

the dietary pattern in non-alcoholic steatohepatitis patients? [J]. Clin Nutr, 2006, 25: 816.

- [6] Xin YN, Xuan SY, Zhang JH, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids: A specific liver drug for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. Medical Hypotheses, 2008, 71(5): 820.
- [7] Adams LA, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease [J]. Ann Epidemiol, 2007, 17(11): 863.
- [8] Herbert T, Alexander RM. Insulin resistance, inflammation and non-alcoholic fatty liver disease [J]. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2008, 19(10): 371.
- [9] Ahmed MH, Byrne CD. Modulation of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) as potential treatments for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. Drug Discovery Today, 2007, 12(17/18): 740.
- [10] Raghov R, Yellaturu C, Deng X, et al. SREBPs: the crossroads of physiological and pathological lipid homeostasis [J]. Trends Endocrinol Metab, 2008, 19(2): 65.
- [11] Nakayama H, Otabe S, Ueno T, et al. Transgenic mice expressing nuclear sterol regulatory element-binding protein 1c in adipose tissue exhibit liver histology similar to non-alcoholic steatohepatitis [J]. Metabolism, 2007, 56(4): 470.
- [12] Rubin D, Schneider-Muntau A, Klapper M, et al. Functional analysis of promoter variants in the microsomal triglyceride transfer protein (MTTP) gene [J]. Hum Mutat, 2008, 29(1): 123.
- [13] Gentile CL, Pagliassotti MJ. The role of fatty acids in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease [J]. J Nutr Biochem, 2008, 19(9): 567.
- [14] Geelen MJ, Schoots WJ, Bijleveld C, et al. Dietary medi-

um-chain fatty acid raise and n-3 polyunsaturated fatty acids lower hepatic triacylglycerol synthesis in rats [J]. J Nutr, 1995, 125: 24.

- [15] Araya J, Rodrigo R, Videla LA, et al. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in relation to hepatic steatosis in non-alcoholic fatty liver disease patients [J]. Clin Sci, 2004, 106: 635.
- [16] Allard JP, Aghdassi E, Mohammed S, et al. Nutritional assessment and hepatic fatty acid composition in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A cross-sectional study [J]. J Hepatol, 2008, 48(2): 300.
- [17] Hajime I, Yasuo H, Shigetoshi O, et al. Eicosapentaenoic acid ameliorates steatohepatitis and hepatocellular carcinoma in hepatocyte-specific Pten-deficient mice [J]. J Hepatol, 2009, 50(3): 562.
- [18] Spadaro L, Magliocco O, Spampinato D, et al. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in subjects with nonalcoholic fatty liver disease [J]. Dig Liver Dis, 2008, 40(3): 194.
- [19] Teran-Garcia M, Adamson AW, Yu G, et al. Polyunsaturated fatty acid suppression of fatty acid synthase (FASN): evidence for dietary modulation of NF- $\kappa$ B binding to the Fasn promoter by SREBP-1c [J]. Biochem J, 2007, 402(3): 591.
- [20] Kharroubi I, Laurence L, Cardozo AK, et al. Free fatty acids and cytokines induce pancreatic  $\beta$ -cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor- $\kappa$ B and endoplasmic reticulum stress [J]. Endocrinol, 2004, 145(11): 5087.

(收稿日期: 2010-07-16 修回日期: 2010-08-27)

• 综 述 •

## Geminin 在细胞周期中的作用研究进展

周叶萍 综述, 舒茂琴 审校

(第三军医大学西南医院心血管内科/重庆市介入心脏病学研究所, 重庆 400038)

**关键词:** Geminin; 细胞分裂周期蛋白-10 依赖性转录因子; 细胞周期; 再复制

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2010.24.063

中图分类号: R329.28

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)24-3432-03

随着生物学的飞速发展, 关于细胞周期调控的研究越来越受到人们的关注。对细胞周期相关因子 Geminin(起始特阻遏子)的研究已成为热点。Geminin 是一种定位于核内的小分子蛋白, 具有相对复杂的结构模式, 预示着它的功能多样性。它通过调节细胞周期时相中的重要事件作用于细胞增殖; 经多种途径参与 DNA 复制的调节; 抑制中心体重复制<sup>[1]</sup>; 推进 G2/M 期和维持正常胞质分裂等; 调节胚胎发育, 尤其是神经的发生, 还可以与同源异型盒蛋白或是基因相互作用, 在细胞增殖与分化中发挥协调的功能, 近年研究还发现它可能具有癌

基因功能, 而且随着研究的深入和对 Geminin 功能的更多的发掘, 该蛋白的功能将被进一步地阐明。现对 Geminin 蛋白结构、功能、调控机制及其在细胞周期中作用的研究进展做一综述。

### 1 Geminin 的结构及定位

Geminin 是一种多细胞生物蛋白, 相对分子质量为 25 kD, 由 Geminin 基因编码, 存在于细胞核内<sup>[2]</sup>, 但不存在于酵母中<sup>[3]</sup>。有研究于 1998 年在非洲蟾蜍卵的有丝分裂期中, 从 cDNA 编码的蛋白选择性地降解提取物中发现了 Geminin, 它有 2 种异构体——GemininH 和 GemininL, 分别含有 219 和 216 个氨基酸。通过检测 Geminin 氨基酸序列已经鉴定出了

几个结构基序<sup>[4]</sup>。

分辨率为 17.5 Å 的电子显微镜揭示了人类 Geminin 蛋白三维图<sup>[5]</sup>；头代表 Geminin 的 N 末端，中心体对应卷曲螺旋结构域，颈代表阻止 DNA 再复制区域。N 末端为泛素化的位点。Geminin 中心部位氨基酸序列能够形成一种可变的卷曲螺旋 (coiled-coil) 结构域，该种结构域通常与蛋白质二聚体相关<sup>[6]</sup>，能与细胞分裂周期蛋白-10 依赖性转录因子 (cdcl0 dependent transcript1, CDT1) 牢固结合<sup>[7]</sup>。晶体学揭示了 Geminin 3 个可能与 CDT1 结合的区域<sup>[8]</sup>：(1) 暴露的带负电荷的谷氨酸根对于与 CDT1 静电相互作用是必需的；(2) N 末端的卷曲螺旋结构域增加了 10 个可以结合到中心区域的上游基团；(3) N 末端可变的卷曲螺旋结构域可以和 CDT1 N 末端 100 个氨基酸相结合。

## 2 Geminin 与细胞周期

细胞周期划分为 G1 期和 S 期，G2 期和 M 期 4 个时相，进入增殖周期的细胞只有在各个时相中准确地完成相应事件，才能确保增殖周期的顺利进行。在 G1 期早期，细胞分裂周期蛋白-6 (cell division cycle-6, CDC6) 的表达水平一过性升高，与起始识别复合物 (origin recognition complex, ORC) 结合在一起，之后微小染色体维持蛋白 (minichromosome maintenance, MCM) 形成环状复合物，位于细胞核中的 CDC6 协同促进 MCM 环状复合物加载于染色质上，使其结合到复制原点邻近的 DNA 上，这样完整的具有活性的前复制复合物 (Pre-RC) 装束完成，DNA 开始复制<sup>[9]</sup>。

研究证明，Geminin 在细胞周期的各时期中发挥着不同的调控作用，其作用方式也不一样。它是 G1 期向 S 期转化的起始信号，在 S 期开始增加，在 M 期达高峰，在下一个 G1 期到来前降解<sup>[10]</sup>。在 M 期：分裂后期促进复合物 (APC) 活性增强，诱导 Geminin 基因的“破坏盒”发生突变，水解 Geminin 蛋白。Geminin 从 M 期降解后，促使 DNA 复制的启动，因此，Geminin 对 DNA 复制启动是非常重要的，直到细胞分裂完成；S 期：它能连接 CDT1 并使之失活，确保 DNA 在复制完后不发生再复制；Geminin 通过与 CDT1 结合使之失活，从而阻止 Pre-RC 的完整性及稳定性，妨碍 MCM 加载到染色体上，造成 DNA 复制启动的停止。在 S 期起始阶段，Geminin 开始在核内聚集。Geminin 二聚体而不是单体在胞浆内与游离的 CDT1 紧密结合，从而阻止 S 期 Pre-RC 的形成<sup>[9]</sup>，而且 Geminin 的卷曲螺旋结构域 C 端通过位阻阻断了 MCM 家族装载到 CDT1 的通路<sup>[11-12]</sup>。核内 Geminin 蛋白从 S 期到 G1 期一直维持到有丝分裂期末<sup>[13]</sup>，然后，经过一系列不同的可能系种族特异性途径来灭活，而这种灭活机制对于游离 CDT1 的存在及准许下一轮 DNA 复制是必需的。

肿瘤细胞和正常细胞的增殖遵循同样的细胞周期，但是调控机制不同。关于导致癌症最常见的说法是 G1、S 或 G2 期检查点的功能障碍。Geminin 保证了适当的复制及通过 S 期，因此它被推断为一种肿瘤抑制物，而不是致癌基因，然而表达分析却显示在肿瘤组织或变异细胞中 Geminin 表达上升<sup>[14]</sup>。在散在非浸润性乳腺癌中，Geminin 水平与肿瘤分期有关<sup>[15]</sup>。在乳腺癌早期，Geminin 表达就已经升高，而且过表达预示着肿瘤转移及预后不良<sup>[14]</sup>。在直肠癌，Geminin 水平随着放疗的进行而下降，最近已经有实验研究把 Geminin 作为肿瘤转移及肿瘤发生的分子标记。

## 3 Geminin 与 CDT1 之间的平衡

细胞周期里的相关蛋白水平的定量变异要求精密的调控机制，这些机制的阐明将有助于进一步了解在肿瘤发生中 Geminin 与 CDT1 的作用原理。Saxena 和 Dutta<sup>[16]</sup>用体 DNA 复制分析方法证实了 Geminin 作用的靶体是 CDT1：(1) Geminin 与 CDT1 结合；(2) CDT1 的降解和 Geminin 过度表达都能有效阻止复制进行；(3) CDT1 的过度表达可以使被 Geminin 阻止的复制再次进行。这表明 Geminin 通过 CDT1 发挥抑制细胞周期的作用。两者结合后使 CDT1 失活，从而阻止 Pre-RC 结构的完整性及功能的稳定性，妨碍 MCM 加载到染色体上，造成 MCM 复制启动的停止。由此可见这对矛盾体间的平衡对基因稳定起着重大的作用<sup>[17]</sup>。在体细胞的细胞周期里，Geminin 与 CDT1 蛋白水平是可以互补的<sup>[13,18]</sup>。一项最新研究证明 Geminin-CDT1 复合体在复制起点作为分子开关，能够阻止 DNA 复制的启动，并能将 MCM 解链酶加载到染色质上<sup>[19]</sup>。因此，Geminin 只有在进入 S 期之前再活化，且与 CDT1 两者之间达到一种恰当的比例时它才能抑制 CDT1 的活性<sup>[18]</sup>。有研究显示在 DNA 复制准许期间，先被征募到染色体的 Geminin 与 CDT1 形成复合物装订到染色体，与 MCM2-7 复合物相互作用，准许染色体在每一细胞周期复制 1 次。另一方面征募额外的 Geminin 抑制 CDT1-Geminin 复合物的活性预防再复制发生。在人类细胞 Geminin 在 G2-M 期允许 CDT1 聚集起积极作用；在 S-G2 期阻止 DNA 复制准许的启动。因此，在快速分裂细胞和癌细胞中也有 Geminin 高水平的表达<sup>[20]</sup>。更为重要的是，Geminin 翻译后调控<sup>[21]</sup>可能对于它能够不同的状态间迅速转化是极其关键的<sup>[19]</sup>。

## 4 Geminin 蛋白水平的试验性调节

被高度控制了细胞周期调控因子水平的平衡，能够获得或失去功能途径而试验性地扰乱。向果蝇体内注射 Geminin 的非降解形式-mRNA 或是通过 Gal4/UAS 系统错误表达 Geminin，都能有效地阻碍 Pre-RC 的装配<sup>[13,22]</sup>，然后 MCM 蛋白的装载被抑制，而染色质与 ORC 的结合却未受影响<sup>[13]</sup>。这种复制的阻断作用可以通过过量的 CDT1 表达而得以有效地复苏<sup>[9,22]</sup>。野生型的 Geminin 瞬间过表达不能产生主要效应，也不能阻止细胞周期进行<sup>[9]</sup>。然而在稳定转染后却可以观察到在 S 期增殖和聚集起来的细胞荧光放射增强。在培养细胞中，随着 Geminin 的稳定表达，可以观察到更多的变化。这种效应有赖于内皮 Rb 蛋白的存在<sup>[22]</sup>。HCT116 (结肠癌细胞) (Rb+) 可以表达与生理水平相似的稳定形式的 Geminin，因此可以阻止增殖并启动 DNA 损伤检查点途径，但是无凋亡<sup>[22]</sup>。在过度表达试验中，这种表型能够通过相应升高的 CDT1 所复苏。在裸鼠体内，移植包含非降解 Geminin 可以产生较少的肿瘤形式<sup>[14]</sup>。单独过表达 CDT1 能够产生重复复制，基因不稳定性及恶性转移<sup>[15]</sup>。通过反义技术试验性下调 Geminin 水平，如显性负相途径、免疫耗竭、RNAi、siRNA 或遗传突变用于促进细胞分裂<sup>[22-23]</sup>。Hela 细胞在耗竭 Geminin 后不会出现染色体破损、断裂或死亡，也没有重复复制发生，可能与 CDT1 在 S 期被有效地遍在蛋白化及蛋白水解作用有关<sup>[24]</sup>。由此可见，似乎 Geminin 仅仅是在细胞被剥脱了其他调控机制的情况下对于控制正常的细胞周期进程是非常必要的。

## 5 展望

严格的 DNA 复制对于保证细胞周期中染色体的适当的

复制与分离是必需的。细胞周期调控异常可导致基因不稳定性及细胞恶性增殖。Geminin 作为参与细胞增殖周期调控的重要细胞周期相关因子,对它的生物学特性正进一步深入地认识。越来越多的报道指出,Geminin 具有连接细胞增殖和胚胎分化的功能,但关于 Geminin 这种“仲裁者”作用的详细信息尚不明确。如 Geminin 与同源异型盒蛋白到底是怎样作用的?同源异型盒蛋白与 CDT1 竞争的重要性在哪里? Geminin 在神经发生的不同阶段和不同空间内的作用是怎样定位的?作用时间如何选择? Geminin 与肿瘤的关系? 这些问题有待更多的实验探索去解答<sup>[25]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] Lu F, Lan R, Zhang H, et al. Geminin is partially localized to the centrosome and plays a role in proper centrosome duplication[J]. *Biol Cell*, 2009, 101: 273.
- [2] 文川, 万伍卿. 细胞周期相关因子 Geminin 及其临床意义[J]. *医学临床研究*, 2006, 4(23): 616.
- [3] Andrew CG Porter. Preventing DNA over-replication: a Cdk perspective[J]. *Cell Division*, 2008, 3: 3.
- [4] Pitulescu M, Kessel M, Luo L. The regulation of embryonic patterning and DNA replication by Geminin[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62(13): 1426.
- [5] Okorokov AL, Orlova EV, Kingsbury SR, et al. Molecular structure of human Geminin[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2004, 11: 1021.
- [6] Pitulescu M, Kessel M, Luo L. The regulation of embryonic patterning and DNA replication by Geminin[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62(13): 1425.
- [7] Seo SL, Kroll KL. Geminin's Double Life Chromatin Connections that Regulate Transcription at the Transition from Proliferation to Differentiation[J]. *Cell Cycle*, 2006, 5: 4, 378.
- [8] Okorokov AL, Orlova EV, Kingsbury SR, et al. Molecular structure of human Geminin[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2004, 11: 1021.
- [9] Valentina S, Silvia F, Roberta F, et al. HOXD13 Binds DNA Replication Origins To Promote Origin Licensing and Is Inhibited by Geminin[J]. *Mol Cell Biol*, 2009: 5775.
- [10] Lygerou L, Nurse P. Cell cycle: License withheld Geminin Blocks DNA Replication[J]. *Science*, 2000, 290: 2271.
- [11] Lee C, Hong B, Choi JM, et al. Structural basis for inhibition of the replication licensing factor CDT1 by Geminin[J]. *Nature*, 2004, 430: 913.
- [12] Cook JG, Chasse DA, Nevins JR. The regulated association of CDT1 with minichromosome maintenance proteins and Cdc6 in mammalian cells[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 9625.
- [13] Xouri G, Dimaki M, Bastiaens PI, et al. CDT1 Interactions in the licensing process a model for dynamic spatiotemporal control of licensing[J]. *Cell Cycle*, 2007, 6: 1549.
- [14] Montanari M, Boninsegna A, Faraglia B, et al. Increased expression of Geminin stimulates the growth of mammary epithelial cells and is a frequent event in human tumors[J]. *J Cell Physiol*, 2005, 202: 215.
- [15] Vaziri C, Saxena S, Jeon Y, et al. A p53-dependent checkpoint pathway prevents rereplication[J]. *Mol Cell*, 2003, 11: 997.
- [16] Saxena S, Dutta A. Geminin-CDT1 balance is critical for genetic stability[J]. *Mutat Res*, 2005, 569: 111.
- [17] 文川, 万伍卿. 细胞周期相关因子 CDT1 和 Geminin 的平衡[J]. *医学与哲学: 临床决策论坛版*, 2007, 3: 43.
- [18] De Marco V, Gillespie PJ, Li A, et al. Quaternary structure of the human CDT1-Geminin complex regulates DNA replication licensing[J]. *PNAS*, 2009, 106(47): 19807.
- [19] Lutzmann M, Maiorano D, Mechali MA. CDT1-Geminin complex licenses chromatin for DNA replication and prevents rereplication during Sphase in *Xenopus*[J]. *EMBO J*, 2006, 25: 5764.
- [20] 孙燕平, 万伍卿. 细胞周期相关因子 CDT1 功能的负调节[J]. *医学临床研究*, 2007, 24(7): 1211.
- [21] Senga T, Sivaprasad U, Zhu W, et al. PCNA is a cofactor for CDT1 degradation by CUL4/DBP1-mediated N-terminal ubiquitination[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 6246.
- [22] Hara K, Makayama KI, Nakayama K, et al. Geminin is essential for the development of preimplantation mouse embryos[J]. *Genes Cells*, 2006, 11: 1281.
- [23] Luo L, Yang X, Takihara Y, et al. The cell-cycle regulator Geminin inhibits Hox function through direct and polycomb-mediated interactions[J]. *Nature*, 2004, 427: 749.
- [24] Nishitani H, Lygerou Z, Nishimoto T. Proteolysis of DNA replication licensing factor CDT1 in S-phase is performed independently of Geminin through its N-terminal region[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 30807.
- [25] 杨宁, 柳惠图, 张伟. 多功能蛋白 Geminin 的研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2007, 34(9): 922.

(收稿日期: 2010-06-13 修回日期: 2010-07-30)

**启事: 本刊对院士及 863、973 项目文章开通绿色通道, 欢迎投稿。**