiary interface interaction region.

图1 人孪蛋白和Cdt1的结构

Fig.1 The structure of human Geminin and Cdt1

化的状态; (3)孪蛋白直接与HOX基因增强子区域的Polycomb复合体的Scmb1相互作用, 抑制HOX基因的表达; (4)在神经板发育过程中, 孪蛋白通过Brm和两个卷曲螺旋蛋白ERNI、BERT相互作用, 调控早期神经板标志物Sox2的表达^[11-12]。

除此之外, 孪蛋白对维持小鼠胚胎细胞的多能性、神经细胞系的建立是必要的^[13]。孪蛋白在小鼠皮质发育过程中有重要作用, 孪蛋白可以调控皮质神经祖细胞的数量和神经元的形成^[10]。孪蛋白对小鼠精原细胞的增殖很重要, 但不参与精原细胞的分化^[14]。

2 孪蛋白的时空调控与DNA复制起始

2.1 孪蛋白的表达调控

孪蛋白在转录水平是由RB/E2F(retinoblastoma/elongation factor 2)途径调控的, RB协同E2F介导对孪蛋白启动子的调控^[15-16]。RB在G₁/S期转换时磷酸化、

失去活性, E2F通过结合孪蛋白启动子上的E2F应答序列激活孪蛋白的表达; RB在M/G₁期转换时去磷酸化、激发活性, RB/E2F复合体通过结合孪蛋白第一个外显子下游的部分序列抑制孪蛋白的转录^[15-16]。另外, 孪蛋白还可以通过介导自身启动子区域的组蛋白修饰, 改变染色质结构, 从而抑制E2F的结合能力, 也就是说孪蛋白可以通过负反馈调节控制自身的转录、表达^[17]。

在真核生物中, 孪蛋白可以由三种不同的E3泛素连接酶介导其通过UPS(ubiquitin-proteasome system)降解: PcG(polycomb group)复合体1、RDCOXB4复合体(Roc1-Ddb1-Cul4a-HOXb4)、分裂期的后期促进复合体。PcG复合体1利用其组分Scmh1与孪蛋白相互作用; HOXB4与Roc1-Ddb1-Cul4a泛素连接酶核心组分组装成RDCOXB4复合体, HOXB4介导该复合体与孪蛋白的相互作用; 分裂期的APC/C则是通过识别孪蛋白的降解盒子从而结合孪蛋白; 结

合有上述三种E3泛素连接酶的孛蛋白会通过UPS发生降解^[9,18]。但是,孛蛋白的细胞周期性变化,主要是由APC/C介导的,而PcG复合体1、RDCOXB4复合体介导的孛蛋白的降解,主要与维持造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)的活性相关^[18-19]。APC/C活性的周期性变化,对孛蛋白的调控至关重要: APC/C在G₁期激活,介导孛蛋白降解; APC/C在G₁/S期转换时失活,孛蛋白开始积累,并在S期、G₂期、M期部分时期持续表达; APC/C在细胞分裂中后期转换时激活,导致孛蛋白大量降解^[9]。

2.2 孛蛋白细胞周期依赖性的核质穿梭(nucleocytoplasmic shuttling)

细胞核核膜对DNA重复复制有着重要的抑制作用,重要的DNA复制因子一旦被转运至核膜外,只有等到有丝分裂核膜破裂后才能接近DNA^[20]。孛蛋白是一核内蛋白质^[9],在非洲蟾蜍(*Xenopus*)卵提取物、禽类细胞、人癌细胞中,孛蛋白均需转运至细胞核,才能发挥其在S期的执照抑制作用^[21-25]。

在非洲蟾蜍卵提取物中的研究发现,位于非洲蟾蜍孛蛋白N-末端的B-NLS对孛蛋白的细胞核定位是至关重要的,孛蛋白能在细胞周期中进行核质穿梭^[25]。还有研究发现,非洲蟾蜍卵提取物中的细胞,一旦进入细胞分裂中期后,核膜发生破裂,孛蛋白被激活的APC/C泛素化,大部分孛蛋白通过UPS发生降解,但是却有一部分单泛素化的孛蛋白“逃离”降解的命运;但是这些孛蛋白失活不能和Cdt1结合,伴随着细胞分裂末期核膜的重建,这些孛蛋白随之进入细胞核重新被激活,结合并抑制Cdt1的执照活性^[22-23]。

在禽类细胞中,孛蛋白也同样进行细胞周期依赖性的核质穿梭:在G₁期,孛蛋白定位于细胞质,不能发挥核内蛋白的功能;在S期,孛蛋白通过NLS的作用期转运至细胞核,发挥执照抑制的作用;在M期向下一个G₁期转换时,孛蛋白通过保守的核输出信号(nuclear export-signal, NES),在Crm1帮助下又被转运至细胞质,并且这种NES只在非哺乳动物中孛蛋白中存在^[24]。

在人癌细胞中,同样也存在孛蛋白细胞周期依赖性的核质穿梭:G₁期,孛蛋白在NLS和DB的引导下转运至细胞质;此外,在G₁期, Cdt1可以与孛蛋白直接结合,介导孛蛋白转运至细胞核^[21]。

因此,不同物种的细胞,都可以通过孛蛋白细胞周期依赖性的核质穿梭,实现对孛蛋白的蛋白翻

译后水平的调控,虽然穿梭机制因细胞种类、所处环境而异。但是孛蛋白的核质穿梭机制,对实现孛蛋白作为一种核内蛋白质适时、适地地发挥执照抑制功能是至关重要的。

3 Cdt1:Geminin复合体分子开关与DNA复制起始

孛蛋白最初被认为可以通过阻止Mcm2-7复合体参与pre-RC的装载,从而抑制DNA复制起始^[9]。Wohlschlegel等^[4]在293T细胞以及体外DNA复制系统中,利用免疫沉淀(immunoprecipitation)等方法证明:无论在体内还是体外,孛蛋白都能和Cdt1紧密结合, Cdt1作为执照因子对Mcm参与pre-RC组装是必需的,而结合孛蛋白的Cdt1执照活性被抑制,不能介导Mcm复合体的有效组装。

后来, Lutzmann等^[26]利用非洲蟾蜍卵提取物发现,在G₁期,孛蛋白和Cdt1能以复合体的形式被募集到染色质上,进而募集Mcm2-7组装成pre-RC,完成执照过程;进入S期后,大量的孛蛋白被募集到染色质上,与染色质上结合的Cdt1或Cdt1:Geminin复合体相互作用,从而抑制Cdt1的执照活性。因此,他们首次提出了Cdt1:Geminin可能以一种分子开关(molecular switch)机制,发挥孛蛋白的DNA复制起始抑制作用: Cdt1:Geminin复合体的化学计量数,决定着Cdt1是处于执照活性开启的激活复合体(activation complex, A复合体)状态,还是处于执照活性关闭的抑制复合体(inhibition complex, I复合体)状态,细胞周期依赖性的A复合体、I复合体的转换就如同一个分子开关控制着Cdt1的执照活性、Mcm2-7的装载以及最终的DNA复制过程^[26]。

近年来,科学家通过对Cdt1:Geminin复合体晶体结构的分析,使孛蛋白抑制Cdt1执照活性的分子机制得到解释^[27-28]。Lee等^[27]通过分析小鼠末端截除的tGeminin(truncated Geminin)和tCdt1(truncated Cdt1)构建的Cdt1:Geminin复合体的结晶结构,首次发现了Cdt1:Geminin复合体由两分子tGeminin和一分子tCdt1构成一个异源三聚体(heterotrimer),并形成了两个接触面(interface)。并且他们认为,小鼠孛蛋白C-末端残基129~149(对应于非洲蟾蜍孛蛋白的氨基酸残基140~160),是通过空间位阻(steric hindrance)抑制了Mcm2-7到Cdt1的装载,从而抑制执照过程^[9,27]。

但鉴于Lutzmann等^[26]报道,Cdt1:Geminin复合体理应还有一种存在形式。Marco等^[28]通过分析人末端截除的孪蛋白htGeminin(human truncated Geminin)和htCdt1(human truncated Cdt1)构建的Geminin:Cdt复合体的结晶结构,发现两个htCdt1:htGeminin异源三聚体结合形成了异源六聚体(heterohexamer)。更为重要的是,他们发现Cdt1:Geminin异源六聚体的形成,“遮蔽”了对Cdt1执照活性很重要的一些残基。他们还证明,异源六聚体的形成,对孪蛋白完全抑制Cdt1的执照活性是决定性的。值得注意的是,Marco等^[28]提出的这种模型和Lutzmann等^[26]提出的模型相一致,Cdt1:Geminin异源三聚体代表了A复合体,Cdt1:Geminin异源六聚体代表了I复合体。

综上所述,可以对Cdt1:Geminin复合体的分子开关模型进行总结:Cdt1:Geminin复合体可以以异源三聚体(Cdt1:2×Geminin)、异源六聚体[2×(Cdt1:2×Geminin)]两种构象存在。在异源三聚体中,Cdt1中与执照活性密切相关的氨基酸残基处于构象上的“暴露”状态,因此Cdt1能够发挥其执照因子的作用;而在异源六聚体中,Cdt1与执照活性密切相关的氨基酸残基处于构象上的“遮蔽”状态,因此,Cdt1不能够发挥其执照因子作用^[26-28]。所以,Cdt1:Geminin异源三聚体、异源六聚体之间的转换就如同一个分子开关,控制着Cdt1执照因子的活性。

除此之外,Ode等^[29]利用非洲蟾蜍卵提取物,结合数学建模、精确测量等方法,提出了S期孪蛋白介导的抑制执照过程的“all-or-none”机制,该机制的基础是孪蛋白介导的DNA复制起始位点间的相互作用(inter-origin cooperativity, IOC),从而快速、稳定抑制执照过程(图2)。

但是,孪蛋白抑制Cdt1执照活性的分子机制还有许多问题亟待解决。Cdt1:Geminin异源六聚是通过什么方式抑制Cdt1执照活性的,是通过抑制Mcm2-7到Cdt1的装载还是抑制了Cdt1-Mcm2-7到pre-RC的组装?由于小鼠Cdt1同孪蛋白在异源三聚体中的第二个接触面的结合能力非常弱^[27],并且由图1我们可以看出:Cdt1的孪蛋白第二个接触面结合区域和Cdt1执照活性区域相互重叠,那么在异源六聚体中第二个接触面是否发生某种构想变化,以“锁住”Cdt1执照活性的重叠区域?除此之外,Cdt1:Geminin是否还能以其他异源多聚体形式存在,

并且这些异源多聚体之间转换是如何进行调控的?虽然还有更多关于Cdt1:Geminin复合体的问题等着我们去探究、证明,但是Cdt1:Geminin复合体作为一种分子开关,调控DNA复制起始的机制对DNA复制是至关重要的。

4 孪蛋白、表观遗传学调控与DNA复制起始

据报道,组蛋白乙酰化与执照过程、DNA复制起始的调控密切相关。较早“开火”的DNA复制起始位点,多数位于已转录的、高度乙酰化的基因组染色质区域,并且在非洲蟾蜍卵细胞的早期发育过程中,组蛋白乙酰化参与DNA复制起始位点的激活^[30]。在哺乳动物细胞G₁期,先于Mcm2-7复合体的组装,人结合ORC1的乙酰基转移酶(human acetylase binding to ORC1, HBO1)作为Cdt1的共激活子,以Cdt1依赖的方式与DNA复制起始位点相互联系,并能够磷酸化H4(histone 4),这对Mcm复合体的装载是至关重要的^[31-33]。无论是人细胞,还是非洲蟾蜍卵提取物,HBO1的删除均会导致Mcm2-7复合体的异常装载,并且还会导致H4乙酰化处于低水平,甚至去乙酰化(deacetylation);同时,Cdt1在G₁期能够依赖HBO1乙酰基转移酶的活性,诱导大规模的Mcm2-7装载所需的染色质去凝集过程^[31]。此外,HBO1在体外至少能够乙酰化ORC2、Mcm2、Cdc6、孪蛋白等其他DNA复制起始相关蛋白,并且HBO1的乙酰化酶活性是受细胞周期调控的,其活性在DNA复制起始执照过程中最高^[34]。总之,依赖于HBO1组蛋白乙酰基转移酶(histone acetylase, HAT)活性的Cdt1介导的染色质去凝集、H4以及DNA复制起始相关的反式作用蛋白的乙酰化,最终都会通过改变染色质的结构,从而提高染色质DNA复制起始位点对Mcm2-7复合体等蛋白的接受能力,进而调控DNA复制起始。

当细胞进入S期以后,孪蛋白能够高效、特异地抑制Cdt1诱导的染色质去凝集过程^[30]。此外,组蛋白去乙酰基酶11(histone deacetylases 11, HDAC11)能够抑制Cdt1诱导的染色质去凝集、Mcm装载和DNA重复复制,而孪蛋白能增强HDAC1与Cdt1的结合能力^[31]。在体外,孪蛋白在Cdt1存在的情况下,能抑制HBO1依赖的H4的乙酰化,并且这种抑制作用是在Cdt1-HBO1-Geminin复合体环境下发生的^[30-31]。

DNA复制作为一种以DNA为底物的生物化学

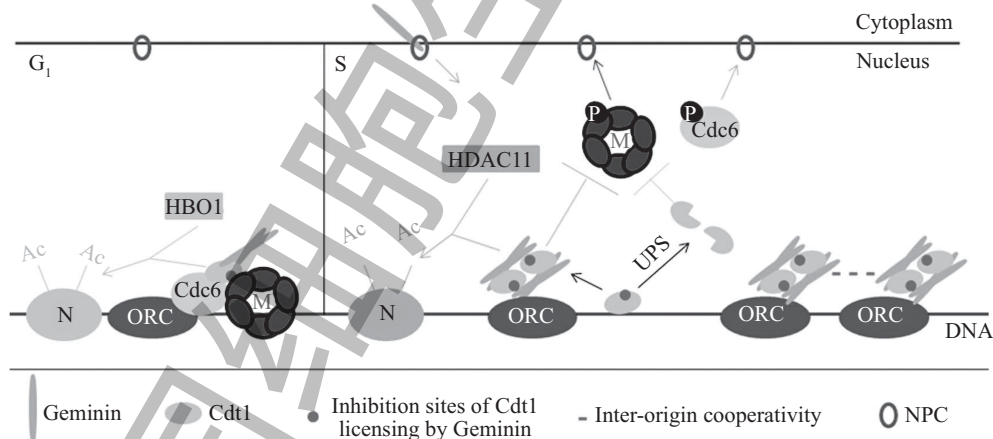
反应,以核小体为基础的高度浓缩的染色质结构,必然会影响DNA复制起始以及随后的DNA复制过程。因此,对于染色质中DNA复制起始位点的表观遗传学调控,对DNA复制起始的发生是必要的。对孛蛋白、Cdt1、HBO1、HDAC11等的研究表明,孛蛋白可以抑制DNA复制起始正相关的表观遗传学调控过程,比如上述的H4的乙酰化、Cdt1介导的染色质去凝集过程,从而在表观遗传学水平调控DNA复制起始^[34](图2)。但是,有关孛蛋白与DNA复制起始表观遗传学调控的详细机制还有待研究。

5 孛蛋白-执照相关蛋白、孛蛋白翻译后修饰与DNA复制起始

5.1 孛蛋白-执照相关蛋白与DNA复制起始

此处所述的孛蛋白-执照相关蛋白中的执照相关蛋白是为叙述方便而命名的,因为这些蛋白质大都通过与孛蛋白相互作用,直接或间接地影响执照过程。这些蛋白质包括: Six、HOX、Idas等一些典型的DNA结合蛋白,下面将分别介绍这些蛋白与孛蛋白、DNA复制起始的关系。

Six和HOX均能通过和孛蛋白的强烈相互作用能力,与Cdt1竞争性结合孛蛋白,介导Cdt1的释放,而被释放的Cdt1则能发挥执照活性,结合有孛蛋白的Six、HOX正如前面所述发挥其发育学上的功能,这样通过Geminin-Cdt1、Geminin-Six、Geminin-HOX复合体之间的转换作用,平衡细胞的增殖、分化^[35]。此外,近年来研究表明,HOX家族蛋白可以结合典型的人DNA复制起始位点,并与DNA复制起始执照因子相互作用,从而调控DNA复制起始位点的活性,比如HOXD13能与Cdc6作用,促进pre-RC到DNA复制起始位点的组装^[36]。作为DNA复制起始抑制因子的孛蛋白,可以阻断HOX家族蛋白对DNA复制起始的促进作用^[36]。Idas是一类和孛蛋白同源的DNA结合蛋白,在孛蛋白、Idas共表达的细胞中,孛蛋白与Idas优先通过二者的卷曲螺旋结构域形成一个头对头的异源二聚体;在海胆卵提取物中,Idas-Geminin复合体与Geminin-Geminin复合体相比,Idas-Geminin复合体的执照抑制活性降低,可能是因为Idas-Geminin复合体对Cdt1的结合、抑制能力降低;在体外培养的人细胞中,Idas的异位表达导致有



在G₁期, A复合体(Cdt1:Geminin异源三聚体)介导Mcm2-7复合体到DNA复制起始位点的组装, Cdt1协同HBO1介导执照过程的表观遗传调控激活,完成执照过程。在S期, I复合体(Cdt1:Geminin异源六聚体)抑制Mcm2-7复合体到DNA复制起始位点的组装,孛蛋白协同HDAC11关闭执照过程的表观遗传调控激活状态,邻近DNA复制起始位点发生孛蛋白介导的DNA复制起始抑制的协同作用,这些孛蛋白介导的一系列DNA复制起始抑制过程协同Cdc6、Mcm2-7复合体的核输出以及Cdt1的部分降解过程,共同完成对执照过程的抑制,防止S期DNA重复复制起始、DNA重复复制。N: 核小体; NPC: 核孔复合体; M: Mcm2-7复合体; P: 磷酸化; Ac: 乙酰化; UPS: 泛素-蛋白酶体系统。

During G₁ phase, to achieve licensing, activation complex (Cdt1:Geminin heterotrimer) mediates the assembly of Mcm2-7 to DNA replication origins, meanwhile Cdt1 cooperates with HBO1 mediating epigenetic activation of licensing. During S phase, inhibition complex (Cdt1:Geminin heterohexamers) inhibits the assembly of Mcm2-7 to DNA replication origins, and Geminin cooperates with HDAC11 to turn off the epigenetic activation of licensing, meanwhile inter-origin Geminins mediate the cooperativity of DNA replication initiation inhibition. Cooperating with the nuclear export of Cdc6 and Mcm2-7 and partial degradation of Cdt1, Geminin related DNA replication initiation inhibition processes achieve inhibition of licensing and prevent DNA replication re-initiation and DNA re-replication. N: nucleosome; NPC: nuclear pore complex; M: Mcm2-7 complex; P: phosphorylation; Ac: acetylation; UPS: ubiquitin-proteasome system.

图2 调控DNA复制起始的Cdt1:Geminin复合体分子开关

Fig.2 The molecular switch of Cdt1:Geminin complex regulating DNA replication initiation

限的DNA重复复制,但可被孛蛋白表达所抵消^[37]。

总之,因细胞种属、类型、自身状态、外界环境而异,某些细胞的执照相关蛋白可以通过与孛蛋白的相互作用,直接或间接地来影响Cdt1的执照活性、DNA复制起始。

5.2 孛蛋白翻译后修饰与DNA复制起始

蛋白的翻译后修饰作用,如乙酰化、泛素化、磷酸化等,对蛋白质的生物学功能有着重要的作用。孛蛋白在某些细胞的特定生理条件下,能够发生翻译后修饰,对DNA复制起始产生特定的影响。

Kulartz等^[38]发现,HeLa细胞S期开始后,靠近孛蛋白降解盒子(残基23~31)的丝氨酸-45、丝氨酸-49发生磷酸化。同样,Tsunematsu等^[39]则发现,在HeLa细胞分裂过程中,Aurora-A可以磷酸化孛蛋白降解盒子中的苏氨酸-25残基,从而保护孛蛋白免受分裂后期APC/C依赖的UPS降解,而稳定存在的孛蛋白可以通过干扰Cdt1与Skp2的相互作用,保护Cdt1免受SCF-Skp2复合体依赖的UPS降解,从而保证接下来细胞周期中pre-RC的形成。此外,在鼠多能干细胞中,间期的Emi1(early mitotic inhibitor 1)能够抑制APC/C的活性,从而导致孛蛋白逃离有丝分裂后期APC/C介导的蛋白质降解,使孛蛋白能够在G₁期保持稳定表达,更为重要的是稳定表达的孛蛋白能够中和Brg1介导的染色质重塑过程,从而打破对Oct4、Sox2、Nanog的表达抑制,维持细胞的多能性;而孛蛋白可能正如非洲蟾蜍中逃离降解的孛蛋白一样,进行了某种翻译后修饰,在G₁期不能和Cdt1结合,从而不能抑制Cdt1的执照活性^[22-23,40]。在非洲蟾蜍卵细胞中的研究证明,孛蛋白在卵细胞减数分裂中的主要作用是稳定Cdt1,促进Cdt1的积累,以适应后续受精后快速的增殖过程^[41]。孛蛋白可能也是通过翻译后修饰,逃离降解过程,并且对减数第一次分裂后未成熟卵细胞的孛蛋白删除,并不会导致DNA复制,而是造成以后卵细胞成熟、激活过程中Cdt1稳定性的下降^[41]。

综上所述,可以得出以下结论:孛蛋白在高等真核生物中,一方面能作为DNA复制起始的抑制因子,在S期结合Cdt1并抑制其执照活性;另一方面,孛蛋白也能作为DNA复制起始的促进因子,通过翻译后修饰,逃离细胞分裂后期的降解过程,保护Cdt1免受UPS的降解,这对某些快速分裂细胞(癌细胞、生殖细胞)随后的分裂过程中DNA复制起始是

至关重要的。所以,孛蛋白翻译后修饰对逃离分裂后期APC/C依赖的UPS降解、稳定Cdt1以及在G₁期阻遏其对Cdt1的抑制活性是至关重要的,最终保证高频率的DNA复制起始的发生。值得我们思考并探究的是,快速分裂细胞中G₁期稳定存在的孛蛋白,是否仅仅依靠翻译后修饰来阻止其对Cdt1的活性抑制?还是有可能依靠前面所述的Cdt1:Geminin异源三聚体,保证Cdt1免受降解的同时并保证Cdt1的执照活性?最有可能的是两者的协同作用,其中详细的机制等着我们去发现、探索。

6 孛蛋白缺失与DNA复制起始

对细胞周期同步化的人U2OS细胞,进行孛蛋白基因切除(gene ablation),结果表明,大多数细胞可以正常通过S期;但有执照活性的Cdt1却在G₂期异常积累,诱导DNA重复复制,而少量的DNA重复复制就能激活G₂/M检验点,从而将孛蛋白缺失的U2OS细胞滞留在G₂期^[42]。利用干扰小RNA(small interfering RNA, siRNA)干扰人正常细胞、癌细胞中的孛蛋白表达的结果显示,孛蛋白表达受到干扰的人正常细胞、癌细胞都会导致DNA在同一个细胞周期内重复复制,并激活CHK1(checkpoint kinase1)依赖的检验点;然而利用咖啡因(cafeine)和UCNO1抑制CHK1依赖的检验点后,会导致细胞有丝分裂流产(mitotic abrogation)、DNA重复复制细胞的死亡^[43]。总之,孛蛋白缺失或耗尽会造成Cdt1执照活性在S期、G₂期的异常激活,也会造成DNA重复复制起始以及DNA的过度复制。而在异常的DNA重复复制过程中,失控的DNA复制起始位点异常“开火”会导致合成的DNA单链有缺口,有缺口的单链DNA在作为下一轮DNA复制的模板时会造成复制叉的停顿、DNA链的断裂^[42]。这种DNA损伤一方面能够激活p53依赖的检验点,从而诱导p21的表达,p21可能通过抑制CDK2从而抑制DNA的重复复制,但是这种现象仅仅发生在Cdt1过表达时,而孛蛋白缺失造成的DNA损伤不能够激活p53 DNA损伤检验点;另一方面激活CHK1或CHK2依赖的DNA损伤检验点,激活的CHK1会磷酸化Cdc25c的丝氨酸-216(serine 216),导致Cdc25c停留在细胞核外,从而使细胞周期素B(cyclin B)-CDK1(cdc1)的活性得到抑制、激活细胞周期的G₂/M检验点,将细胞滞留在G₂期^[42-48]。如果因为某种因素CHK1或G₂/M检验点的活性受到抑

制, 那么DNA过度或重复复制的细胞就不会继续积累, 最终会介导细胞的凋亡, 并且孳蛋白的下调也会导致细胞衰老相关的基因的表达^[49]。

孳蛋白删除或耗尽对胚胎细胞的影响, 不但会导致胚胎细胞DNA的重复或过度复制以及在G₂期的滞留, 而且还会影响胚胎细胞的发育^[45,50]。孳蛋白基因切除的小鼠胚胎在八细胞时期DNA过量复制, 从而导致八细胞时期的细胞均表达滋养层细胞特异性的标志, 而不表达内细胞团细胞特异性的多能性标志^[50]。用反义寡聚核苷酸干扰非洲蟾蜍胚胎细胞的孳蛋白表达发现, 孳蛋白耗尽的胚胎细胞能正常进行早期卵裂, 但是在中囊胚转换(midblastula transtion)之后细胞被滞留在G₂期, 并且DNA重复复制激活DNA损伤检验点, 激活的检验点会打乱合子基因的转录模式, 影响胚胎的发育^[45,51]。

果蝇细胞中孳蛋白的敲除, 会导致果蝇基因组异染色质区域优先重复复制; 人癌细胞中Cdt1过表达或Cdt1/Cdc6共通过表达, 却会导致先前“开火”的DNA复制起始位点发生DNA重复复制; 而芽殖酵母和酿酒酵母的重复复制起始位点分布在基因组内, 并且在端粒的近端区域有显著增强的DNA重复复制^[52]。

值得注意的是, 利用siRNA敲低人Hela细胞孳蛋白, 对其细胞周期几乎没有影响, 这主要是因为: 人Hela细胞执行完执照活性的Cdt1在S期早期快速被降解, 新合成的Cdt1也快速降解从不积累, 孳蛋白自S期开始一直存在于染色质上靠近复制起始位点的序列处, 从而阻断逃离降解或过量合成的Cdt1到起始位点的组装^[53]。而人成纤维细胞从细胞周期中细胞向G₀期细胞转换时, Cdt1和孳蛋白在RNA、蛋白质水平均下调, 人个别癌细胞系中Cdt1和孳蛋白在RNA、蛋白质水平均持续过表达, 说明Cdt1和孳蛋白的调控机制在癌细胞、G₀期细胞发生了不同的变化^[54]。有学者报道, 人癌细胞比人正常细胞对孳蛋白敲低更为敏感^[55-56]。那么不同类型细胞对孳蛋白敲低应答结果的差异, 应该是我们预料之中的, 因为细胞的种属、来源、所处环境会影响甚至决定细胞的周期调控过程与机制, 这可能是由于不同类型细胞中对孳蛋白介导的DNA复制起始的依赖程度导致的。因为真核生物中CDKs对Cdc6、Mcm2-7于S期的调控, 在正常情况下能够抑制DNA重复复制起始, 孳蛋白很可能在特殊情况下(CDKs因DNA

损伤活性降低), 作为DNA复制起始的抑制因子发挥作用^[4]。

7 小结与展望

DNA复制是生物科学研究的基本内容, 是遗传物质得以忠实复制、传递的基础。DNA复制起始决定着DNA复制的时间、空间坐标以及复制频率。研究、探讨DNA复制起始的调控机制, 对于我们深刻理解DNA复制生物学的机理、解决DNA复制异常相关的疾病、应用于基因工程等生物技术领域是非常重要的。孳蛋白作为高等真核生物中特有的DNA复制起始抑制因子, 本篇综述以孳蛋白与真核生物DNA复制起始为思路, 简要介绍了真核生物DNA复制起始的过程、调控机制, 孳蛋白的结构和功能, 详细介绍了孳蛋白的时空调控、Cdt1:Geminin复合体分子开关、孳蛋白的表观遗传学调控、孳蛋白和执照相关蛋白、孳蛋白翻译后修饰参与DNA复制起始的途径与分子机制, 涵盖了孳蛋白从合成、核输入、发挥功能的全过程, 最后还介绍了孳蛋白删除对DNA复制起始、DNA复制、细胞增殖的影响。

综上所述, 参与细胞增殖与发育调控的孳蛋白在不同种属、不同类型、不同生理状态、不同环境条件下的细胞中, 采取不同的时空调控模式、Cdt1:Geminin分子开关模式、表观遗传学调控模式、蛋白质间相互作用的模式、翻译后修饰模式, 并协同其他DNA复制起始调控机制, 从而调控细胞的DNA复制起始以及命运决定, 最终保证细胞特异性的孳蛋白介导的调控模式对该细胞(生物)的增殖、发育调控最优化。

虽然, 对孳蛋白的研究取得了许多成果, 但是仍有许多关于孳蛋白与DNA复制起始的问题等着我们去探讨。最近就有报道发现, 通过突变小鼠孳蛋白CSII和CPII之间的某些特定氨基酸残基, 得到了一系列孳蛋白突变体, 其中一种孳蛋白突变体能与野生型孳蛋白竞争性结合Cdt1, 但在体内却不能抑制Mcm2-7到DNA的组装, 这种突变体孳蛋白的存在, 能够导致细胞在一个S期内DNA的过度复制^[57]。但是, 孳蛋白突变体中与Cdt1结合的三个区域都是完整的, 所以进一步探究这种孳蛋白突变体是如何丧失了执照过程的抑制能力, 对我们认识孳蛋白的潜在功能至关重要。另外, 还有研究组利用纯化的人DNA复制起始相关蛋白, 证明孳蛋白不能抑制pre-RC在起

始位点的起始组装过程,但是能够抑制Mcm-DNA复合物从一种盐敏感状态到盐稳定状态的转换,从而实现抑制DNA复制起始的作用^[58],这种Mcm-DNA状态的转换的分子机制以及与上述Cdt1:Geminin分子有关的联系需要进一步的研究。对结合到DNA上的ORC的晶体结构的最新研究表明,ORC能在细胞周期内通过“自我抑制”和“活化”两种构象的转化调控自身的活性^[59],而孪蛋白与Cdt1的结合区域与Cdt1结合ORC区域是相互重叠的,所以孪蛋白是否能够通过Cdt1参与ORC活性的调节,从而调控DNA复制起始?总之,对孪蛋白与DNA复制起始的研究还需更加深入,但同时我们也应关注孪蛋白在不同生物种属、不同细胞类型、不同生理条件下应答机制的差异性。

参考文献 (References)

- Sun J, Kong D. DNA replication origins, ORC/DNA interaction, and assembly of pre-replication complex in eukaryotes. *Acta Biochim Biophys Sin* 2010; 42(7): 433-9.
- Bell SP, Kaguni JM. Helicase loading at chromosomal origins of replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5(6): 1-20.
- Truong LN, Wu X. Prevention of DNA re-replication in eukaryotic cells. *J Mol Cell Biol* 2011; 3(1): 13-22.
- Wohlschlegel JA, Dwyer BT, Dhar SK, Cvetic C, Walter JC, Dutta A. Inhibition of eukaryotic DNA replication by Geminin binding to Cdt1. *Science* 2000; 290(5500): 2309-12.
- Caillat C, Perrakis A. Cdt1 and Geminin in DNA replication initiation. *Subcell Biochem* 2012; 62: 71-87.
- Benjamin JM, Torke SJ, Demeler B, McGarry TJ. Geminin has dimerization, Cdt1-binding, and destruction domains that are required for biological activity. *J Biol Chem* 2004; 279(44): 45957-68.
- Kroll KL, Salic AN, Evans LM, Kirschner MW. Geminin, a neuralizing molecule that demarcates the future neural plate at the onset of gastrulation. *Development* 1998; 125(16): 3247-58.
- Thepant M, Maiorano D, Guichou JF, Auge MT, Dumas C, Mechali M, *et al.* Crystal structure of the coiled-coil dimerization motif of Geminin: Structural and functional insights on DNA replication regulation. *J Mol Biol* 2004; 342(1): 275-87.
- McGarry TJ, Kirschner MW. Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. *Cell* 1998; 93(6): 1043-53.
- Spella M, Kyrousi C, Kritikou E, Stathopoulou A, Guillemot F, Kioussis D, *et al.* Geminin regulates cortical progenitor proliferation and differentiation. *Stem Cells* 2011; 29(8): 1269-82.
- Karamitros D, Kotantaki P, Lygerou Z, Veiga-Fernandes H, Pachnis V, Kioussis D, *et al.* Life without Geminin. *Cell Cycle* 2010; 9(16): 3181-5.
- Kroll KL. Geminin in embryonic development: Coordinating transcription and the cell cycle during differentiation. *Front Biosci* 2007; 12: 1395-409.
- Tabrizi GA, Bose K, Reimann Y, Kessel M. Geminin is required for the maintenance of pluripotency. *PLoS One* 2013; 8(9): 1-12.
- Barry KA, Schultz KM, Payne CJ, McGarry TJ. Geminin is required for mitotic proliferation of spermatogonia. *Dev Biol* 2012; 371(1): 35-46.
- Markey M, Siddiqui H, Knudsen ES. Geminin is targeted for repression by the retinoblastoma tumor suppressor pathway through intragenic E2F sites. *J Biol Chem* 2004; 279(28): 29255-62.
- Yoshida K, Inoue I. Regulation of Geminin and Cdt1 expression by E2F transcription factors. *Oncogene* 2004; 23(21): 3802-12.
- Ohno Y, Saeki K, Yasunaga S, Kurogi T, Suzuki-Takedachi K, Shirai M, *et al.* Transcription of the Geminin gene is regulated by a negative-feedback loop. *Mol Biol Cell* 2014; 25(8): 1374-83.
- Takahara Y. Role for Geminin in sustaining the activity of hematopoietic stem cells. *Cell Cycle* 2011; 10(4): 561-2.
- Ohno Y, Yasunaga S, Ohtsubo M, Mori S, Tsumura M, Okada S, *et al.* Hoxb4 transduction down-regulates Geminin protein, providing hematopoietic stem and progenitor cells with proliferation potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(50): 21529-34.
- Blow JJ, Laskey RA. A role for the nuclear envelope in controlling DNA replication within the cell cycle. *Nature* 1988; 332(6164): 546-8.
- Dimaki M, Xouri G, Symeonidou LE, Sirinian C, Nishitani H, Taraviras S, *et al.* Cell cycle-dependent subcellular translocation of the human DNA licensing inhibitor Geminin. *J Biol Chem* 2013; 288(33): 23953-63.
- Hodgson B, Li A, Tada S, Blow JJ. Geminin becomes activated as an inhibitor of Cdt1/RLF-B following nuclear import. *Curr Biol* 2002; 12(8): 678-83.
- Li A, Blow JJ. Negative regulation of Geminin by CDK-dependent ubiquitination controls replication licensing. *Cell Cycle* 2004; 3(4): 443-5.
- Luo L, Uerlings Y, Happel N, Asli NS, Knoetgen H, Kessel M. Regulation of Geminin functions by cell cycle-dependent nuclear-cytoplasmic shuttling. *Mol Cell Biol* 2007; 27(13): 4737-44.
- Boos A, Lee A, Thompson DM, Kroll KL. Subcellular translocation signals regulate Geminin activity during embryonic development. *Biol Cell* 2006; 98(6): 363-75.
- Lutzmann M, Maiorano D, Mechali M. A Cdt1-Geminin complex licenses chromatin for DNA replication and prevents rereplication during S phase in *Xenopus*. *EMBO J* 2006; 25(24): 5764-74.
- Lee C, Hong B, Choi JM, Kim Y, Watanabe S, Ishimi Y, *et al.* Structural basis for inhibition of the replication licensing factor Cdt1 by Geminin. *Nature* 2004; 430(7002): 913-7.
- Marco VD, Gillespie PJ, Li A, Karantzelis N, Christoulou E, Klompaker R, *et al.* Quaternary structure of the human Cdt1-Geminin complex regulates DNA replication licensing. *Proc Natl Acad Sci* 2009; 106(47): 19807-12.
- Ode KL, Fujimoto K, Kubota Y, Takisawa H. Inter-origin cooperativity of Geminin action establishes an all-or-none switch for replication origin licensing. *Genes Cells* 2011; 16(4): 380-96.
- Miotto B, Struhl K. HBO1 histone acetylase activity is essential

- for DNA replication licensing and inhibited by Geminin. *Mol Cell* 2010; 37(1): 57-66.
- 31 Wong PG, Gluzak MA, Cao TV, Vaziri C, Seto E, Alexandrow M. Chromatin unfolding by Cdt1 regulates Mcm loading via opposing functions of HBO1 and HDAC11-Geminin. *Cell Cycle* 2010; 9(21): 4531-63.
- 32 Iizuka M, Matsui T, Takisawa H, Smith MM. Regulation of replication licensing by acetyltransferase Hbo1. *Mol Cell Biol* 2006; 26(3): 1098-108.
- 33 Miotto B, Struhl K. HBO1 histone acetylase is a coactivator of the replication licensing factor Cdt1. *Genes Dev* 2008; 22(19): 2633-8.
- 34 Chadha GS, Blow JJ. Histone acetylation by HBO1 tightens replication licensing. *Mol Cell* 2010; 37(1): 5-6.
- 35 Pitulescu M, Kessel M, Luo L. The regulation of embryonic patterning and DNA replication by Geminin. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62(13): 1425-33.
- 36 Salsi V, Ferraris S, Ferraresi R, Cossarizza A, Grande A, Zappavigna V. HOXD13 binds DNA replication origins to promote origin licensing and is inhibited by Geminin. *Mol Cell Biol* 2009; 29(21): 5775-88.
- 37 Pefani DE, Dimaki M, Spella M, Karantzelis N, Mitsiki E, Kyrousi C, *et al.* Idas, a novel phylogenetically conserved Geminin-related protein, binds to Geminin and is required for cell cycle progression. *J Biol Chem* 2011; 286(26): 23234-46.
- 38 Kulartz M, Kreitz S, Hiller E, Damoc EC, Przybylski M, Knippers R. Expression and phosphorylation of the replication regulator protein Geminin. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305(2): 412-20.
- 39 Tsunematsu T, Takihara Y, Ishimaru N, Pagano M, Takata T, Kudo Y. Aurora-A controls pre-replicative complex assembly and DNA replication by stabilizing Geminin in mitosis. *Nat Commun* 2013; 4(1885): 1-11.
- 40 Yang VS, Carter SA, Hyland SJ, Tachibana-Konwalski KT, Laskey RA, Gonzalez MA. Geminin escapes degradation in G₁ of mouse pluripotent cells and mediates the expression of Oct4, Sox2, and Nanog. *Curr Biol* 2011; 21(8): 692-9.
- 41 Narasimhachar Y, Coue M. Geminin stabilizes Cdt1 during meiosis in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 2009; 284(40): 27235-42.
- 42 Klotz-Noack K, McIntosh D, Sohurch N, Pratt N, Blow JJ. Re-replication induced by Geminin depletion occurs from G₂ and is enhanced by checkpoint activation. *J Cell Sci* 2012; 125(Pt 10): 2436-45.
- 43 Melixetian M, Ballabeni A, Masiero L, Gasparini P, Zamponi R, Bartek J, *et al.* Loss of Geminin induces rereplication in the presence of functional p53. *J Cell Biol* 2004; 165(4): 473-82.
- 44 Vaziri C, Saxena S, Jeon Y, Lee C, Murata K, Machida Y, *et al.* A p53-dependent checkpoint pathway prevents rereplication. *Mol Cell* 2003; 11(4): 997-1008.
- 45 McGarry TJ. Geminin deficiency causes a Chk1-dependent G₂ arrest in *Xenopus*. *Mol Biol Cell* 2002; 13(10): 3662-71.
- 46 Zhu W, Che Y, Dutta A. Rereplication by depletion of Geminin is seen regardless of p53 status and activates a G₂/M checkpoint. *Mol Cell Biol* 2004; 24(16): 7140-50.
- 47 Neelsen KJ, Zanini ZMY, Mijic S, Herrador R, Zellweager R, Ray Chandhuri A, *et al.* Deregulated origin licensing leads to chromosomal breaks by rereplication of a gapped DNA template. *Genes Dev* 2013; 27(23): 2537-42.
- 48 Zegerman P, Diffley JF. DNA replication as a target of the DNA damage checkpoint. *DNA Repair* 2009; 8(9): 1077-88.
- 49 Iliou MS, Kotantaki P, Karamitros D, Spella M, Taraviras S, Lygerou Z. Reduced Geminin levels promote cellular senescence. *Mech Ageing Dev* 2013; 134(1/2): 10-23.
- 50 Gonzalez MA, Tachibana KE, Adams DJ, van der Weyden L, Hemberger M, Coleman N, *et al.* Geminin is essential to prevent endoreduplication and to form pluripotent cells during mammalian development. *Genes Dev* 2006; 20(14): 1880-4.
- 51 Kerns SL, Sohultz KM, Barry KA, Thorne TM, McGarry TJ. Geminin is required for zygotic gene expression at the *Xenopus* mid-blastula transition. *PLoS One* 2012; 7(5): 1-13.
- 52 Ding Q, MacAlpine DM. Preferential re-replication of drosophila heterochromatin in the absence of Geminin. *PLoS Genet* 2010; 6(9): 1-12.
- 53 Kulartz M, Knippers R. The replicative regulator protein Geminin on chromatin in the HeLa cell cycle. *J Biol Chem* 2004; 279(40): 41686-94.
- 54 Xouri G, Lygerou Z, Nishitani H, Pachnis V, Nurse P, Taraviras S. Cdt1 and Geminin are down-regulated upon cell cycle exit and are over-expressed in cancer-derived cell lines. *Eur J Biochem* 2004; 271(16): 3368-78.
- 55 Zhu W, Depamphilis ML. Selective killing of cancer cells by suppression of Geminin activity. *Cancer Res* 2009; 69(11): 4870-7.
- 56 Shreeram S, Sparks A, Lane DP, Blow JJ. Cell type-specific responses of human cells to inhibition of replication licensing. *Oncogene* 2002; 21(43): 6624-32.
- 57 Suchyta M, Miotto B, McGarry TJ. An inactive Geminin mutant that binds Cdt1. *Genes* 2015; 6(2): 252-66.
- 58 Wu M, Lu WY, Santos RE, Frattini MG, Kelly TJ. Geminin inhibits a late step in the formation of human pre-replicative complexes. *J Biol Chem* 2014; 289(44): 30810-21.
- 59 Bleichert F, Botchan MR, Berger JM. Crystal structure of the eukaryotic origin recognition complex. *Nature* 2015; 519(7543): 321-6.