

生物信息学在探索 Cdc6 与 Cdt1 相互作用中的应用

卢菲 (10211031)

摘要

Cdc6 与 Cdt1 是 DNA 复制起始调控中的两个重要蛋白,在 G₁/S 过渡中共同募集 MCMs 于染色质上,完成 pre-RC 的组装。在募集 MCMs 时 Cdc6 与 Cdt1 是否直接作用尚不清楚,本文拟对 Cdc6 和 Cdt1 进行局部结构分析,考察二者在空间上的结合作用可能性,从而为它们调控 DNA 复制提供结构基础。

引言

真核生物中,为保证遗传物质精确传递到子代,一个细胞周期中 DNA 只能复制一次。DNA 获得复制的能力是通过各种相关调控蛋白与 DNA 复制起始点顺序性结合而实现的,主要包括 ORCs、Cdc6、Cdt1 和 MCM2-7 等。由于 Cdc6 与 Cdt1 的量在细胞周期中是波动的,而 ORCs 和 MCMs 的量保持恒定^[1,2],所以 Cdc6 和 Cdt1 被认为是在 Pre-RC 形成中的关键调节物,也是真核细胞中染色质 DNA 复制起始的关键调控物。

Cdc6(Cell Division Cycle gene or Cell Division Control gene)是细胞周期调控因子之一,在 G₁ 期向 S 期过渡中调节 DNA 复制的起始。ScCdc6(*Saccharomyces cerevisiae* Cdc6)是 Zhou,C.1989 年在研究芽殖酵母细胞分裂周期变化时第一个被鉴定的 Cdc6,cDNA 大小约 1.7Kb,直接参与 DNA 复制的起始^[3]。在晚 G₁ 期表达,G₁/S 交界处达到高峰^[4]。此后在真核细胞生物人、爪蟾以及鼠等其它生物中相继发现^[5,6]。Sc Cdc6 以同源二聚体形式存在,与双链 DNA 结合而不与单链 DNA 结合,结合在 DNA 小沟的 A-T 富含区,N 端至少 47 个氨基酸对于结合 DNA 是必需的,29KRKK32 对于 Cdc6 的 DNA 结合活性是必需的^[7]。

真核细胞复制起始蛋白 Cdc6 是庞大的 ATP 酶家族——AAA⁺ (ATPases associated with a variety of cellular activities) 家族成员之一。N 端含有几个潜在的磷酸化位点和入核信号 NLS 以及与 Cyclin 作用区,中部拥有二个嘌呤核苷酸结合域,分别为保守的 Walker A 和 Walker B 功能区,Walker A 区为 Cdc6 与 ATP 结合部位,Walker B 区为 ATP 水解部位^[8,9]。Cdc6 的 Walker A 和 Walker B 突变均导致 DNA 复制障碍^[8]。哺乳动物 Cdc6 C 端的磷酸化位点与其出核信号相关,N 端与 C 端均含有与 ORC1 作用位点^[10,11,12]。

Cdt1(Cdc10 dependent transcript 1)是 Hofmann, J. F.1994 年在酵母中首先发现的 Cdc10 依赖性的转录因子,其启动子具有特异 DNA 序列结合因子的识别位点,Cdc10 为此 DNA 结合因子成分之一。Cdt1 定位于细胞核中,表达在有丝分裂完成至进入 S 期出现峰值。Cdt1 与 Cdc18(*Schizosaccharomyces pombe* 中野生型 Cdc6 同系物)相互作用,

协同促进 DNA 复制，二者对于 MCMs 募集于染色质都是必需的 [2]。

哺乳动物 G₁ 期细胞中 ORCs 首先结合到染色质 DNA 复制起始点上，募集 Cdc6 和 Cdt1 与染色质结合。通过 MCMs 与 Cdt1 的 C 端结合，Cdc6 N 端非催化区域与 Cdt1 相结合，Cdt1 与 Cdc6 相互依赖募集 MCMs 于染色质上 [13]，完成复制前复合体 (Pre-replication complex, Pre-RC) 装配。G₁/S 交界处，Pre-RC 在至少两种激酶 (CDK 和 Cdc7/Dbf4) 作用下形成起始前复合体 (Pre-initiation complex, Pre-IC)，Pre-IC 进而触发 DNA 复制的启动 [14, 15, 16]。

酵母中，Cdt1 与 Cdc6 C 端相结合 [13,17]；哺乳动物中 Cdt1 与 Cdc6 N 端相结合 [13]；也有人报道二者间没有直接的接触。到底 Cdc6 与 Cdt1 结合否，其结构基础如何，还有待进一步研究。本文运用 EMBOSS, MotifScan, Swiss-PdbViewer 等生物信息学软件对 Cdc6 与 Cdt1 的结构进行分析，探讨二者在空间结构上的可能关系。

材料与方法

运用 NCBI 搜索两种蛋白 11 条序列，并使用 EMBOSS 命令进行序列比对，查得序列的相同性与相似性，通过 MotifScan 找出潜在功能区，在 PDB 数据库中搜索已知相关蛋白三维结构，结合 Cdc6 与 Cdt1 蛋白功能分析其结构与功能的关系。

结果与讨论

1. Cdc6 蛋白序列的相似性：

通过 NCBI 搜索了有关 Cdc6 的六个蛋白：

>gi|19264108|gb|AAH25232.1| CDC6 homolog [Homo sapiens]

>gi|30851409|gb|AAH52434.1| Cdc6 protein [Mus musculus]

>gi|11359847|pir||T46977 cell division control protein 6 [validated] - African clawed frog

>gi|3006165|emb|CAA18425.1| cdc18 [Schizosaccharomyces pombe]

>gi|6322266|ref|NP_012341.1| Protein involved in initiation of DNA replication; Cdc6p [Saccharomyces cerevisiae]

>gi|18312143|ref|NP_558810.1| cell division control protein 6 (cdc6), putative [Pyrobaculum aerophilum str. IM2]

运用 EMBOSS 命令 water 和 needle 对序列进行了两两比对，并通过 clustalx 构建了系统树。因为作者的目标蛋白是非洲爪蟾 (*Xenopus leavis*) 的 Cdc6，所以在系统树中标示出 *Xenopus leavis* 与其余五种物种 Cdc6 的相同性与相似性 (括号外为相同性，括号

内为相似性), water 比对相同性与相似性高于 needle 比对。结果如图 1 所示, 局部比对中 *Xenopus laevis* 与哺乳动物 Cdc6 的同源性最高, 超过 60%; 与古细菌 *Pyrobaculum aerophilum* Cdc6 的同源性最低。

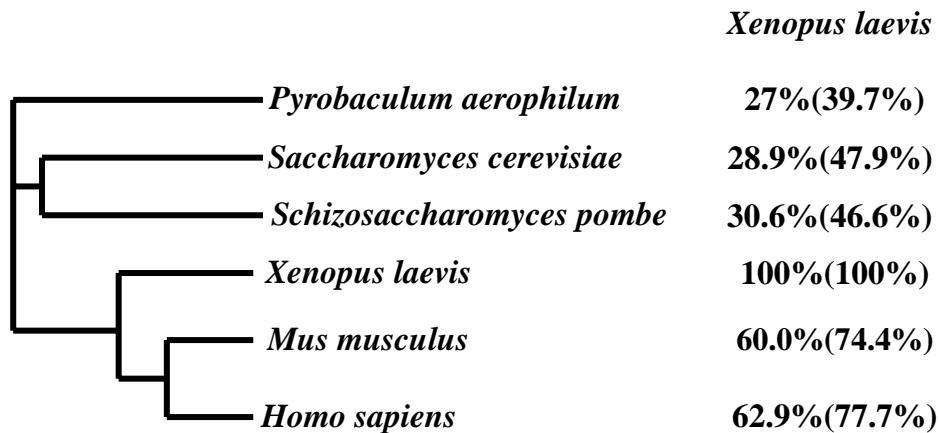


图 1. *Xenopus laevis* 与五种物种 Cdc6 的相同性与相似性比较 (括号外为相同性, 括号内为相似性)。系统树由 clustalx 构建, 相同性与相似性通过 water 比对获得。

2. Cdt1 蛋白序列的相似性:

通过 NCBI 搜索了有关 Cdt1 的五个蛋白:

>gi|16418337|ref|NP_112190.1| DNA replication factor; Double parked, *Drosophila*, homolog of [*Homo sapiens*]

>gi|19111988|ref|NP_595196.1| cell division cycle protein cdt1; replication factor [*Schizosaccharomyces pombe*]

>gi|24257160|dbj|BAC22085.1| Cdt1 homolog [*Mus musculus*]

>gi|7573546|emb|CAB87836.1| putative CDT1 protein [*Xenopus laevis*]

>gi|9799617|gb|AAF99080.1|AF279146_1 replication protein double parked [*Drosophila melanogaster*]

运用EMBOSS命令water和needle对序列进行了两两比对, 并通过clustalx构建了系统树。因为作者的目标蛋白是非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 的Cdt1, 所以在系统树中标示出 *Xenopus laevis* 与其余四种物种Cdt1的相同性与相似性 (括号外为相同性, 括号内为相似性), water 比对相同性与相似性高于needle 比对。结果如图2所示, 局部比对中 *Xenopus laevis* 与哺乳动物Cdt1的同源性最高; 与果蝇 *Drosophila melanogaster* Cdt1的同源性最低。

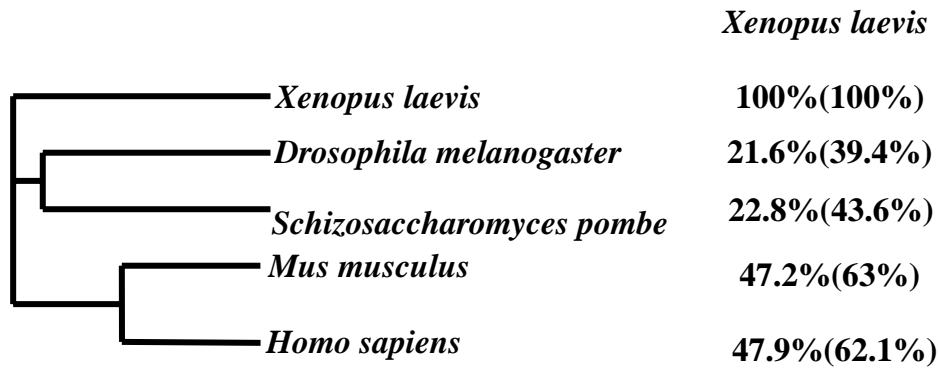


图 2. *Xenopus laevis* 与四种物种 Cdt1 的相同性与相似性比较 (括号外为相同性, 括号内为相似性)。系统树由 clustalx 构建, 相同性与相似性通过 water 比对获得。

3. 序列中的 motif:

运用 MotifScan 对 *Xenopus laevis*Cdt1 进行分析, 仅发现 AMIDATION, PKC_PHOSPHO_SITE, ASN_GLYCOSYLATION, MYRISTYL, CK2_PHOSPHO_SITE 位点, 没有其它 motif。对 *Xenopus laevis*Cdc6 进行分析, 发现有六种 motif, 如下表所示:

?	prf:NACHT (NACHT-NTPase domain profile)	pos. 190 - 305	normalized_score=6.737
?	prf:ATP_GTP_A2 (P-loop nucleotide binding motif (does not find all))	pos. 191 - 210	normalized_score=6.880
?	prf:NLS_BP (Bipartite nuclear localization signal)	pos. 17 - 34	normalized_score=3.000
!	pfam:AAA (ATPase family associated with various cellular activities (AAA))	pos. 191 - 395	E-value=2.4e-12
?	pfam:DEAD (DEAD/DEAH box helicase)	pos. 164 - 354	E-value=9.8
?	pfam:NACHT (NACHT domain)	pos. 190 - 350	E-value=1.8

其中 NLS-BP 核定位信号对 Cdc6 在核中行使功能非常重要, 失去 NLS, Cdc6 不能特异定位于细胞核。AAA motif 是 Cdc6 的功能域, 此区域结合与水解 ATP, 通过 ATP 的结合与水解募集 MCMs 于染色质上, 该区域在所有 Cdc6 中最为保守。

4. 蛋白晶体结构:

在 PDB 数据库中查得古细菌 *Pyrobaculum aerophilum*Cdc6 的晶体结构 1FNN, 如图 3 所示, *Pyrobaculum aerophilum* 与 *Xenopus laevis* 的差别主要在 Domain 1, Domain 2 和 Domain 3 为 AAA motif 的空间结构。虽然二者相同性只有 27%, P.aCdc6 实际执行了 Cdc6 与 ORC1 二者的功能 [18], 但是二者的主要功能域结构很相近, 即 AAA motif 的空间结构非常相似。

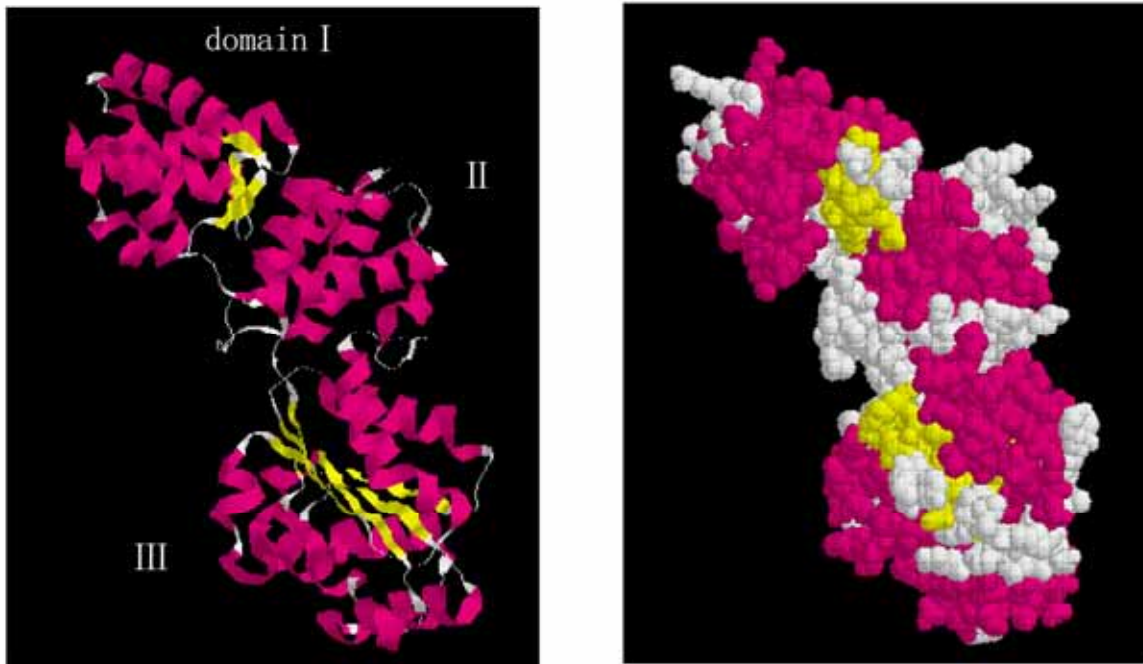


图 3：古细菌 *Pyrobaculum aerophilum* Cdc6 的晶体结构。

在 PDB 数据库中查得人 (*Homo sapiens*) Cdt1 的抑制蛋白 Geminin 的 coiled-coil 片段晶体结构 1U11, 7 月 27 日 nature 上发表的鼠 (*Mus musculus*) 截短的 Cdt1 与 Geminin 复合体的晶体结构尚未收录入 PDB 数据库 [19], 如图 4 所示。Geminin 的 N 端 coiled-coil 域与 Cdt1 的 N 端和 C 端相互作用。

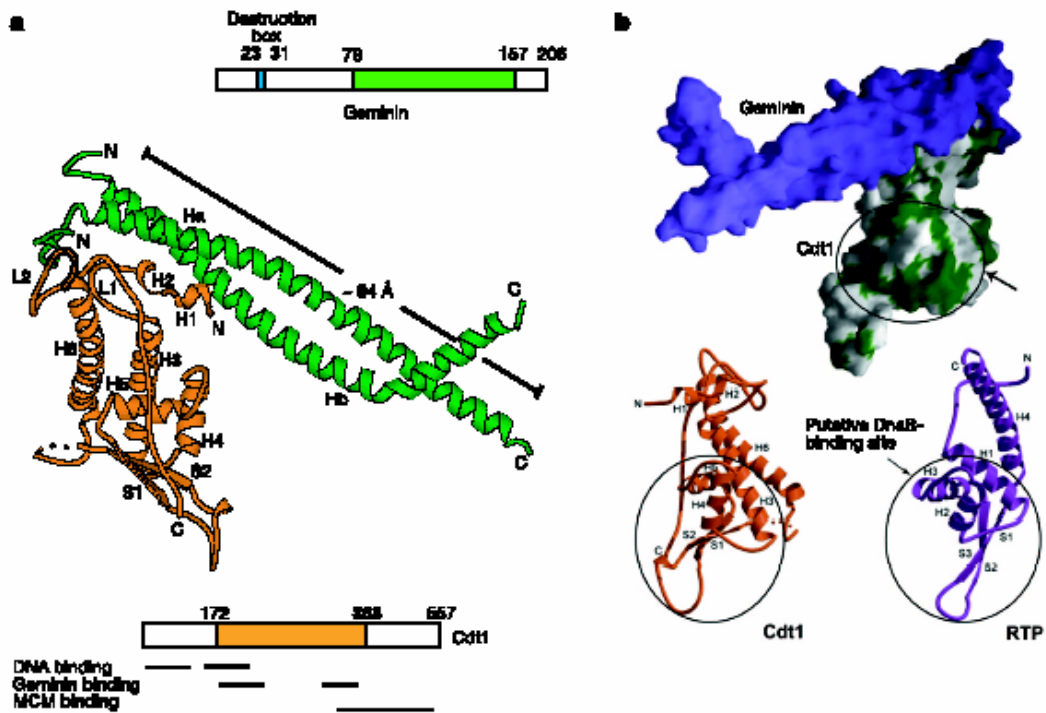


图 4：mouse tCdt1-tGeminin 复合体晶体结构。

5. Xcdc6 与 Xcdt1 是否直接作用？

Xcdc6 主要由三个 domain 组成，在序列中没有发现 coiled-coil 区域，也没有 ZIP,如图 5 所示，没有明显与 Xcdt1 作用的三维结构。

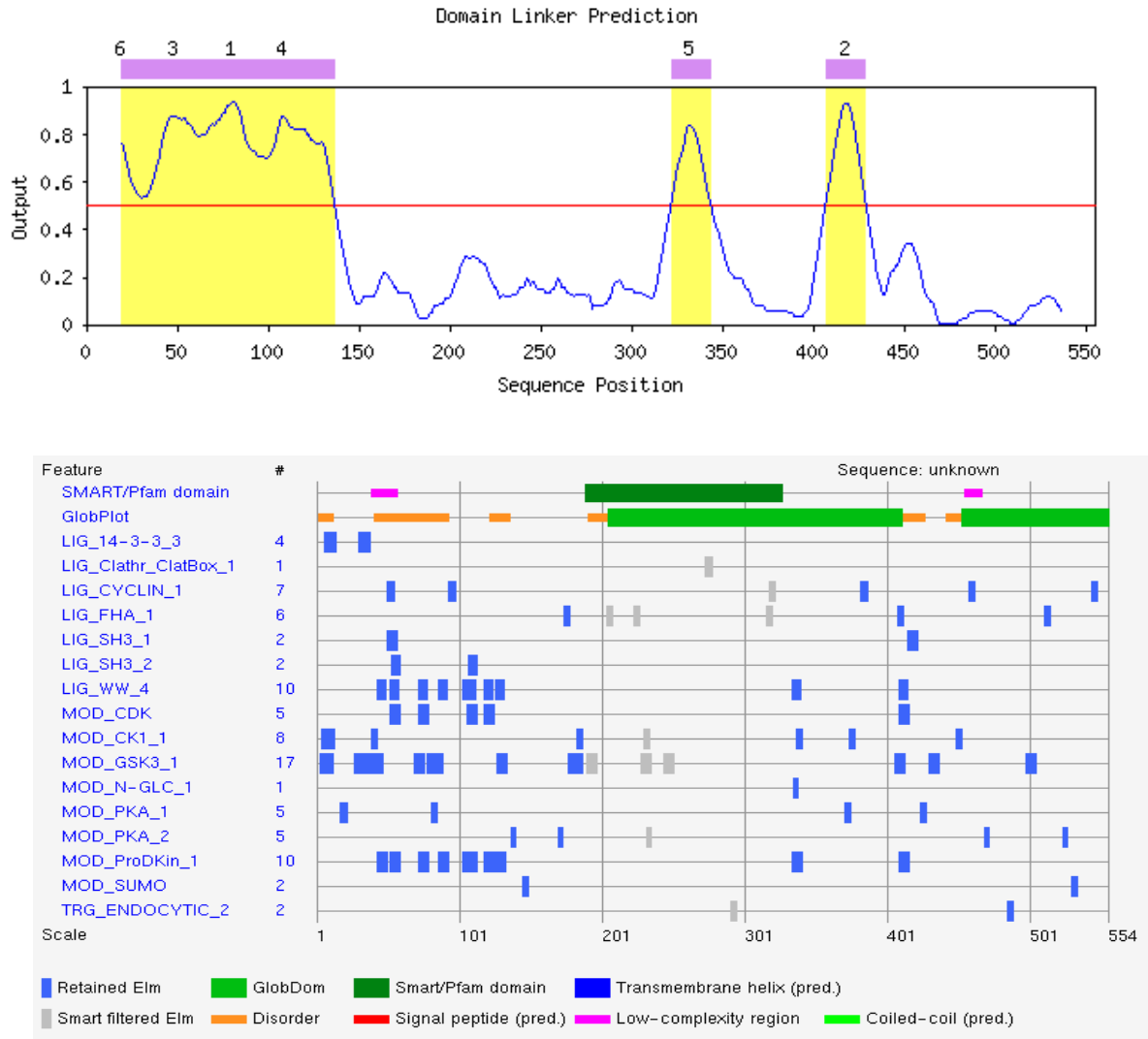


图 5：Cdc6 的 domain (上图) 与可能二级结构域 (下图)。

Xcdt1 主要由 6-7 个 domain 组成，在 200bp 左右有一 coiled-coil 区域，也没有 ZIP,如图 6 所示，具有潜在与 Xcdc6 作用的三维结构,但此 coiled-coil 与 Geminin 相互作用，是否同时还与 Xcdc6 作用还是竞争作用？鉴于 Xcdc6 和 Xcdt1 在细胞周期中的共同作用，二者都与染色质结合并且同时参与募集 MCMs 到染色质上，而且在酵母和哺乳动物细胞中发现二者有直接作用，所以虽然 Xcdc6 没有类似结构，但 Xcdc6 可能通过 C 端 domain 或 N 端非规则区域形成的分子表面疏水相互作用与 Xcdt1 接触，因此在爪蟾细胞周期调控中，Xcdc6 与 Xcdt1 可能通过分子表面疏水相互作用发生直接联系，但有待进一步研究证实。

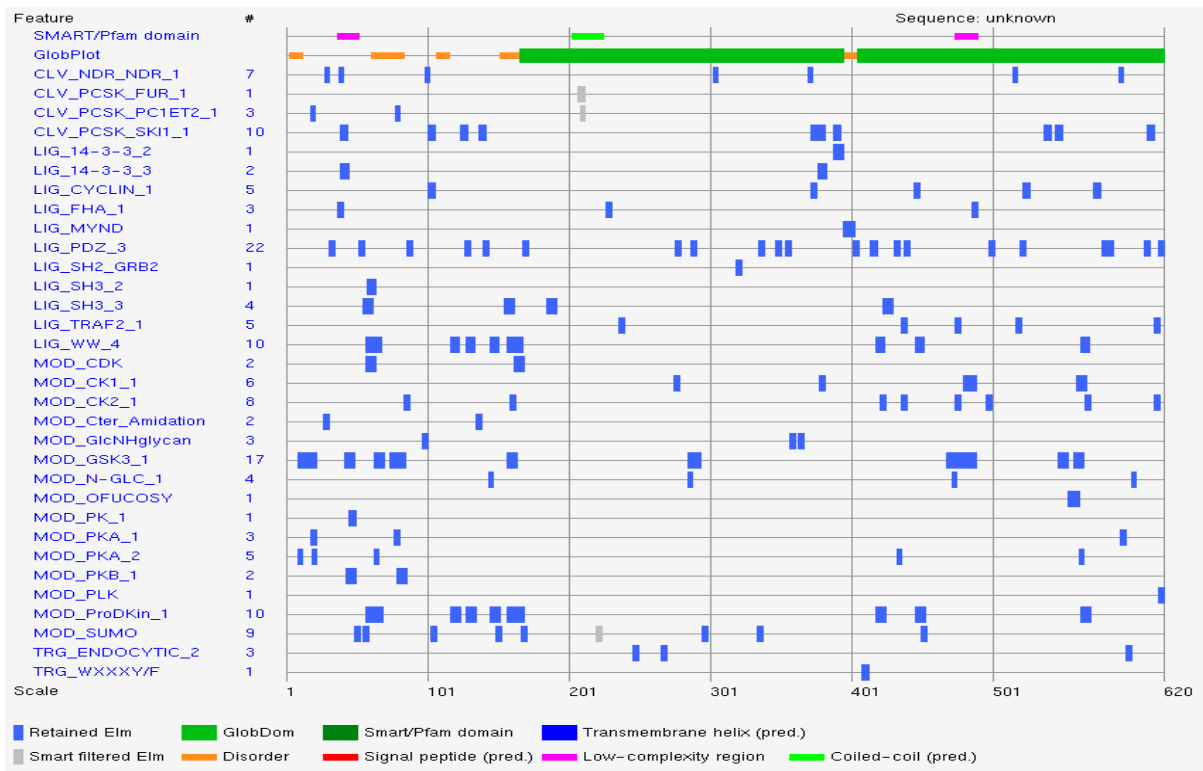
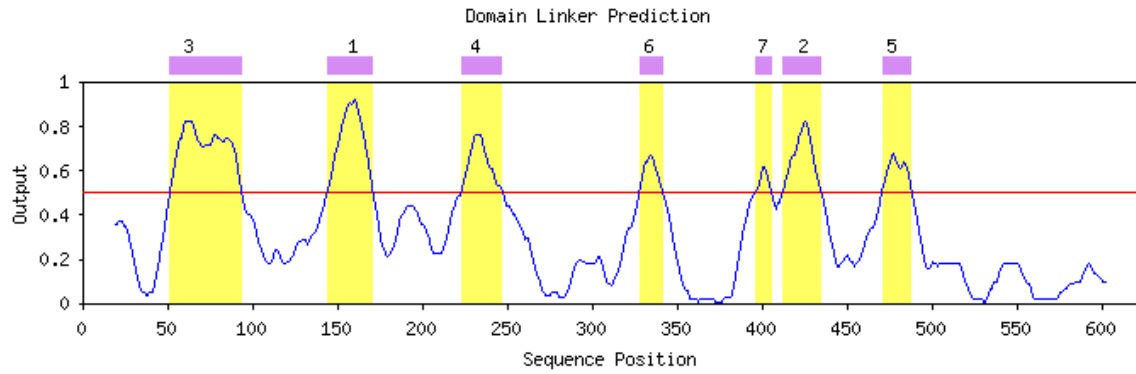


图 6 : Cdt1 的 domain (上图) 与可能二级结构域 (下图)。

致谢

本研究课题受到国家杰出青年基金、国家自然科学基金重点项目、973 发展规划项目和北大 985 项目的资助，深表感谢。

参考文献

1. Liang, C., and Stillman, B. (1997). Persistent initiation of DNA replication and chromatin-bound MCM proteins during the cell cycle in *cdc6* mutants. *Genes Dev* 11, 3375-3386.

2. Hofmann, J. F., and Beach, D. (1994). *cdt1* is an essential target of the Cdc10/Sct1 transcription factor: requirement for DNA replication and inhibition of mitosis. *Embo J* **13**, 425-434.
3. Zhou, C., S. H. Huang, et al. (1989). "Molecular cloning of *Saccharomyces cerevisiae* Cdc6 gene. Isolation, identification, and sequence analysis." *J Biol Chem* **264**(15): 9022-9029.
4. Zhou, C., and Jong, A. (1990). CDC6 mRNA fluctuates periodically in the yeast cell cycle. *J Biol Chem* **265**, 19904-19909.
5. Williams, R. S., R. V. Shohet, et al. (1997). "A human protein related to yeast Cdc6p." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(1): 142-147.
6. Berger, C., A. Strub, et al. (1999). "Identification and characterization of a mouse homolog to yeast Cdc6p." *Cytogenet Cell Genet* **86**(3-4): 307-316.
7. Feng, L., B. Wang, et al. (2000). "Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Cdc6 DNA-binding properties." *Mol Biol Cell* **11**(5): 1673-1685.
8. Herbig, U., C. A. Marlar, et al. (1999). "The Cdc6 nucleotide-binding site regulates its activity in DNA replication in human cells." *Mol Biol Cell* **10**(8): 2631-2645.
9. Liu, J., C. L. Smith, et al. (2000). "Structure and function of Cdc6/Cdc18: implications for origin recognition and checkpoint control." *Mol Cell* **6**(3): 637-648.
10. Peterson B.O. et al (1999) Phosphorylation of mammalian Cdc6 by CyclinA/CDK₂ regulates its subcellular localization *EMBO J.* **18**:396-410
11. Takei Y., Yamamoto K. and Tsujimoto G. (1999) Identification of the sequence responsible for the nuclear localization of human Cdc6. *FEBS Letters* **447**:292-296.
12. Herbig U., Griffith J.W. and Fanning E. (2000) Mutation of Cyclin/CDK Phosphorylation Sites in HsCdc6 Disrupts a Late Step in Initiation of DNA Replication in Human Cells. *Mol. Biol. Cell*, **11**, 4117 - 4130
13. Cook, J. G., Chasse, D. A., and Nevins, J. R. (2004). The regulated association of Cdt1 with minichromosome maintenance proteins and Cdc6 in mammalian cells. *J Biol Chem* **279**, 9625-9633.
14. Bell S.P. and Dutta A. (2002) DNA Replication in Eukaryotic Cells. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 333-374.
15. Rowles, A. and J. J. Blow (1997). "Chromatin proteins involved in the initiation of DNA replication." *Curr Opin Genet Dev* **7**(2): 152-157.
16. Toone, W. M., B. L. Aerne, et al. (1997). "Getting started: regulating the initiation of DNA replication in yeast." *Annu Rev Microbiol* **51**: 125-149.
17. Nishitani, H., Lygerou, Z., Nishimoto, T., and Nurse, P. (2000). The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast. *Nature* **404**, 625-628.

18. Liu, J., Smith, C. L., DeRyckere, D., DeAngelis, K., Martin, G. S., and Berger, J. M. (2000). Structure and function of Cdc6/Cdc18: implications for origin recognition and checkpoint control. *Mol Cell* **6**, 637-648.

19. Lee, C., Hong B., Choi, J.M., Kim, Y., Watanabe, S., Ishimi, Y., Enomoto, T., Tada, S., Kim, Y. & Cho, Y. (2004). Structural basis for inhibition of the replication licensing factor Cdt1 by geminin. *Nature* **2813**, 113437