

Lecture 12: Cell Cycle and Checkpoint Control

Honor Biology學生 陳俊鴻

Eukaryotic cell cycle:

1. G₁ phase

在發現了G₂, M, S phase後，將一個週期的時間扣除此三個週期的時間後所推測出的階段。

此時期細胞剛進行完cytokinesis並開始cell growth。

在將G₁和S的細胞融合後，發現G₁細胞被induced開始進行DNA replication，從而推測出G₁ checkpoint的存在。

2. S phase

基因與histone會被複製並且產生sister chromatids。

3. G₂ phase

藉由帶有³H的dATP培養液進行asynchronous culture後，發現細胞並非在DNA replication後馬上開始進行mitosis，而是會隔一段時間，而這個時間便是G₂ phase。

此時期細胞會開始準備進行mitosis，比方說將centrioles, mitochondria等胞器複製，mitotic spindles也是在這個階段產生。

在將G₂和M的細胞融合後，發現G₂細胞被induced進行mitosis，但將S和M的細胞融合後，發現S細胞會因為pulverized chromosomes而停留在G₂不進行mitosis，從而推測出存在G₂ checkpoint的存在，並且倘若DNA有受到破壞，細胞會停在G₂ checkpoint並停止複製。

4. M phase

a. Prophase

在被mitotic Cdk磷酸化的condensin與topoisomerase II的作用下，chromosomes開始condense。此外，sister chromatids之間的連結處含有

cohesin(一種glue protein)，可將sister chromatids黏在一起避免過早地完全分離。不僅如此，sister chromatids也可藉由DNA互相連結，同樣可以避免完全分離。

在進入M phase時，cytoskeleton的microtubules便會被全面性的降解為tubulin，以便源自centrosomes的microtubule透過分別與tubulin和motor protein結合的方式延伸和驅動centrosomes(正確來說是asters)的相互推離。

b. Prometaphase

此時期nuclear envelope消失以利mitotic spindles的延伸，centromeres上的kinetochores也得以與kinetochore protein complex和mitotic spindles上的dynamic microtubules結合。

c. Metaphase

結合在kinetochores上的特定motor proteins (比方說dynein和kinesin-related proteins)與不同速度的addition of tublins和depolymerization of microtubules(形成poleward tublin flux，tublin流動方向是由chromatids往centrosomes)會將chromatids沿著microtubules移動到metaphase plate。在*MAD2* mutant和*CDC20* mutant發現Mad2位於錯誤排列的chromatids上並與Cdc20結合以抑制Anaphase Promoting Complex (APC)的活性，只有在所有chromatids都缺乏Mad2的情況下，APC才會活化並啟動anaphase。不僅如此，也在施予活細胞所有chromosome等張的人為的機械力後，發現可以關閉chromosome的抑制訊息，這個發現證實只有在所有chromosome具有均等的張力時，anaphase才會開始，也就是說在metaphase與anaphase交界之處存在一個spindle checkpoint確認是否染色體分離可以確切地進行。

d. Anaphase

此時期會出現protease分解連接sister chromatids的cohesin和topoisomerase II，使sister chromatids快速地分離並且讓DNA解開supercoiling。此外，chromatid端的microtubules會開始縮短，促使chromatids向兩極移動。

e. Telophase

原先nuclear envelope片段的膜與細胞內的膜會一起在新的chromosomes周圍形成新的nuclear envelope，並成為兩個daughter nuclei；接著，microtubules開始降解，mitosis也就此結束。

5. Cytokinesis

雖然mitosis已然結束，但還未形成完全分離的兩個daughter cells。其實在mitosis結束不久後，細胞還會進行cytokinesis來分離這兩個daughter cells。動物與植物的cytokinesis各異，動物細胞的cytokinesis會在細胞內部以許多的actin filament和少量的myosin filaments II形成contractile ring。Filaments會互相拉引並contract，導致contractile ring會周長縮短而讓細胞膜向內凹陷並在分裂處形成cleavage furrow。當contractile ring縮到極小，原先一個球型的膜便會變成兩個daughter cells的膜。至於植物細胞，會藉由以microtubule為導引的vesicle將未來成為細胞壁和細胞膜的原料運送至中央，形成較簡單的前驅物—cell plate。

Question 1:

Prokaryotes進行mitosis時，如何在沒有cytoskeleton的協助下如何分離chromosomes？

Answer 1:

在只知道細菌無紡錘絲的情況下，François Jacob提出了複製起點anchor在細胞模式[1]，這是再合理不過的，因為就已知的知識中唯一可能做為動力來源的也只有cell elongation。這樣的假設以現在的技術並不難設計實驗，只需要將origin標記並搭配解析度好的顯微鏡和精準的紀錄與分析便能輕易發現chromosome segregation的速度遠比cell elongation快[2]，但François Jacob是在1963年發表這個理論，是不大可能有這樣的技術背景支持他的假說。隨後，在發現replisome會在複製過程中將DNA拉向另一側的情況下，出現了capture-extrusion model來解釋bulk, symmetric segregation卻不能解釋asymmetric segregation[3]，顯然以replisome會在複製過程中將DNA拉向另一側來解釋segregation仍是有些dubious，也許replisome並非是segregation主要的動力來源。在之後許多科學家的努力之下，我們終於可以清楚了解bacterial chromosome segregation，以下便是我個人對於這些機制的統整。

Bacterial chromosome segregation總共可以分成三個階段：origin segregation, bulk chromosome segregation, and terminus segregation。

1. Origin segregation(via the *parABS* partitioning system)

parS是origin附近的一段序列，ParB會與他相結合形成巨大的nucleo-protein complex，這個complex會再與polar anchor PopZ作用將origin綁在cell poles上。在replication開始後，透過parS-bound ParB與ParA (ATP)之間的相互作用，其中一個sister origin會被拉向相反的cell pole，這些作用促

使ParA(ATP)水解並從nucleoid中釋放出ParA(ADP)；隨後，ParB-parS complex再與nucleoid附近的ParA (ATP)結合。

重複循環著結合(parS-bound ParB & ParA (ATP))、水解(ParA (ATP)->ParA (ADP))和釋放(ParA (ADP))則導致ParB-parS complex向cell pole逐步移動，並在其尾部釋放ParA-free nucleoid。這種diffusion-ratchet mechanism就是使ParB-parS complex藉由nucleoid衝向cell pole的機制。[5], [6]

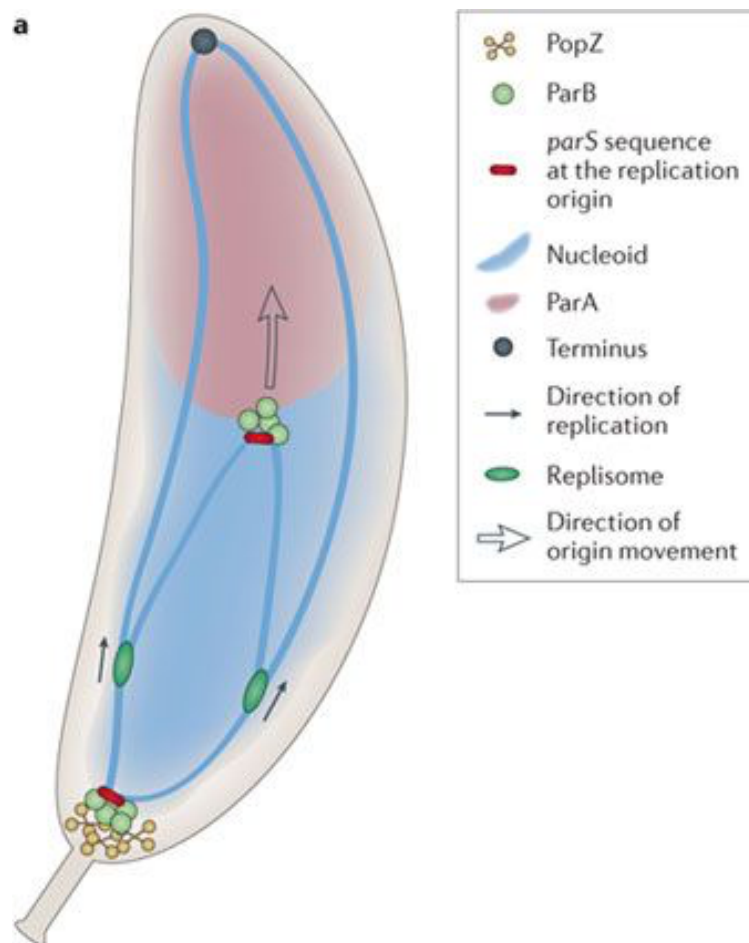


Fig. 1 Origin segregation via parABS partitioning system

2. Bulk chromosome segregation

在新複製的origin分離後，由supercoiling, small nucleoid-associated proteins 和the structural maintenance of chromosome (SMC) complexes調節的 lengthwise condensation與replication同步進行，從而驅使sister chromosomes的disentanglement和segregation。[5], [6]

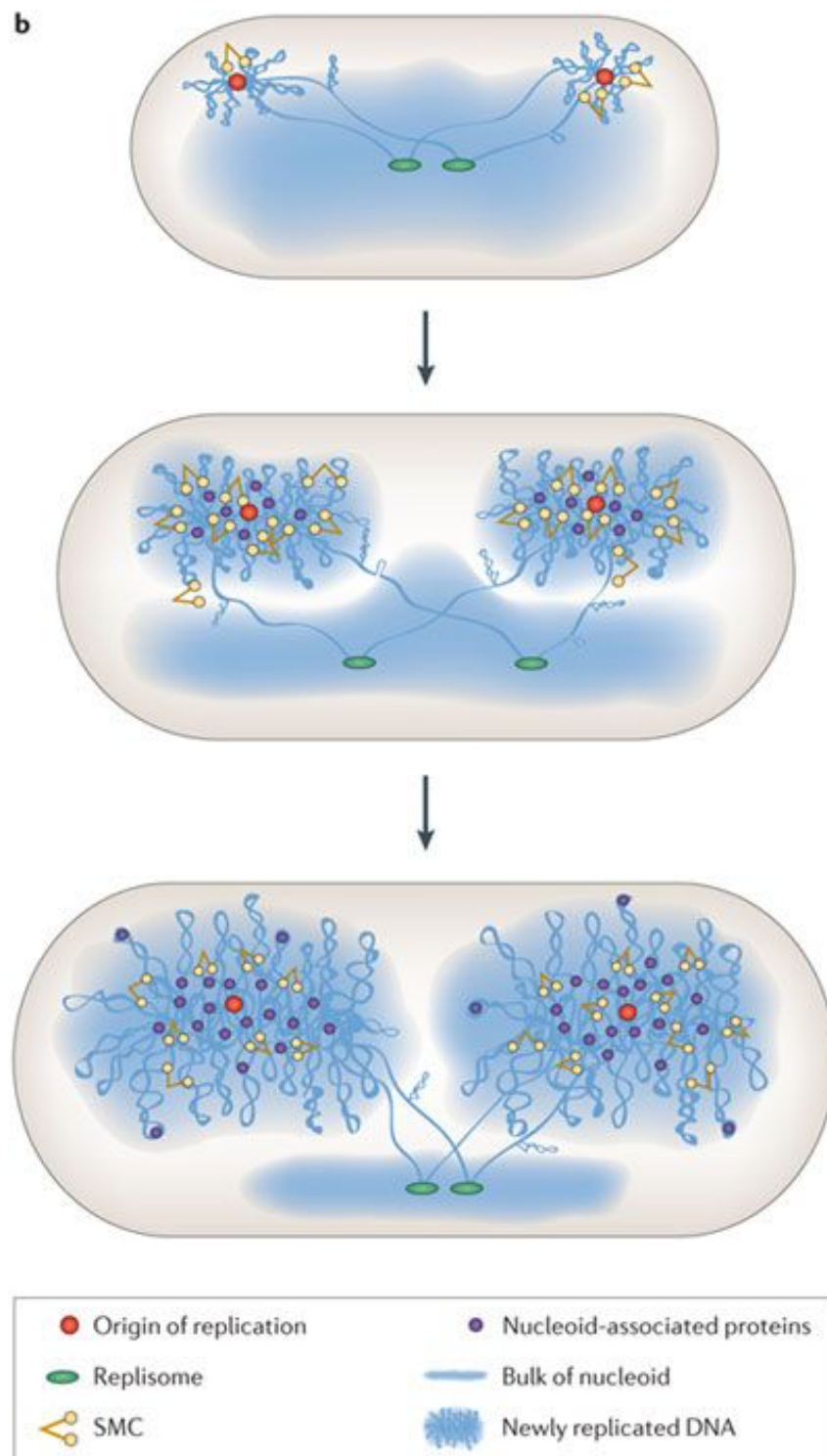


Fig. 2 Bulk chromosome segregation with SMC proteins

3. Terminus segregation

複製後的terminus透過FtsK DNA translocase轉移到適當的子細胞中，而topoisomerase IV和XerCD分別分辨catenanes和chromosome dimers。FtsK只會位於division septum並參與cytokinesis和DNA segregation。[5], [6]

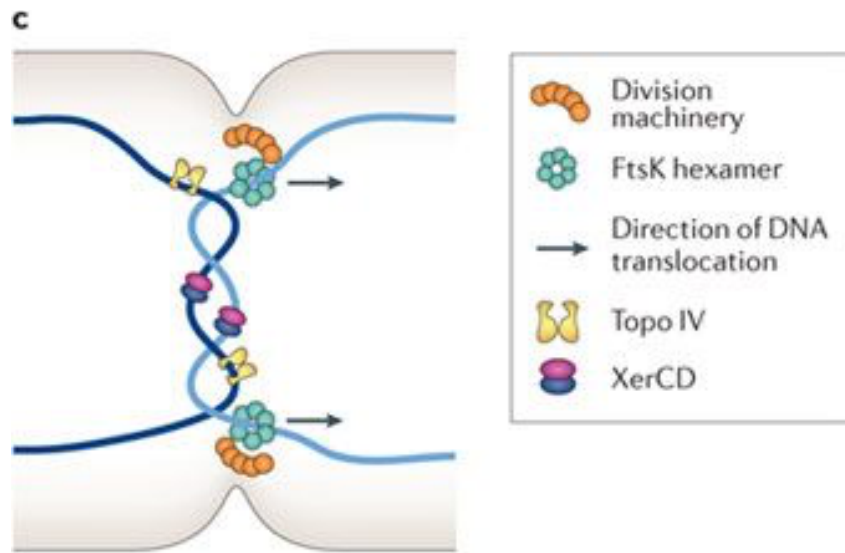


Fig. 3 Terminus segregation

Quiz:

1. What experimental observation leads emerge of the concept of checkpoint of cell cycle?

我認為會出現checkpoint這個概念，關鍵在於發現了「讓細胞停在同一個phase」的突變株(e.g. *cdc9* mutant)和「在這個突變基礎下再突變出relief of dependence」的突變株(e.g. *cdc9-rad9* mutant)。在只有「讓細胞停在同一個phase」的突變株的存在下，實在難以推測細胞暫停cell cycle的原因，因此作者提出了兩種可能，一種是類似於化學中limiting reagent概念的substrate-product ordered；而另一種則是假設有另一個物質偵測前一階段有沒有完成再決定是否進行下一步的control mechanism。而文章中以「假設mutagen給予defective cell的突變比起產生剛好補足該defect的gain of function更有可能產生無法辨識該defect的loss of function」為前提尋找可以對原本有defect的上游產生relief of dependence而正常進行mitosis的double mutant，若找到便認定這兩個mutation的關係就是control mechanism。

將在cell cycle中使用control mechanism的調控方式命名為checkpoint是因為當「產生prerequisites的基因」發生突變(e.g. *cdc9* mutant)，偵測prerequisites的enzyme就會像checkpoint一樣，將不滿足prerequisites的細胞阻止於前往下一步；但當「偵測prerequisites的的基因」也發生突變(e.g. *cdc9-rad9* mutant)，細胞將會不被阻攔的前往下個phase。

2. Why cell cycle checkpoint always employs negative regulation?

雖然一開始我覺得這個問題的答案相當顯而易見，因為作為checkpoint就會是我們以double mutant的方式發現的，因為checkpoint是我們以control mechanism為基礎發展出來的概念，但當我仔細思考後又覺得這個答案相當膚淺，說不定可以是prerequisites活化其他enzyme，再讓活化的enzyme接在enhancer或promoter上，那麼positive regulation也會是不無可能。那麼究竟為

什麼非得用negative regulation？以下是我苦思許久覺得比較合理的解釋，但應該仍有一些漏洞還請老師不吝賜教。

試想當今所有生物的始祖細胞LUCA除了在構成生命體代謝途徑上有重大的突破，是否還得進行繁衍子代這一任務？（不進行繁衍當然不會有現在的我們）那麼在繁衍子代時，LUCA需要做什麼？首先也是最重要的，他需要先衡量自己有沒有餘裕去繁衍子代，否則不顧自身資源的限制而無止盡地分裂將會使LUCA本身也會因為萎縮而死亡；再者，他需要確定複製後的chromosome有沒有出問題，比方說DNA polymerase, ligase等等有沒有作用，否則分裂出去的子細胞也將會因為遺傳資訊不完整而死亡；最後，他還需要確定chromosome segregation有沒有平均地分配到兩個daughter cells。因此以上三步只要任何一步沒做好，細胞就不該被分裂，否則兩個daughter cells便將死亡而沒有任何後代，因此留有後代至今的全是有確認這些機制的細胞。但是這還不足以解釋為何必須是negative regulation。在探討每個checkpoint是如何運作之前，我想先討論是先有DNA polymerase, ligase還有進行mitosis的protein等等的基因先發展出來，還是checkpoint的基因先發展出來？顯然是這些進行繁衍的基因先發展出來，因為checkpoints的機制是為了去調控他們的表現。那麼在發展出這些進行繁衍的基因之初，細胞們發生了什麼事？恐怕是不受控制地不停表現這些基因以增加自身的子代，可是無節制地表現這些基因將會使他們因為不停分裂、體質不足而死亡，因此這時候在突變後意外擁有抑制這些基因表現的子代細胞存活了下來，在接下來漫長的演化之路上，當然一味地抑制這些基因表現的細胞會因為沒有子代而滅亡，但擁有可以偵測各種概況來決定是否抑制基因表現的細胞便能存活並繁衍至今，這也是為何checkpoints永遠都是negative regulation。但這樣的說詞只能解釋prokaryotes和eukaryotes部分的checkpoints(e.g. SOS

regulatory system of *E. coli* and RAD9 system of yeast)。至於其他eukaryotes的機制，其實與前面的概念大同小異。在始祖eukaryotes細胞出現時，雖然在內膜系統上有重大的突破，但這並非全然是好事，因為內膜系統而導致chromosomes不同於prokaryotes地被nuclear envelope包圍，導致需要有新的機制使chromosome分離，此外必須評估的不再只有cytoplasm還有各式各樣的胞器是否足夠分裂所需。因此產生出了相對應的機制來負責這些新面臨的難題，也同時附帶地產生出調控這些機制表現的checkpoints(演化上的邏輯和前面說的一樣，也因此都是negative regulation)。

3. Is checkpoint gene essential for the living cell?

並非所有的checkpoints都是essential，特別是對於個體的存活而言。它的存在是基於為了繁衍後代而快速分裂所衍伸出的確保機制，倘若運氣很好地DNA沒有任何受損，一切也都恰如最理想的狀態進行，確實checkpoints並沒有必要存在，尤其是個體的存活其實不會受到checkpoints有無而有太多影響，然而子代的存活則會。

4. Both Rb and p53 are tumor suppressor, which one is checkpoint gene? Explain your answer.

在大多數G₁ phase，未磷酸化的pRb會與E2F結合，形成E2F-pRb complex。E2F-pRb complex會結合在與細胞週期相關的許多基因promoter上並抑制基因的表現。Cdk的活化會導致pRb的磷酸化，使pRb不再與E2F結合，同時與DNA結合的E2F會變成轉錄的activator使基因開始轉錄，這些基因的產物也是細胞週期中由G₁進入S所需的蛋白質。由於他並沒有確認prerequisites的機制，因此我認為Rb並非是checkpoint gene，而是checkpoint的下游一觸發執行phase transition的基因。

至於p53，細胞正常分裂的情況下並不需要他的參與，但當DNA因暴露於mutagen而受損時，p53的表現量會隨之增高，其作用要不是使細胞停止於G1 phase就是引發apoptosis。而且，當細胞中的兩個p53對偶基因發生突變時，即使細胞還沒準備好也會強行進入S phase。這明顯符合checkpoint的特徵，因此我認為p53是checkpoint gene。[7], [8]

5. Give one example on quiescence state of cell.

在adult skeletal muscle中，muscle satellite cells是mitotically quiescent。

Reference

- [1] doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05175.x
- [2] doi: 10.1128/JB.00861-10
- [3] doi: 10.1126/science.282.5393.1516
- [4] doi: 10.1101/gad.1496506
- [5] doi: 10.1146/annurev-cellbio-100814-125211
- [6] doi: 10.1038/nrg3375
- [7] 'Tumor-suppressor genes' in Chapter 16(Cancer). Gerald Karp. Cell and Molecular Biology Concepts and Experiments 3e. ISBN: 986-126-129-X
- [8] 30.19'RB is a tumor suppressor that controls the cell cycle', 30.20'Tumor suppressor p53 suppresses growth or triggers appotosis', 30.21'p53 is a DNA-binding protein' in Chapter 30(Oncogenes and Cancer). Benjamin Lewin. Genes VIII. ISBN: 978-986-126-454-7
- [9] doi: 10.1634/stemcells.2007-0019