

5 细胞周期调控 朱学良老师  
(本文档由药物研究所李双渠根据前人资料整理)

(了解)细胞的命运:增殖、分化、衰老/老化、死亡(凋亡,坏死,焦亡,自噬性死亡等)、永生化。

衰老,自然发生过程。老化,未必一定跟时间有关系,例如早衰。

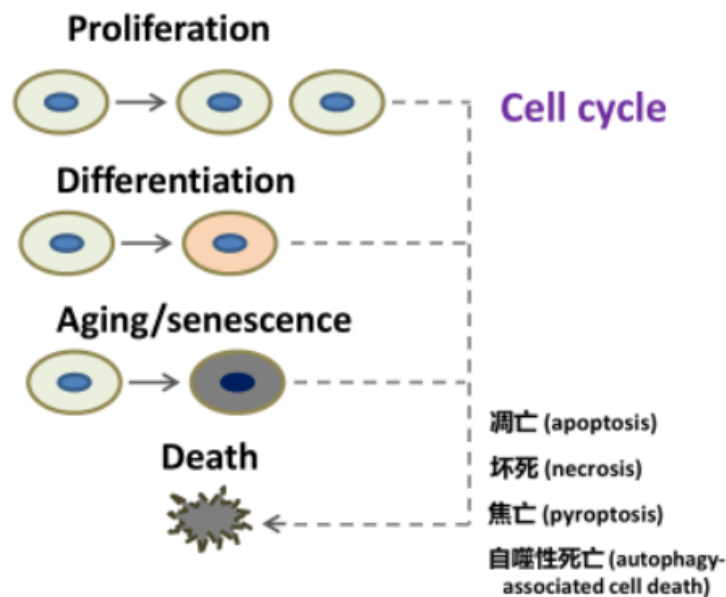
永生化,某种程度上认为单细胞生物是不死的。

1.细胞凋亡:指为维持内环境稳定,由基因控制的细胞自主的有序的死亡。

2.细胞坏死:长期以来细胞坏死被认为是因病理而产生的被动死亡,如物理性或化学性的损害因子及缺氧与营养不良等均导致细胞坏死。

3.细胞焦亡:又称细胞炎性坏死,是一种程序性细胞死亡,表现为细胞不断胀大直至细胞膜破裂,导致细胞内容物的释放进而激活强烈的炎症反应。细胞焦亡是机体一种重要的天然免疫反应,在抗击感染中发挥重要作用。细胞焦亡是由gasdermin(消皮素)介导的细胞程序性坏死。

4.自噬性死亡:是一种非凋亡性的程序性细胞死亡,其特征是在垂死细胞中利用自噬小体对细胞内容物进行降解。是胞质溶胶和细胞器被隔离到双层膜的小泡中,由此运送到溶酶体/空泡中降解,并使因此形成的大分子进行再循环的一个过程。



## I.基本概念

### 1.细胞必须能够复制

#### 1.1 细胞周期的阶段

##### (1) 间期:

G1: cell growth 细胞生长

S: DNA synthesis DNA 合成

G2: fidelity check 保真度检查

##### (2) 分裂期(M phase):

###### a.有丝分裂(mitosis):

Prophase (前期)、Prometaphase (前中期)、Metaphase (中期)、

Anaphase (后期)、Telophase (末期)

###### b. 胞质分裂(cytokinesis):

细胞周期外的状态 G0 (Quiescent stage), 暂时离开细胞周期, 停止细胞分裂, 去执行一定生物学功能的细胞所处的时期。

终末分化细胞, 不具备回到细胞周期的能力, 长期处于 G0, 例如神经元, 血管上皮纤毛。

2. 细胞必须对环境敏感

a. 在适宜的条件下快速复制; b. 在恶劣的条件下自我保护; 这依赖于各种膜受体对环境进行感知。

3. 细胞复制必须足够精确, 但不必完美

How to guarantee accuracy?

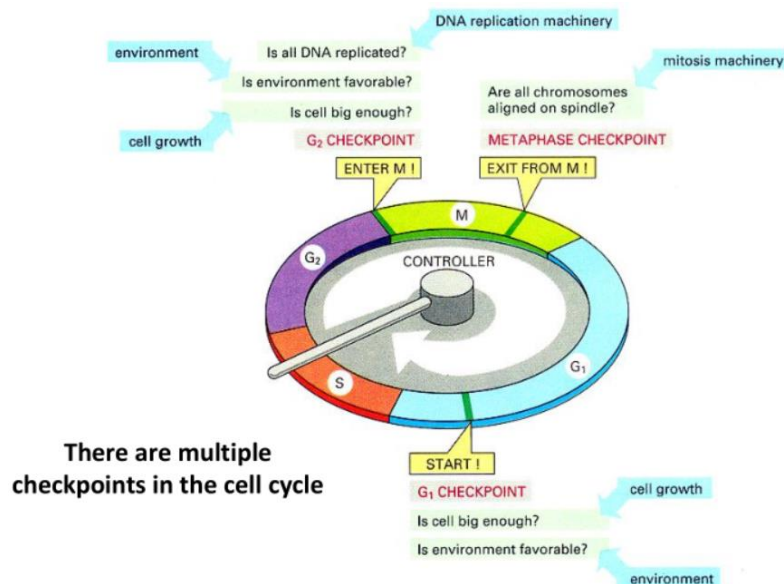
Perfection of machinery

Quality control (checkpoint)

3.1 复制足够精确——保证遗传的忠实性

复制不够完美——保证变异的存在, 实现生物多样性

3.2 细胞周期的检查点



(1) G<sub>1</sub> 检查点 (START):

检查细胞生长状况和环境因素是否适宜——细胞体积足够大吗? 环境有利于细胞增殖吗?

(3) G<sub>2</sub> 检查点 (决定是否进入 M 期)

检查 DNA 复制机制、环境因素及细胞生长状况——所有 DNA 都完成复制了吗?

环境因素有利于细胞增殖吗? 细胞足够大吗?

(3) 中期检查点 (决定是否退出 M 期)

检查有丝分裂机制是否正常——是否所有的染色体都附着于纺锤体上?

4. 细胞周期事件必须是高度有序的

(1) 细胞周期始终按照 G<sub>1</sub>-S-G<sub>2</sub>-M 的顺序依次、往复进行。

(2) 各阶段是依赖于其他阶段的:

M 期依赖 S 期: 阻断 S 期, 细胞不能进入 M 期;

S 期依赖 M 期: 阻断 M 期, 细胞不能进入 S 期。

(3) 例外: 多线染色体无 M 期如果蝇, 蛙早期卵裂无 G<sub>1</sub>。

细胞周期调控的两种假说:

A.多米诺骨牌模型:一旦有始发因素,细胞周期即可按次序完成

B.检查点模型:只有顺利通过各个检查点,才能顺利度过整个细胞周期

## II 酵母细胞周期

### 1.类别

总的来说,在环境营养充足时,酵母进行营养生长;在饥饿时,孢子形成。

具体来说,酵母分为出芽酵母和裂殖酵母。

#### a. 裂殖酵母 (FISSION YEAST) 的细胞周期

一些菌株可以二倍体形式进行增殖。多数菌株可通过接合作用形成四倍体,其后迅速通过减数分裂产生孢子。在营养匮乏时,孢子可通过接合作用形成二倍体;营养充足时,这些孢子可通过有丝分裂进行增殖。

#### b. 出芽酵母 (BUDDING YEAST) 的细胞周期:

营养充足时,二倍体细胞 ( $2n$ ) 正常增殖,进行营养生长;营养匮乏时,二倍体细胞通过减数分裂,出芽产生孢子 ( $n$ )。一些在孢子产生后迅速结合形成二倍体,很多实验广泛使用的菌株能以单倍体的形式进行增殖。

【接合作用】: conjugation 当细胞与细胞、或细菌通过菌毛相互接触时,质粒 DNA 就可从一个细胞(细菌)转移至另一细胞(细菌),这种类型的 DNA 转移称为接合作用。

### 2.细胞周期中的形态变化

#### a. 裂殖酵母:均匀地分裂

#### b. 出芽酵母:不均等分裂,芽生

### 3.温度敏感型突变体 Temperature-sensitive (ts) 是研究酵母细胞周期的重要方法

#### a.什么是 ts 突变体?

在允许温度(如  $25-30^{\circ}\text{C}$ )下,细胞正常分裂;在限制性温度(如  $34-37^{\circ}\text{C}$ )下,细胞不能正常完成细胞周期。

#### b.如何获得 ts 突变体?

(1)首先,诱变剂对大量菌株进行诱变;

(2)在允许温度下涂板,菌株扩增一段时间后,对母板通过“影印”产生复板;

(3)母板和复板菌株分别在允许温度和限制性温度下培养;

(4)突变体鉴定:筛选出母板中正常生长,而复板对应位置不生长的菌株;

(5)表型分析、基因型分析及基因克隆;

(6)分子机制研究

通过以上方法,筛选出了 Cdc 突变体,这些突变体会影响酵母正常的细胞分裂周期。

### 4. 影响酵母细胞周期的基因

同一功能的基因常常具有不同的通用术语,如裂殖酵母的 *cdc2* 和出芽酵母的 *CDC28*, 它们的功能其实是相同。

#### a.Cdc2 对于酵母有丝分裂是一个关键基因

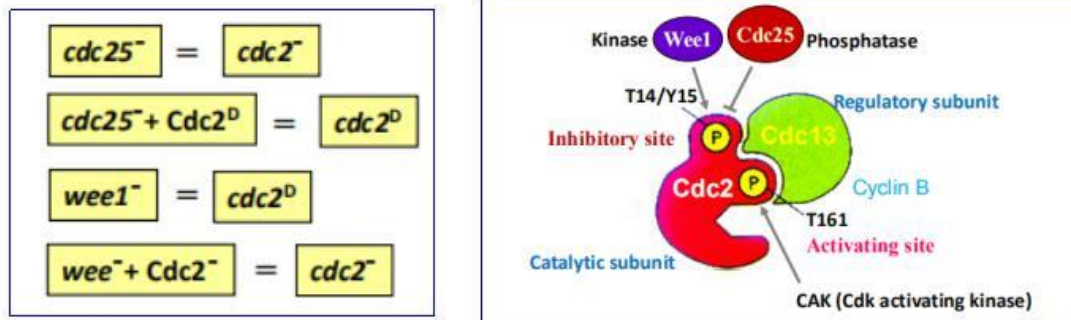
(1)表型: Cdc2 D 突变体过早进入 M 期; Cdc2-突变体不能进入 M 期。

(2)通路分析表明, Cdc2 D 突变体就是 *wee1-* 突变体, Cdc2 - 突变体就是 Cdc25-突变体。

b. Cdc2 和 Cdc13 组成的异二聚体,是从酵母到哺乳动物均保守的 S/T 蛋白激酶。

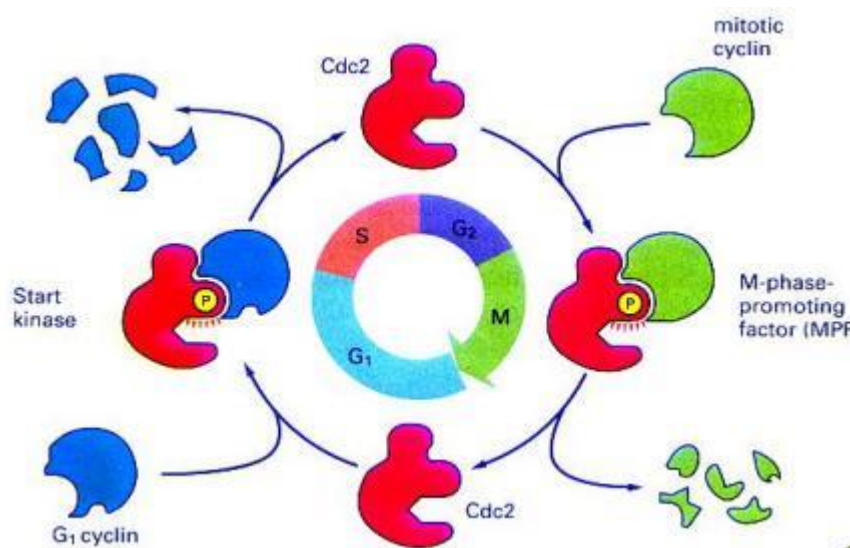
Ser/Thr 蛋白激酶是由 Cdc2 和 Cdc13 所组成的异二聚体,它从酵母到哺乳动

物均保守。具体为：Cdc2 是激酶的催化亚基，Cdc13 是激酶的调节亚基。Cdc2 含有两个磷酸化位点，分别是抑制性位点和激活性位点。抑制性位点被 Wee1 磷酸化，被 Cdc25 去磷酸化；激活位点被 CAK（Cdk 激酶）磷酸化。CDK 是周期蛋白依赖性蛋白激酶(cyclin-dependent kinase)。它包括了 cdc2、CDK2、CDK3 等。由于 cdc2 第一个被发现，在命名上显得特殊。



b. 裂殖酵母的细胞周期受到 Cdc2 激活周期的驱动

- (1) 在 G1 期，G1 cyclin 的表达水平缓慢升高，与起始 Cdc2 激酶结合，促进 Cdc2 的活性，这使得细胞顺利度过 G1 期。
- (2) G1 期后，G1 cyclin 迅速降解，暴露出 Cdc2 的 cyclin 结合位点，与此同时，有丝分裂 cyclin 的表达逐渐增加，并且通过与 Cdc2 结合赋予后者催化活性。
- (3) 激活的 Cdc2-Mitosis cyclin 作为 M 期促进因子（MPF），帮助细胞顺利进入 M 期。
- (4) 此后，有丝分裂 cyclin 迅速降解，Cdc2 重新回到起始状态，辅助细胞进入新一轮有丝分裂的 G1 期。



### III 更高等生物的细胞周期

#### 1. 更高等生物的细胞周期需要更复杂的调控机制

高等生物是多细胞生物，需要细胞内“个人主义”与细胞间“集体主义”的权衡，这依赖于特有的调控机制。

#### 2. 多种周期素依赖的激酶（Cdks）参与了细胞周期进程☆

(注：Cdk1 即裂殖酵母的 Cdc2 的同源蛋白)

在特定细胞周期中，一种 Cyclin 蛋白的含量缓慢升高，在其发挥功能的阶段与相应 Cdk 形成功能复合体；到下一个特定的时间，该 Cyclin 又急剧下降。一种 Cyclin 的下降伴随另一种 Cyclin 的上升和另一种 Cdk-Cyclin 复合物的形成，后者推进细胞周期下一阶段的前行。具体如下：

G1 期：CDK2-CyclinE； S 期：CDK2-CyclinA

G2 期：CDK1-CyclinA； M 期：CDK1-CyclinB

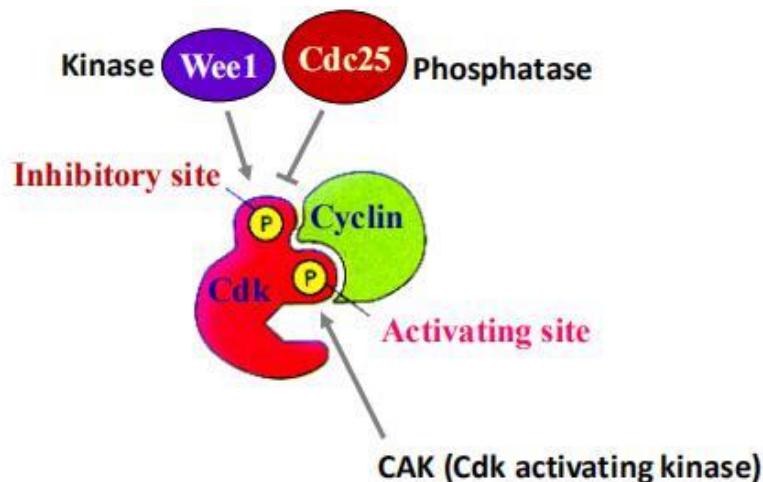
3.周期素水平是如何波动的？

蛋白水平=生成速率-降解速率

(1)特定时期特定基因表达的控制；(2)快速的蛋白酶介导的降解；

4.酵母调节 Cdk 活性的机制在高等动物中是保守的

同酵母类似，Cyclin 作为调节亚基，Cdk 作为催化亚基。在 Cdk 中分别存在抑制性和激活性两个磷酸化位点。



5.Cdk 抑制因子 (Cki) 的存在扩展了高等动物细胞周期的调节层次

对于不同的 Cdk-Cyclin 复合物，存在多种内源性的抑制因子。

例如：Cip/Kip 抑制 CDK1-CyclinB、CDK2-CyclinE、CDK2-CyclinA 复合物，INK4 CKIs 抑制 CDK4/6-CyclinD 复合物。

6.多层次的调控实现了对 Cdk 活性的严密控制

(1)Cyclin 的表达水平；

(2)对 Cdk 抑制、激活磷酸化位点的调控；

(3)Cdk 抑制因子对 Cdk-Cyclin 复合体活性的调控。

总结☆：

(1) CDK 即周期蛋白依赖性蛋白激酶，是一组丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，CDK 通过对丝氨酸/苏氨酸蛋白的化学作用驱动细胞周期，和周期蛋白 cyclin 协同作用，CDK 与细胞周期蛋白结合才具有激酶的活性，是细胞周期调控中的重要因子。

(2) CDK 可以和 cyclin 结合形成异二聚体，其中 CDK 为催化亚基，cyclin 为调节亚基，不同的 cyclin-CDK 复合物，通过 CDK 活性，催化不同底物磷酸化，而实现对细胞周期不同时相的推进和转化作用。

(3) CDK 的活性依赖于其正调节亚基 cyclin 的顺序性表达和其负调节亚基 CKI(CDK 抑制因子)的浓度。同时，CDK 的活性还受到磷酸化和去磷酸化，以及癌基因和抑癌基因的调节。

(4) 激活的 CDK1 可将靶蛋白磷酸化而产生相应的生理效应，如将核纤层蛋白



磷酸化导致核纤层解体、核膜消失；使组蛋白 H1 磷酸化，染色质凝聚；核仁蛋白磷酸化、核仁解体；以及微管结合蛋白磷酸化使微管重排，促进纺锤体形成，有丝分裂器形成。

(5) 当细胞退出 M 期使 CyclinB 降解，激酶失活，各种底物去磷酸化，促进染色体的凝集、核膜核仁重建，引导细胞进入 G1 期。这些效应的最终结果使细胞周期不断运行。

#### IV. G1/S 期转换的调控☆

##### 1. 细胞周期的主要检查点在 G1 后期

(1) 能感知细胞生长 (cell size) 和环境是否有利。

(2) 高等哺乳动物 (Higher animal cells): 还能感知: 细胞因子信号、细胞密度及 DNA 突变情况。一旦 G1/S 检查点功能异常, 就可导致细胞个体功能异常。如: 肿瘤发生。

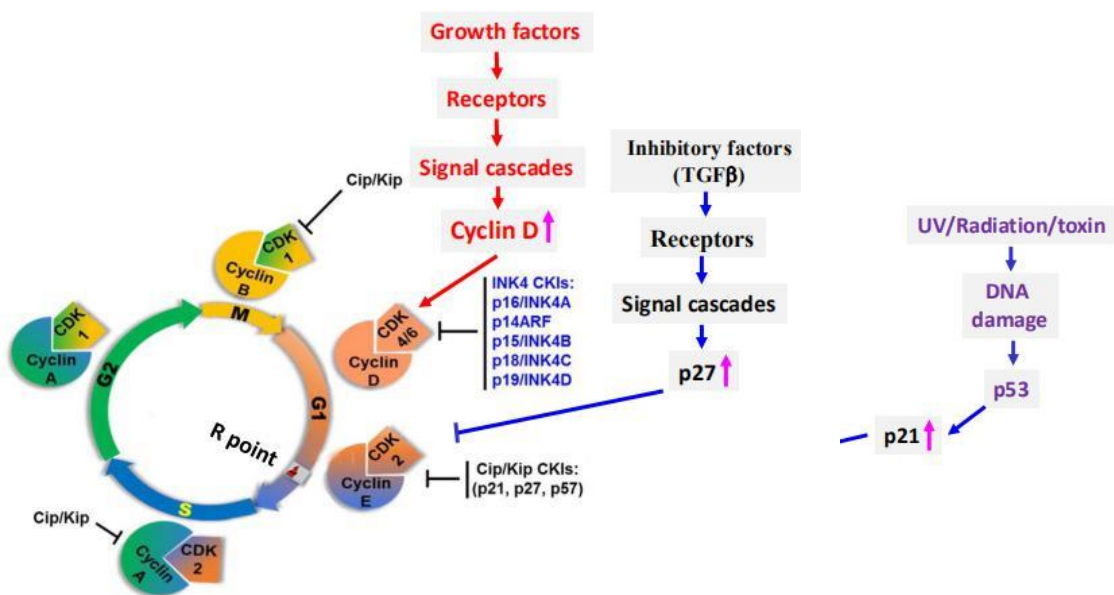
(3) 对单细胞生物 (Unicellular organisms): 则根据环境 (营养还是饥饿) 表现出抗逆性, Vegetative growth (营养生长) 或者 Sporulation (孢子形成)

##### 2. 多种信号通路调控 Cdk 在 G1 的激活

(1) 生长因子—受体—信号级联—CyclinD 表达↑—促进 CDK4/6-CyclinD 活性。

(2) 抑制因素 (如 TGFβ)—受体—信号级联—p27 上调—抑制 CDK2-CyclinE。

(3) UV/毒物—DNA 损伤—p53—p21 上调—抑制 CDK2-CyclinE, 从而监督基因组的保真度。



#### 控制细胞周期的 p53 通路☆

正常情况下, p53 处于不断合成和快速降解的动态平衡中。

电离辐射、紫外等引发 DNA 损伤的情况下, p53 的稳定性增强, 进而通过下游 MDM2、p21 分子引发 G1/G2 期的细胞周阻滞, 利用这段时间 p53 下游的 GADD45 调动 DNA 损伤修复系统对的损伤修复系统对的 DNA 进行修复, 修复完成后, 细胞继续细胞周期的推进; 若修复不能完成, 则调动 Bax 等促进凋亡分子引发细胞凋亡。

##### 3. G1 检查点监测细胞大小

(1)细胞体积得到准确控制,可保证所有子代大小适中;但细胞体积失控时,细胞或者过早分裂导致子代不断变小,或者延迟分裂导致子代细胞体积不断变大。

(2)如何设计实验验证 G1 检查点对细胞体积的检测及控制?

实验组:在 G1 检查点阶段,吸除细胞的部分胞质,观察到延迟分裂,最终子代细胞大小得以正常。

对照 1:在非 G1 检查点阶段,吸除细胞的部分胞质,细胞分裂不延迟,子代细胞变小。

对照 2:不做胞质吸除处理,细胞正常分裂,子代细胞大小正常。

#### 4.控制 G1/S 转换的通路

G1 检查点对细胞大小、环境因素、DNA 突变情况进行监测,监测无误后,G1 期 Cdk 充分活化,磷酸化下游底物从而度过 R 检查点。

5.决定 R 点能否越过的最关键 Cdk 底物: Rb (Retinoblastoma protein )

Rb 是第一个发现的肿瘤抑制基因

(1)对 Rb 的认识最早源于视网膜母细胞瘤。这是一种常见多发幼年眼内恶性肿瘤,Rb 是视网膜母细胞瘤抑制基因。

(2)对视网膜母细胞瘤患者进行基因型及流行病学分析,可将该肿瘤为两种:

##### a.家族型

家族遗传性疾病。50%为野生纯合子,50%为杂合子,杂合子约 90%可患双侧肿瘤。基因分析显示这些患者发生了杂合性缺失,从而产生 Rb 的双拷贝缺失。Loss of heterozygosity (LOH) 即杂合性丢失,可引起肿瘤:只有当抑癌基因的两个等位基因都失活时,肿瘤才会发生。

##### b.散发型

非家族遗传病,多为单侧肿瘤。患者存在 Rb 的双拷贝缺失突变。

(3)Rb 是 R 点的主要“守门人”

CDK-CyclinD 磷酸化 Rb,使得 R 点得以顺利度过。Rb 表达异常或功能紊乱,细胞周期就会失控。

Rb 的失常机制:

##### a. 缺失突变

一旦 Rb 发生缺失突变,细胞周期的调控就会不受控制地进行。在肿瘤中,广泛地存在着 Rb 突变。

##### b. 病毒转化蛋白通过相互作用使 Rb 失活:

多种肿瘤病毒(如多种肿瘤病毒(如 SV40、腺病毒、乳头瘤病毒等)在感染宿主细胞后,通过其病毒蛋白(如大 T 抗原、E1a、E7 等)与 Rb 的 T-binding domain 相互作用,干扰 Rb 的“守门人”功能,从而介导肿瘤发生。

T-binding domain 对于 Rb 的抑癌作用十分关键。Rb 可能通过此 TBD 扣住某个在 G1/S 期转化起关键作用的蛋白，发挥“守门员”功能。研究表明该蛋白是 E2F 转录因子。

(4) E2F 是受 Rb 控制的主要转录因子

在 G1 早期，在 Rb 未被磷酸化时，Rb 扣住 E2F；当 Rb 被磷酸化，E2F 被释放，结合 DNA，引发 E2F 下游很多靶基因的转录。这些靶基因对 S 期是十分重要的。

E2F 靶基因功能：

a. DNA 合成及染色体组装：TK、PCNA、组蛋白 H2A

b. 细胞周期调控：CyclinA、E、D1、p107、Rb、E2F1

c. 原癌基因：C-myc、N-myc、B-myc

(5) 事实上，以上故事仅是一个简化版本

a. 存在多种 E2Fs

b. Rb 还有两个同源蛋白，p107 和 p130

c. Rb 家族还受到表观遗传机制的调控

## 细胞分裂

1. M 期（有丝分裂期）：

有丝分裂是高效和精准的：染色体均匀分离，完成约一小时。

将分裂期间复制的 DNA 以染色体的形式平均分配到两个子细胞中去，使每个子细胞都得到一组与母细胞相同的遗传物质。

含丰富微管（MT）的纺锤体在 M 期形成。

微管是一种具有极性的细胞骨架。微管是由  $\alpha$ 、 $\beta$  两种类型的微管蛋白亚基形成的微管蛋白二聚体，由微管蛋白二聚体组成的长管状细胞器结构。

微管结合蛋白（microtubule associated proteins, MAPs）的主要功能是：

① 促进微管聚集成束；② 增加微管稳定性或强度；③ 促进微管组装。

微管组织中心（microtubule organizing center, MTOCs）是微管进行组装的区域，着丝粒、成膜体、中心体、基体均具有微管组织中心的功能。

微管蛋白以环状的  $\gamma$  球蛋白复合体为模板核化、先组装出（-）极，然后开始生长，因此中心体周围的微管（-）极指向中心体，（+）极远离中心体。

M 期分为六个阶段，其主要特征为：

前期：染色体开始凝聚、纺锤体开始形成、核膜完整

前中期：核膜破裂，染色体未完成排列

中期：染色体完全排列在赤道板上

后期：染色单体分离

末期：染色体解凝聚，核膜重新形成

胞质分裂：缢缩环形成至子细胞分离

2. 纺锤体（spindle）

微管是动态的细胞骨架



**微管的组装与去组装：**微管在体外的组装过程可分为成核和延伸两个阶段。

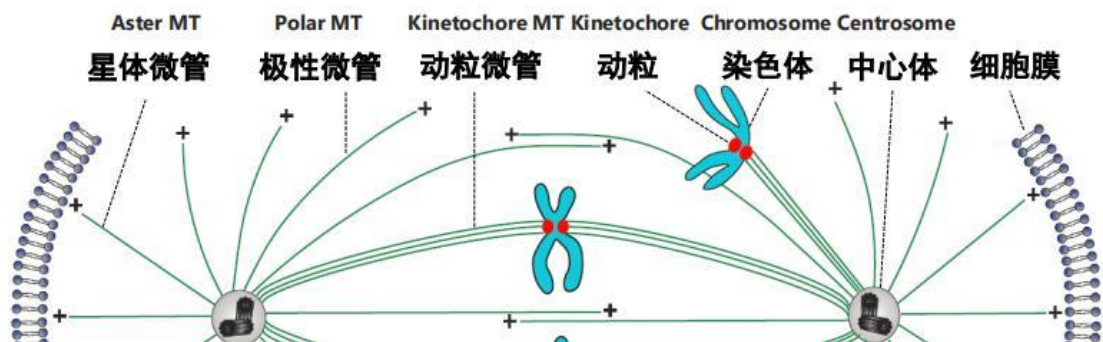
- ①一些微管蛋白( $\alpha$ 微管蛋白和 $\beta$ 微管蛋白)组装为二聚体( $\alpha\beta$ 二聚体);
- ②纵向聚合形成短的丝状结构(原纤维),即所谓的成核反应;
- ③然后通过两端以及侧面增加二聚体而扩展成片状,当片状聚合物加宽到大致13根原纤丝时,即合拢成为一段微管(微管)。新的微管蛋白二聚体不断地组装到这段微管的两端,使之延长。

目前的微管装配动态模型认为,微管两端具 **GTP 帽**(取决于微管蛋白浓度),微管将继续组装,反之,具 **GDP 帽**则解聚。在一定条件下,微管一端发生装配使微管延长,而另一端发生去装配而使微管缩短,称为踏车现象。

构成纺锤体的纤维是由成束的微管和与之相结合的蛋白质组成的。

纺锤体和动粒形成了有丝分裂器

纺锤体是产生于细胞分裂前初期(Pre-Prophase)到末期(Telophase)的一种特殊细胞器。其主要元件包括微管(Microtubules),附着微管的动力分子马达(Molecular motors),以及一系列复杂的超分子结构,如下图所示。



一般来讲,在动物细胞中,中心体也是纺锤体的一部分。植物细胞的纺锤体不含中心体。而真菌细胞的纺锤体含纺锤极体(Spindle Pole Body),一般被视为中心体的同源细胞器。

纺锤形的形态可以因细胞或生物体而异

无中心体的纺锤体:卵,植物,纤毛虫类,扁型虫

纺锤体可以进行自我组装

基于微管的分子马达对纺锤体组装具有决定性作用

驱动蛋白(kinesin)能利用 ATP 水解所释放的能量驱动自身及所携带的货物分子沿微管运动的一类马达蛋白,与细胞内物质运输有关。

驱动蛋白的运输具有方向性,从微管的负极移向微管的正极,是正端走向的微管发动机(plus end-directed microtubular motor)。

动力蛋白(dynein)具有物质运输和中心体装配等功能。细胞质动力蛋白可以沿着微管进行性移动,从微管的正极移向微管的负极。

纺锤体中除了微管,还有一些“基质”,纺锤体基质促进了纺锤体的组装

纺锤体是主要由微管形成的纺锤形的动态结构,研究人员利用偶联有蛋白质激酶 Aurora A 的微小磁珠在非洲爪蟾卵抽提物中组装成的纺锤体,证明了富含

生物膜的纺锤体基质 (spindle matrix) 的存在, 并发现 B 型核纤层蛋白 (Lamin) 也是其中的一个重要成分。这种纺锤体基质与微管相辅相成, 前者促进后者形成正常的纺锤体结构, 而后的聚合又增强前者的组装。

另一方面, 纺锤体的正确形成需要胞质动力蛋白 (dynein), 即一种被称作“分子马达”的能够朝向微管负端运动的蛋白质复合物。胞质动力蛋白 dynein 和它的调节因子 Nudel 丰富了纺锤体基质, 在纺锤体基质组装中发挥重要作用, 进而调控有丝分裂纺锤体的正确形成。

纺锤体基质通过蛋白质相变形成

纺锤体微管分支提高了正末端密度, 有利于寻找动粒

### 3. 动粒(kinetochore)

动粒是染色体上的主要微管的附着位点

动粒 (kinetochore) 是真核细胞染色体中位于着丝粒两侧的两层盘状特化结构, 其化学本质为蛋白质, 是非染色体性质物质附加物, 动粒可分为: 内板、中板、外板和纤维冠动粒与染色体的移动有关。

在细胞分裂 (包括有丝分裂和减数分裂) 的前、中、后期等几个阶段, 纺锤体的纺锤丝 (或星射线) 需附着在染色体的动粒上 (而非着丝粒上), 牵引染色体移动、将染色体拉向细胞两极。

动粒在真核生物中形成并在着丝粒上组装。在有丝分裂和减数分裂期间, 丝点将染色体连接到微管聚合物上。

**着丝粒 (centromere)** 是真核生物细胞在进行有丝分裂 (mitosis) 和减数分裂 (meiosis) 时, 染色体分离的一种“装置”, 位于主缢痕 (primary constriction) 内两条姐妹染色单体在分开前相互联结的中心部位。

动粒是超分子细胞器

动粒是位于染色体着丝粒区域的细胞器, 它提供了对于正确的染色体分离至关重要的 MT 附着位点, 作为大多数动物细胞在间期和 M 期的 MTOC。与动力蛋白相关的许多蛋白质, 也与动粒有关。

出芽酵母有最简单的动粒

### 4. 微管-动力相互作用

分子马达是染色体运动的关键

当染色体朝两极移动时, 微管解聚; 远离两极时, 微管聚合。

动力蛋白的失活削弱了动粒向两极的拉力

动力蛋白调节因子 Nudel 的耗竭是否会减少运动中的拉力。为了简化这种情况, 我们用一种名为 monastrol 的药物来处理细胞, 生成单极纺锤体。在这个系统中, 动力蛋白产生拉力使染色体产生极向运动, 而驱动蛋白产生推力则会把染色体背离极点运动。发现动力蛋白的失活会削弱动粒向两极的拉力。

微管知道附着哪侧的动粒吗?

微管连接动粒时, 同极发出的微管可能会黏附在两侧的动粒上, 这样就无法将子染色体平均分配到两极, 这种不正确的微管-动粒附着会在前中期出现。

Aurora B 复合物帮助校正错误的附着。

**微管-动粒附着调控机制:**

当同极发出的微管黏附在两侧的动粒上时, 微管极向运动时, 动粒中无拉力

存在，Aurora B 激酶会造成动粒过度磷酸化，此时微管结合亲和力较弱，微管会从动粒上脱落。

当一极产生的微管正确地黏附在同侧的动粒上时，微管极向运动时，两侧的动粒会向两极移动，动粒中存在拉力，动粒磷酸化水平降低，微管结合亲和力较强，就可保证分裂后期在微管牵拉下子染色体分别向两极移动。

#### 5. 纺锤体检查点

“等待”信号可以防止细胞过早地进行后期启动。

纺锤体组装检查点 (the spindle-assembly checkpoint, SAC) 是泛素连接酶分裂后期促进复合体或循环体 (APC/C) 的一种必要的激活因子，可以阻止染色体分离，直到姐妹染色单体正确地连接于有丝分裂纺锤体上。这一作用是通过使 CDC20 (也叫做 Slp1 或 Fizzy) 失活完成的，它是泛素连接酶分裂后期促进复合体或循环体 (APC/C) 的一种必要的激活因子。而 APC/C 可以促进细胞周期阻滞蛋白的降解。

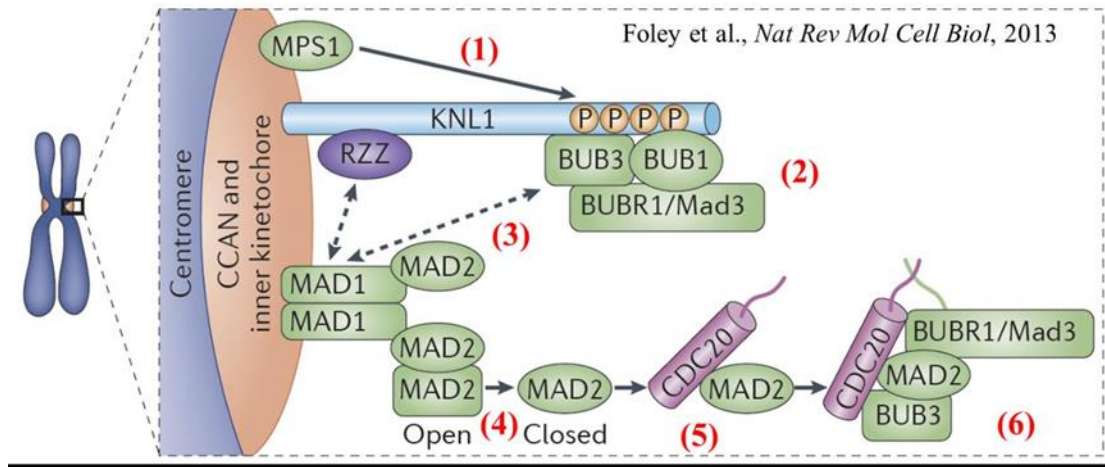
纺锤形检查点保证了适当的分裂后期起始。任何一个动点没有正确连接到纺锤体上，都会影响细胞分裂后期的起始，造成分裂周期中断。

一组检查点蛋白可感知微管-动粒附着的状态

带有未附着或错失附着的染色体的细胞不能启动后期除非纺锤形检查点被破坏。

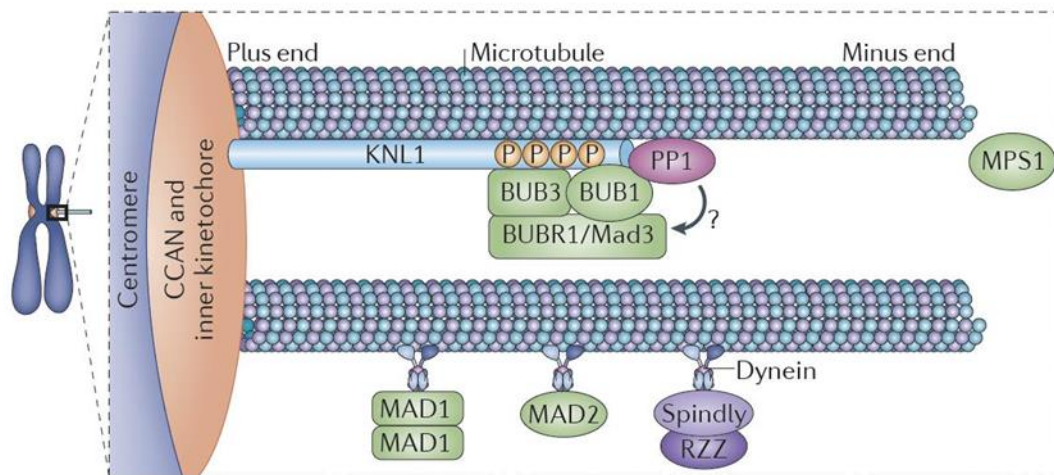
在活细胞中，对照组 HeLa 细胞在 1 小时内经历正常的有丝分裂。与之相反的是，分裂激素耗尽的细胞存在未排列在赤道板上的染色体，分裂中期阻滞随之细胞死亡。

纺锤体检查点机制：



★组成性着丝粒相关网络 (Constitutive centromere-associated network, CCAN)

1. 未结合微管的动粒上 MPS1 磷酸化 KNL1;
2. 磷酸化 KNL1 结合 Bub1 和 Bub3, 招募 BubR1 和 Mad3;
3. 上述复合物招募 Mad1-Mad2 二聚体;
4. 二聚体将开放状态的 Mad2 催化为关闭状的 Mad2;
5. 关闭状的 Mad2 结合 Cdc20;
6. 进一步结合其它检查点蛋白形成 MCC。



★纺锤体组装检查点（SAC）在动粒的失活

1. MPS1 脱离动粒，使 Bub3 复合物脱离；
2. Dynein 将其它蛋白质搬离动粒；
3. 闭合状的 Mad2 不能产生，对 Cdc20 的抑制消失；
4. Cdc20 激活 APC，降解 Securin 和 Cyclin B。

6. 特殊的细胞分裂

- (1) 果蝇胚胎 (*Drosophila embryo*) 有丝分裂同步化
- (2) 上皮细胞的极性细胞分裂: 核间迁移
- (3) 干细胞的不对称细胞分裂 (干细胞自我更新和命运决定)
- (4) 细胞分裂的不对称性是由细胞内外环境共同决定。

7. 有丝分裂纺锤体是高度动态的。
8. 基于微管的分子马达是有丝分裂的必要条件。
9. 在 M 阶段中被阻滞的细胞会发生什么情况？

有丝分裂细胞死亡

无细胞分裂的有丝分裂 (多倍体)

分裂异常的有丝分裂 (非整倍体)

接下来细胞周期 G1 阻滞 (死亡, 衰老或肿瘤发生)

往年考题

2007 年 【不太确定年份】 【有些知识没学】

Four proteins, p21, p53, ARF and MDM2, constitute a major tumor suppression pathway. Describe how this pathway works in a sequential order (20 points).

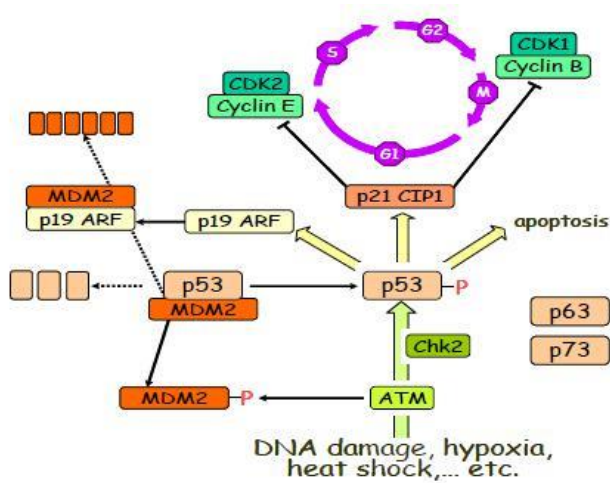
Including:

- (1) how this pathway is activated
- (2) the biological and biochemical property of each gene product
- (3) how each step is regulated biochemically (be specific, e.g. transcription, translation, protein transport, degradation, enzyme inhibition etc.)
- (4) the consequence on cell cycle when this pathway is activated and how one can test that



(5) Three genes on this pathway, ARF, MDM2 and p53, have been found to be altered in human cancer. Describe the type of mutations found for each gene and the consequences caused by the mutations.

(1) 模式图



这种途径通常被 DNA 损伤所激活，特别是由辐射、缺氧、热休克等引起的 DNA 损伤。

(2) 各基因表达产物性质：

**P53:** 转录因子，肿瘤抑制因子；

**P21:** Cdk2/Cdk1 抑制因子，通过结合 CDK/细胞周期蛋白复合物发挥功能

**ARF:** mdm2 拮抗因子，诱导 SCF 介导的 mdm2 降解；

**MDM2:** p53 抑制因子，招募未磷酸化的 p53，SCF 介导的降解。

(3)通常 mdm2 与 p53 结合后从细胞核中输出 p53,通过 SCF/APC 诱导 p53 降解。DNA 损伤激活 ATM/ATD 激酶，启动两条磷酸化 p53 的平行通路。一是直接磷酸化 Mdm2;另一种是通过激活 Chk2 激酶使 p53 磷酸化。这两种磷酸化都将 p53 从 mdm2 中解离，激活其 DNA 结合能力。激活的 p53 转运进入细胞核，启动多个检查点关键蛋白的转录。P53 驱动的 p21 表达与 Cdk/cyclin 复合物结合，抑制其活化。否则，活化 p53 驱动的 p19ARF 与 Mdm2 结合，启动 apc 介导的降解。

(4) 细胞周期停滞在 G1/S 或 G2/M 期。将细胞暴露于 DNA 损伤应激下，如 UV 或 gama 辐射，然后对表达的周期相特异性蛋白进行时间-过程定量分析。或通过细胞仪和共聚焦分析 DNA/染色体动态变化 。

(5)

	Mutation type	Corresponding cancer
<b>P53</b>	Overexpression of missense mutant in DB domain	Over 80% tumor genesis
<b>ARF</b>	exon 1β missense mutations	familial melanoma and astrocytoma, colon, etc.
<b>Mdm2</b>	Overexpression;abnormal alternative splicing caused by missense, nonsense and frame shift	soft tissue tumors, osteosarcomas and esophageal carcinomas, testicular germ cell cancers and neuro-blastomas.



1. 列举两个关于蛋白质磷酸化在细胞周期调控中作用的事例？（朱学良-2016）

Please provide two examples explain the importance of protein phosphorylation in cell cycle （朱学良-2017）

(1)蛋白激酶CDK2 是启动DNA 复制的关键激酶。研究表明细胞由G1 期进入S 期需要cyclinE 及CDK2 的共同参与。在G1 后期，cyclinD 合成、积累，与蛋白激酶CDK4或CDK6 相结合，激活CDK4 或CDK6 的蛋白激酶活性，使Rb 蛋白磷酸化，导致受Rb蛋白调控的转录激活因子E2F 解阻遏，E2F 诱导cyclinE 和CDK2 的表达，二者的结合也将促使Rb 的磷酸化，使更多的E2F 从Rb 上释放出来，形成一个正反馈回路。cyclinE/CDK2 的活性在G1/S 转换过程中达到最高，它是启动细胞进入S 期的主要事件。cyclinE/CDK2 可以促使cyclinA 的转录，使S 期的CDK 在G1 期末很快被激活。从而完成G1/S 期的转换。

(2)电离辐射或拟放射线断裂剂造成DNA 双链断裂时，ATM 被激活，并对其底物进行磷酸化，主要是p53 和Chk2。磷酸化的结果是激活两条信号传导途径，其中一条的功能是启动G1/S 阻滞，而另外一条的功能是维持G1/S 阻滞。G1/S 阻滞的启动首先是Chk2 的磷酸化激活，活化的Chk2 磷酸化Cdc25A，磷酸化的Cdc25A 不能进入到细胞核中，并被泛素介导的蛋白水解作用降解，从而失去活性。失活的Cdc25A 不能使Cdk2活化，相应的Cdc25 不能磷酸化激活，因而不能启动复制过程。紫外线和拟紫外线断裂剂造成的DNA 损伤则激活ATR、Rad17-RFC 和9-1-1 复合物，ATR 继而磷酸化激活Chk1。激活的Chk1 继而磷酸化Cdc25A，导致G1 期阻滞。

2. The transition between the G1 and S phases is regulated by G1 cyclin/CDKs in mammalian cells. Describe how the CDK2 kinase activity is primarily regulated by growth factors during this transition? If the DNA within the cells is damaged by UV or gamma-irradiation, how the cells prevent the activation of CDK2 kinase activity to induce the cell cycle arrest in G1

哺乳动物细胞中G1期和S期之间的过渡是由G1细胞周期蛋白/CDKs调控的。描述CDK2激酶活性在这个转变过程中主要是如何被生长因子调控的？如果细胞内的DNA被紫外线或伽玛射线照射破坏，细胞如何阻止CDK2激酶活性的激活，诱导细胞周期阻滞在G1

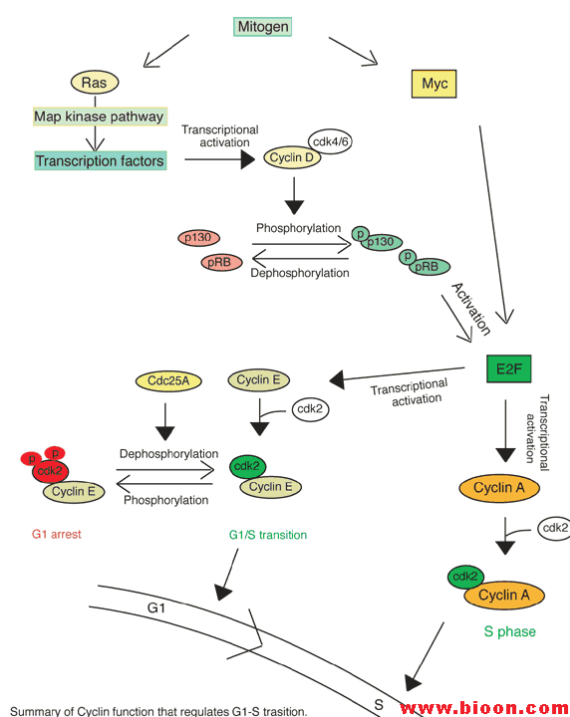
答案参考一：

(1)蛋白激酶 CDK2 是启动 DNA 复制的关键激酶。研究表明细胞由 G1 期进入 S 期需要 cyclinE 及 CDK2 的共同参与。在 G1 后期，cyclinD 合成、积累，与蛋白激酶 CDK4 或 CDK6 相结合，激活 CDK4 或 CDK6 的蛋白激酶活性，使 Rb

蛋白磷酸化，导致受 Rb 蛋白调控的转录激活因子 E2F 解阻遏，E2F 诱 cyclinE 和 CDK2 的表达，二者的结合也将促使 Rb 的磷酸化，使更多的 E2F 从 Rb 上释放出来，形成一个正反馈回路。cyclinE/CDK2 的活性在 G1/S 转换过程中达到最高，它是启动细胞进入 S 期的主要事件。cyclinE/CDK2 可以促使 cyclinA 的转录，使 S 期的 CDK 在 G1 期末很快被激活。从而完成 G1/S 期的转换。

(2) 电离辐射或拟放射线断裂剂造成 DNA 双链断裂时，ATM 被激活，并对其底物进行磷酸化，主要是 p53 和 Chk2。磷酸化的结果是激活两条信号传导途径，其中一条的功能是启动 G1/S 阻滞，而另外一条的功能是维持 G1/S 阻滞。G1/S 阻滞的启动首先是 Chk2 的磷酸化激活，活化的 Chk2 磷酸化 Cdc25A，磷酸化的 Cdc25A 不能进入到细胞核中，并被泛素介导的蛋白水解作用降解，从而失去活性。失活的 Cdc25A 不能使 Cdk2 活化，相应的 Cdc25 不能磷酸化激活，因而不能启动复制过程。紫外线和拟紫外线断裂剂造成的 DNA 损伤则激活 ATR、Rad17-RFC 和 9-1-1 复合物，ATR 继而磷酸化激活 Chk1。激活的 Chk1 继而磷酸化 Cdc25A，导致 G1 期阻滞。

不论 G1 期阻滞的启动是通过 ATM-Chk2-Cdc25A 途径还是 ATR-Chk1-Cdc25A 途径，随后都是 p53 介导的 G1/S 期阻滞的维持过程，这一过程是在细胞检测到 DNA 损伤后几个小时后才发生。在 G1/S 期阻滞的维持过程中，ATM 或 ATR 直接磷酸化 p53 的 Ser15，并通过激活 Chk2 或 Chk1，磷酸化 p53 的 Ser20。p53 的磷酸化抑制了它向细胞浆的转运过程和降解过程，致使 p53 含量增加。p53 活化它的下游基因，如 p21 WAF21/Cip1。P21 蛋白是一种周期素依赖蛋白激酶的抑制因子(CDI/CDK)，它能和 Cdk2-CyclinE 复合物结合并能抑制细胞向 S 期进行。P21 也能和 Cdk4-CyclinD 复合物结合，抑制 Cdk4 对 Rb 的磷酸化，当 Rb 处于低磷酸化时，其扣留着大量的转录因子 E2F，使它们不能发挥作用，从而阻断细胞周期的行进。



答案参考二：

A: 生长因子对 CDK2 活性的调节主要是通过对 p27 的调节来完成的。

p27 蛋白具有限制性调节细胞周期进程的作用，这一作用主要通过抑制 CDK 复合物的功能来实现。虽然 p27 能广泛抑制各种周期素和 CDK 的活性，但主要抑制细胞周期蛋白 E-CDK2 和细胞周期蛋白 D-CDK4 等 G1 期激酶复合物，使细胞不能通过 G1 期。p27 对 CDK 的抑制主要有两个方面，一方面通过其 C-末端抑制 Cdk2-Thr160 的磷酸化，从而抑制细胞周期蛋白-CDK2 前活性状态复合物的激活过程。另一方面通过直接与细胞周期蛋白-CDK 结合抑制已激活的复合物的激酶活性。大量体外实验证明，p27 在介导胞外信号尤其是负性信号的传导中起着极其重要的作用。在 TGF- $\beta$ 、接触抑制及多种外源性细胞生长抑制因子处理的细胞系中，p27 蛋白表达量增加，使细胞通过限制点最关键的细胞周期蛋白 E-CDK2 复合物的活性受到抑制，从而使细胞周期停滞在 G1 期，细胞生长停止。研究发现，TGF- $\beta$  处理前后的细胞内 p27 的 mRNA 量无明显变化，但细胞内可获得的游离的 p27 蛋白量增加，这种实际有效数量的释放可能是抑制细胞周期的关键因素。TGF- $\beta$  一方面通过抑制 CDK4 的合成而减少 G1 中期细胞内形成的细胞周期蛋白 D1-CDK4-p27 三元复合物，从而使细胞内可利用的、游离的 p27 相对增加，使 p27 能有效地抑制 G1 后期的细胞周期蛋白 E-CDK2 的复合物活性。同时，CDK4 水平的下降也可通过抑制 Rb 的磷酸化，阻止转录因子 E2F 的释放，从而抑制 DNA 的合成。另一方面，TGF- $\beta$  可能通过抑制细胞周期蛋白 E 的表达而减少 G1 末期细胞内细胞周期蛋白 E-CDK2 的浓度，使细胞内原有的 p27 量足以结合细胞周期蛋白 E-CDK2，将其浓度降低到促进细胞增殖的阈值以下而抑制细胞周期 [2]。Kato 等 [8] 用 cAMP 处理巨噬细胞后，发现 p27 合成增加 2-3 倍，细胞停滞在 G1 期。另外，Peng 等 [7] 报道了在用抗上皮生长因子受体处理的细胞系中，p27mRNA 水平增高，以至 p27 蛋白合成增加，CDK2 活性受抑制，提示在抗增殖信号的作用下，p27 翻译的快速增长对于 G1 期进程的负性调节也是一个不可忽视的方面。

此外，p27 还与正性生长调控因子有关。在血小板源性生长因子处理的 BALB/C3T3 细胞系中，发现 p27 的合成受到抑制。在有丝分裂促进因子白介素-2 (IL-2) 处理的 T 细胞中，游离的 p27 的量明显减少，细胞周期蛋白-CDK2 复合物的活性增加，细胞由 G1 期进入 S 期 [6]。Mal 等 [9] 在 TGF- $\beta$  处理的 Mv1Lu 细胞中发现病毒 E1A 癌蛋白能直接与 p27 结合，阻止其抑制效应，恢复细胞周期蛋白 E/A-CDK2 复合物的活性，促进细胞周期中 G1-S 期的转换。就目前所知，E1A 是第一种能使 CDKI 功能失活的癌蛋白。值得一提的是，p27 缺乏的小鼠可发生垂体肿瘤，并且出现身体增大，多器官增生，视网膜发育异常，卵巢滤泡的形成减弱，雌性小鼠不孕等现象 [5]，提示 p27 可能部分地参与了细胞停止分裂和启动细胞分化的作用。（可参考 PPT 第二部分第 26 面）

B: DNA damage 之后，会激活 ATR 和 ATM 途径来调节细胞周期。具体参考可参考 PPT 第二部分第 46 面

答案为前人所做，PPT 对应页码可能不准确。

