第26卷 第11期 2014年11月 Vol. 26, No. 11 Nov., 2014

DOI: 10.13376/j.cbls/2014160 文章编号: 1004-0374(2014)11-1108-12



孔道春 教授

孔道春,北京大学生命科学学院、北大 - 清华生命科学联合中心教授, "973"项目首席科学家,现任全国酵母协会会长。孔道春教授长期从事 DNA 代谢研究,包括真核细胞 DNA 复制起始、复制叉稳定性维持、DNA 复制叉里的 DNA 合成反应、DNA 重组、DNA 损伤修复及细胞周期检验 点 (checkpoint)调控等方面的分子机制研究。孔道春教授及其团队在真核 细胞 DNA 复制起始、DNA 复制源的结构及起始位点的选择、复制叉稳定 性的维持、复制叉里的 DNA 合成反应—冈崎片段的成熟、DNA 重组及双 链 DNA 断裂修复等方面,有突破性的发现,相关成果将陆续发表。该实 验室的研究方向包括:(1) 真核细胞 DNA 复制起始的具体机制及其调控;(2) 真核细胞 DNA 复制叉稳定性的维持;(3) S 期细胞周期检验点在 DNA 代 谢中的作用;(4) DNA 损伤修复机制,如 NER、HR、dsDNA break repairs等; (5) 组蛋白修饰和染色体重构蛋白与 DNA 损伤修复的关系等。

# 真核细胞DNA复制叉稳定性维持机制的研究进展

刘 阳1, 孙静亚2, 孔道春1\*

(1北京大学生命科学学院,蛋白质与植物基因研究国家重点实验室,北京100871;2浙江海洋学院海洋科学与技术学院,环境科学系,舟山316004)

摘 要:DNA 复制是细胞最基本的生命活动之一,是生物体生存和繁殖的基础。从原核生物到真核生物, DNA 复制过程基本保守,分为复制起始和延伸两个阶段。复制叉是 DNA 复制的基本结构,它容易遭受多 种内源或外源的 DNA 复制压力影响而停顿,导致基因组不稳定,引起细胞凋亡、癌变或细胞死亡等严重 后果。为了维持复制叉的稳定,细胞进化出了一系列机制,其中最重要机制之一便是 S 期细胞周期检验点。 就影响 DNA 复制叉稳定的内外因素、S 期细胞周期检验点与复制叉稳定性的关系以及复制叉稳定性与相关 疾病的发生、治疗等问题进行简要综述。

关键词:DNA 复制;复制叉;S 期细胞周期检验点
中图分类号:Q343;Q75
文献标志码:A

# The progress in the mechanistic studies of maintaining replication fork stability in eukaryotic cells

LIU Yang<sup>1</sup>, SUN Jing-Ya<sup>2</sup>, KONG Dao-Chun<sup>1\*</sup>

(1 The National Key Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering, College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China; 2 Department of Environmental Science, College of Marine Science, Zhejiang Ocean University, Zhoushan City 316004, China)

Abstract: Chromosomal DNA replication is one of the most fundamental biological events, all cell or organism

收稿日期: 2014-10-02 基金项目: 国家自然科学基金项目(31170739); 国家重点基础研究发展计划("973"计划)(2010CB912201, 2013CB911001) \*通信作者: E-mail: kongdc@pku.edu.cn growth bases on DNA replication. From prokaryotes to eukaryotes, the basic processes of DNA replication are relatively conserved and divided into two major events, DNA replication initiation and extension. Replication forks are a basic structure of DNA replication and vulnerable to internal and external factors such as DNA lesion, high order of chromatin structure, DNA secondary structure etc. These factors could cause fork pausing and fork collapse, which subsequently results in genomic instability, cancer or cell death. In order to stabilize stalled forks, cells have developed a series of regulation systems, one of which is checkpoint. This article will give a brief review related to fork pausing, fork stabilization and checkpoint control.

Key words: DNA replication; replication fork; intra-S phase checkpoint

DNA 是生命体最主要的遗传物质。生命的延 续在一定程度上表现为 DNA 从亲代精确而完整地 传递到子代,这一过程依赖于 DNA 复制<sup>[1]</sup>。DNA 复制叉是真核生物 DNA 复制的基本结构, 它容易 受到体内或体外多种因素的干扰而暂时停顿,停顿 的复制叉容易垮塌,从而使得 DNA 复制不完全, 影响基因组稳定性,进而导致细胞凋亡、死亡或细 胞癌变等严重后果<sup>[2]</sup>。幸运的是,生物体已进化出 了一系列机制以维持复制叉的稳定,如细胞周期检 验点 (checkpoint)、DNA 损伤修复、DNA 同源重组 修复等,其中细胞周期检验点可能是稳定 DNA 复 制叉最重要的途径。当细胞遭遇复制压力如复制叉 停顿时,细胞周期检验点调控复制叉稳定、调节细 胞周期进程,确保 DNA 复制叉功能的完整,并促 使复制叉在复制压力解除时能快速而正确地完成 DNA 复制。

本文主要讨论维持 DNA 复制叉稳定性的具体 机制。首先,我们将阐释复制叉的基本进程以及影 响复制叉稳定性的内外因素。其次,我们将介绍 S 期细胞周期检验点在维持复制叉稳定性方面的一些 机制及目前在这方面的研究进展。最后,我们将讨 论复制叉稳定性与疾病治疗的关系。

### 1 DNA复制及复制叉

DNA 复制是真核细胞在有丝分裂 S 期过程中 发生的最重要的生物事件<sup>[1,3]</sup>。真核细胞 DNA 复制 起始发生在染色体的特定位点,即 DNA 复制源 (replication origins)<sup>[1,4]</sup>。真核生物的 DNA 复制源结 构在物种之间不保守。如在芽殖酵母 (S. cerevisiae)中, 其复制源平均长度为 100~150 bp,含有一个 11 bp 的保守序列,即 5'-(A/T)TTTA(T/C)(A/G)TTT(A/T)-3'<sup>[5-6]</sup>。而裂殖酵母 (S. pombe)的 DNA 复制源为 500~ 1 000 bp 的 DNA 序列,它没有非常明显的保守序列。 但一般来说,它往往含有两段或以上富含 AT 的不 对称序列,这些富含 AT 的不对称序列在维持复制 源活性方面起着至关重要的作用<sup>[7-9]</sup>。裂殖酵母 DNA 复制源中含有 1~2 个或多个 DNA 复制源识别 复合物 (origin recognition complex, ORC) 的结合位 点,除此之外,它还含有不被 ORC 结合的必需序 列<sup>[10-11]</sup>。最近,本实验室确定裂殖酵母 Sap1 是一 个 pre-RC (pre-replication complex) 的必需组分, 它 结合到 DNA 复制源特定的序列,并与 ORC 相互作 用,协同招募 Cdc18 (Cdc6 在裂殖酵母的同源蛋白) 到 DNA 复制源,直接参与复制前复合物 pre-RC 的形成(未发表)。在多细胞真核生物中,其复制 源平均大小为1000 bp 左右,同样缺乏明显的保守 序列<sup>[12]</sup>。最近,本实验室通过 CHIP-seq 的方法, 在裂殖酵母和人细胞中已大规模确定其 DNA 复制 源,为确定这两个物种,尤其是高等真核生物 DNA 复制源的精细结构,奠定了基础(未发表)。 不同 DNA 复制源的活性和强度各不相同,这决定 了其在 S 期起始 DNA 复制的效率<sup>[13-14]</sup>。一般来说, DNA 复制源的数目远多于 DNA 复制起始的数目。 因此,探索决定 DNA 复制源强弱、是否在 S 期起 始 DNA 合成以及起始 DNA 合成时间的因素将有 助于深入认识功能性复制源。尽管不同真核生物的 复制源结构特征差异显著,但 DNA 复制的具体机 制在不同物种中基本上是保守的[15]。

DNA 复制过程主要分为两步:起始和延伸<sup>[16]</sup>。 在 *S. cerevisiae* 中,ORC 蛋白首先识别并结合复制 源,作为 pre-RC 组装的平台<sup>[17]</sup>;然后募集 Cdc6 和 Cdt1 (Cdc10-dependent transcript 1) 到该复制源上, 最后 Cdc6 和 Cdt1 一起招募 MCM2-7 (minichromosome maintenance proteisns 2-7),从而完成 pre-RC 的组 装<sup>[18-19]</sup>,此时的 Mcm2-7 并不具有解旋酶活性(图 1A)。当细胞进入 G1-S 的转折期,CDK (cyclindependent kinase)和 DDK (Dbf4-dependent kinase) 激酶<sup>[20]</sup>将依次磷酸化一系列 PRC 蛋白并激活 pre-RC,从而促使 Cdc45(cell division cycle 45)和 GINS (Go-Ichi-Ni-San)招募到 pre-RC 上,形成具有解旋 酶活性的 CMG 复合物 (Cdc45-MCM-GINS complex), 从而激活复制源<sup>[19]</sup>(图 1A)。然后, RPA (replication protein A)、RFC (replication factor C)、PCNA (proliferating cellular nuclear antigen) 以及 DNA 聚合 酶 (DNA polymerase) 将顺序结合到被激活的复制 前复合体,从而开始 DNA 复制<sup>[1]</sup>。在*S. cerevisiae*中, 已经实现从 ORC 到 Mcm2-7 的体外顺序组装 pre-RC<sup>[18]</sup>。但在其他真核生物中尚未重复出 pre-RC 组装这一过程,这暗示其他真核生物中可能有 其他 pre-RC 组分还未被发现。最近本实验室发现 裂殖酵母 Sap1 蛋白及其在人细胞中的同源蛋白 Girdin (girders of actin filament) 也参与到 pre-RC 的 组装过程,这一发现将极大地促进我们对 DNA 复 制起始的完整认识和理解(未发表)。

DNA 复制叉是 DNA 复制的基本结构,功能性 的复制叉由"Y"字形的 DNA 以及结合在该处的 DNA 复制相关蛋白组成<sup>[21]</sup>,包括具有解旋酶活性 的 CMG 复合物、具有 DNA 聚合酶活性的复制延 伸因子 (如 Polα、Polε 和 Polδ等)、DNA 聚合酶结 合蛋白 (如 RFC等)、PCNA 以及其他复制蛋白, 如 Mcm10、Mrc1 (mediator of replication checkpoint protein 1)、Tof1 (topoisomerase 1-associated factor 1)、 Csm3 (chromosome segregation in meiosis protein 3)、 拓扑异构酶 Top1 (topoisomerase 1)、Top2 以及冈崎 片段成熟蛋白,如 RNaseH (ribonuclease H)、Dna2 (DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease 2)、 Fen1 (flap endonuclease 1)、Cdc24 (cell division cycle 24) 和 DNA ligase 等<sup>[22-23]</sup>(图 1B)。当 DNA 复制延伸时, CMG 复合物首先解开 DNA 双螺旋,为后续的 DNA 半保留合成提供模板链;同时,Top1 和 Top2 位于复制叉前后以解开 DNA 超螺旋结构,方便复制叉的顺利移动;RFC 和 PCNA 则连接 DNA 聚合酶 Polε 和 Polδ,这两种聚合酶分别合成连续的前导链和不连续的后随链;后随链的成熟则需要 Dna2、Fen1、Cdc24、DNA ligase 等的共同作用而形成完整连续的双链 DNA。

复制叉结构复杂而精密,因此,复制叉非常容 易受到多种因素的影响,从而导致复制叉暂时停顿 (fork pausing)。比如,在芽殖酵母中,当复制叉遭 遇 DNA-蛋白复合物或羟基脲 (hydroxyurea, HU) 引 起的 dNTPs 浓度降低时,复制受到胁迫而停顿,此 时 Mrc1 和 Tof1 将限制复制速度,同时 Mec1 (meitotic checkpiont protein 1) 和 Rad53 (radiation-sensitive mutants 53) 将稳定停顿的复制叉,阻止复制叉蛋白 的解离,避免复制叉垮塌(fork collapse)<sup>[24-26]</sup>。如果 不能稳定停顿的复制叉,将有可能造成复制叉的 倒转,从而形成病理性的"鸡爪"(chicken-feet)结 构<sup>[27-28]</sup>,这也是导致复制叉死亡的原因之一。在裂 殖酵母中,本实验室已经证实 S 期细胞周期检验点 中的 Cds1<sup>Chk2</sup> (checking DNA synthesis protein 1) 蛋 白可以直接磷酸化调控 Dna2 蛋白,从而防止复制 叉的倒转<sup>[28]</sup>;同时 Dna2 蛋白还可以与 Hus2 (hydroxyurea sensitive protein 2) 蛋白一起打开倒转的复制 叉,从而让这种病理性结构得以修复,保证了



图1 DNA复制起始模型和DNA复制叉

DNA 复制的精确和完整进行(未发表)。

# 2 影响复制叉稳定性的因素

DNA 复制叉容易受到多种内源性或外源性因素的影响而停顿,内源性因素主要包括 DNA 动态结构 (如 DNA 修饰、DNA-蛋白质复合物的形成、 DNA 拓扑结构、染色体重构、转录等)和部分 DNA 顺式元件<sup>[23]</sup>;外源性因素主要为紫外线 (UV)、 电离辐射 (IR) 和 DNA 损伤药物,如 HU 和甲磺酸 甲酯 (MMS)等造成的 DNA 损伤<sup>[28]</sup>。

### 2.1 DNA超螺旋结构和转录

在 DNA 复制过程中, CMG 复合物将 DNA 双 链打开, 这将造成 DNA 链的拓扑结构和构象的改 变<sup>[29]</sup>。B型双链 DNA 分子以右手双螺旋的形式稳 定存在,因此,在同一条 DNA 双链中,其中一条 单链与另一条单链必然在空间结构上发生多次交 叉:同时,这条双链 DNA 分子由于空间扭曲也使 其不同部分在空间结构上会构成交叉,这种交叉则 形成了 DNA 分子高度有序的超螺旋结构<sup>[30]</sup>。DNA 复制时, CMG 复合物将双链 DNA 解旋为两条单链 DNA,由于 DNA 超螺旋结构的存在,将导致复制 叉前端的 DNA 超螺旋结构越来越致密,而真核生 物染色体非常巨大,因此,染色体不能简单地通过 旋转 DNA 链的两端来松散这种结构。如果在 DNA 复制过程中,缺乏减少 DNA 链交叉次数的机制, 将会在 DNA 复制叉的前端形成紧密的超螺旋, 或 在复制叉分支点处的后方形成扭转,这都将严重影 响 DNA 复制叉的稳定,甚至直接导致 DNA 复制 叉的垮塌。为了保证复制的顺利完整进行,细胞进 化出了一系列机制来解决这一问题,其中最重要的 就是拓扑异构酶<sup>[31]</sup>。复制叉前的正超螺旋可以被 Top1 (I 类拓扑异构酶)和 Top2 (II 类拓扑异构酶) 解除<sup>[32]</sup>。而在复制叉分支点处后方的扭转并不影响 DNA 双链的解旋,但是复制叉分支点后方的扭转 将会导致新形成的姐妹染色单体相互缠绕,影响随 后姐妹染色单体的正常分离,从而严重影响基因组 的稳定性,而细胞主要通过Ⅱ类拓扑异构酶来解决 这一问题<sup>[31]</sup>。

真核生物 DNA 合成是在多位点几乎同时发生的,因此,一条染色体上将同时存在多个 DNA 复制叉。当相邻两个复制叉逐渐接近时,未复制的双链 DNA 逐渐减少,能容纳正超螺旋的空间也越来越少,因此,复制叉必须依赖复制叉分支点后方形成的扭转来保证复制的完整进行<sup>[33]</sup>。在姐妹染色单

体分离之前,这种由于相邻复制叉融合而导致的姐 妹染色单体交错,最终也会被 DNA 拓扑异构酶解 除<sup>[34]</sup>。抑制 Top1 和 Top2 的活性将导致复制叉分支 点处损伤的积累,这可能是染色体易碎点形成的原 因之一。

在 DNA 代谢过程中, DNA 复制叉与转录复合 体的偶然遭遇是不可避免的,这主要有两种方式: 相向和同向相遇。相向碰撞为 DNA 复制叉的头部 与转录复合体的头部相碰;同向碰撞为 DNA 复制 叉的头部与转录复合物的尾部相碰。不论 DNA 复 制叉是相向还是同向遭遇转录泡,都将使得 DNA 复制叉速度减慢,这可能是由于转录复合体与核膜 相互作用,从而导致转录复合体的可动性减弱,进 而引起复制叉在转录泡处的暂停[35-36]。相向碰撞有 可能导致复制叉死亡以及与转录相关的染色体重组 发生。而同向碰撞可能导致 DNA 聚合酶以 RNA 为 引物,引发不正常的 DNA 复制<sup>[37]</sup>。同向碰撞可能 还与 DNA 损伤修复密切相关,当同向碰撞发生在 DNA 损伤位点附近时, DNA 复制复合物可以跳过 DNA 损伤位点,重新开始 DNA 合成,从而防止复 制叉停顿或垮塌。

### 2.2 独特的DNA结构和染色体易碎点

DNA 重复序列,如微卫星序列、反向重复序列、 镜像或串联重复序列等,通常容易形成特殊 DNA 的结构,比如H-DNA、Z-DNA和S-DNA等<sup>[34]</sup>。 这些异常的 DNA 结构都将影响 DNA 复制叉的稳 定,导致重复序列的扩增,这是很多人类疾病或遗 传紊乱发生的机理之一<sup>[38]</sup>。重复序列的扩增还将导 致染色体易碎点的形成。当 DNA 合成受到部分抑 制时而出现缺口或断裂的染色体位点被称为染色体 易碎点<sup>[39]</sup>。易碎点分为常见型(所有个体都有)和 稀有型(在少于5%的个体中存在)两种。稀有型 的易碎点主要是由于重复序列的扩增造成,目前已 有大约30种人类遗传疾病与稀有型易碎点相关<sup>[40-41]</sup>。 而常见型的 DNA 易碎点通常是富含 AT 的 DNA 序 列,它们虽然是正常的染色体组分但却能直接抑制 DNA 复制过程,影响复制叉稳定<sup>[39]</sup>。酵母中的复 制减缓区 (replication slow zones) 也是影响复制叉稳 定性的重要因素,同时也被认为是常见型 DNA 易 碎点的一种,但复制减缓区并不富含 AT 序列,当 这些区域的 DNA 复制叉停顿或发生损伤时, ATR (酵母中为 Mec1/Rad3) 将被激活,从而维持停顿复 制叉的稳定<sup>[42]</sup>。在酵母中,对复制压力敏感的其他 DNA 序列主要为 Ty 元件 (Ty elements) 和 tRNA 基 因。减少 Pola 的量, 将导致 Ty 序列处染色体移位 频率的增高<sup>[43]</sup>。在 S 期细胞周期检验点缺失株中, 富含 tRNA 基因的序列将导致复制叉停顿并促进该 位点的 DNA 断裂和移位的发生<sup>[44]</sup>。酵母中还存在 复制叉障碍区 (replication fork barriers), 它通常是 位点特异的区域,比如端粒、着丝粒、tRNA 基因、 rDNA 和裂殖酵母中的性别转换区域 (mating type locus)。停顿的复制叉将导致同源重组诱导产生的 染色体重排。如将复制叉障碍 RTS1 序列定点导入 裂殖酵母 *S. pombe* 中的性别转换区域,可以通过调 节复制方向而高效地促使性别转换的发生<sup>[45-46]</sup>。

目前仍不清楚 DNA 复制在复制易碎点处受到 抑制的具体机制,可能是这些位点处的 DNA 形成 异常结构或构象。正如前文提到,DNA 的高级结 构将直接抑制复制叉的进行。在这些易碎点附近, 由于 DNA 序列简单,当复制叉移动到此处时,后 随链由于有部分单链的存在,将很容易形成发夹结 构或其他类似结构,从而影响复制叉的稳定。同时, 存在于这些 DNA 序列周边的异常染色体结构也可 能是抑制复制的原因之一。有实验室报道,被扩增 的 DNA 重复序列附近的 DNA 甲基化水平明显升 高,从而导致异染色质化<sup>[47]</sup>。特异的蛋白质结合到 这些 DNA 序列附近也将影响该处复制叉的稳定性, 如芽殖酵母中的 Hmol 蛋白结合 CAG 重复序列, 从而改变染色体结构,促使该区域基因组的不稳定 性增加<sup>[48-49]</sup>。

# 2.3 直接影响复制叉稳定性的理化因素

除了上述多种内源性因素可以影响 DNA 复制 叉的稳定性外,多种外源性的理化因素也能直接导 致复制叉的停顿,从而影响复制叉的稳定。羟基脲 (HU) 是一种常用抗肿瘤药物,它通过清除酪氨酰 自由基而抑制核糖核苷酸还原酶 M2 亚基的活性, 从而抑制 dNTPs 的合成,进而降低细胞内 dNTPs 浓度,形成复制压力,造成 DNA 复制叉的停顿, 最后抑制整个 DNA 复制过程<sup>[50]</sup>。用低浓度的 HU 处理细胞,细胞将被可逆地阻滞在S期早期;如果 用较高浓度 HU 处理细胞,将造成复制叉不可逆的 垮塌,导致复制不完全,最后引起细胞凋亡或死亡。 目前发现,在HU处理的情况下,S期细胞周期检 验点缺失株中的 DNA 复制还能继续缓慢完成一部 分 DNA 合成<sup>[51]</sup>。甲磺酸甲酯 (MMS) 是一种烷基 化试剂,同时也是一种致癌物。MMS 可以甲基化 修饰 DNA 链中的鸟嘌呤脱氧核糖核苷酸的 N<sup>7</sup> 和腺 嘌呤脱氧核糖核苷酸的 N<sup>3</sup>。起初发现同源重组缺失 株对于 MMS 特别敏感,因此,人们认为这种 DNA 甲基化修饰可以直接造成 DNA 双链断裂 (doublestrand DNA breaks, DSBs)<sup>[52]</sup>。但是,现在认为, MMS 直接停顿复制叉,而同源重组缺失株很难修 复受损的复制叉,从而表现出对 MMS 的敏感性<sup>[52]</sup>。 当同时使用 MMS 和 PARP (poly(ADP-ribose)polymerase) 抑制剂时,则会在基因组上产生双链 DNA 断裂<sup>[53]</sup>。 UV 是自然界最普遍存在的一种能造成 DNA 损伤 的因素,它可以使 DNA 链中相邻的胸腺嘧啶偶 联在一起,从而干扰双链 DNA 的正常配对,导致 DNA 结构的异常,最终造成 DNA 复制叉的停顿。

## 3 S期细胞周期检验点

细胞周期检验点 (checkpoint) 是指维持细胞周 期各时相的正常秩序并确保各时相顺序转换的生化 调控机制<sup>[54]</sup>。人们在研究 UV 和电离辐射引起的细 菌基因突变时发现,细菌(E. coli)可以自我感知并 修复 DNA 突变,而首先发现原核细胞存在一种调 控系统,被称为细菌的 SOS 系统<sup>[55-56]</sup>。真核生物 细胞周期检验点的研究则始于 Hartwell 实验室和 Nurse 实验室。Hartwell 实验室以芽殖酵母为模型, 筛选出大量的温度敏感株。他们发现,其中一些温 度敏感株在限制性温度下生长时,细胞会停滞在某 一特定的细胞时期:通过遗传分析发现,这些突变 蛋白主要与细胞周期和随后命名为细胞周期检验点 的调控系统相关<sup>[57-58]</sup>。Nurse 及其同事在裂殖酵母 中进行了类似的筛选,他们也筛选出一批与细胞周 期检验点相关的蛋白质;并且,他们首先在人细胞 中确定并证明了 Cdc2 蛋白是高度保守的细胞周期 调控蛋白<sup>[59]</sup>,这也暗示了细胞周期检验点在真核生 物细胞中是比较保守的。

细胞周期检验点调控通路由三部分组成:感知 信号、信号转导和效应产生<sup>[60]</sup>。这三个过程紧密相 关,确保细胞周期有序而完善地进行。细胞周期检 验点主要包括 G1/S 检验点、S 期细胞周期检验点 和 G2/M 细胞周期检验点,其中 S 期细胞周期检验 点是维持 DNA 复制叉稳定的最重要机制,本文将 着重概述。

前面我们已经提到,HU、MMS和UV可以直接导致复制叉的停顿,在停顿的DNA复制叉附近, 会产生一些较长片段的单链DNA(图2A)。RPA蛋 白可以识别并结合这些单链DNA,进而募集其他 相关蛋白,促使ATR蛋白自身磷酸化,完成S期 细胞周期检验点通路的激活,稳定停顿的复制叉, 并最终完成 DNA 损伤修复<sup>[61]</sup>。因此,被 RPA 结合的较长单链 DNA 是 ATR 通路激活的重要信号。S 期细胞周期检验点的信号转导主要依赖于 ATR-Chk1、ATR-Chk2 等信号通路顺序磷酸化一系列相 关蛋白质而实现。

# 3.1 ATR蛋白

1996年,Schreiber和Carr实验室分别在人细胞和裂殖酵母中独立发现了ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein)蛋白<sup>[62-63]</sup>。不久之后,ATR 的相互作用蛋白ATRIP (ATR interaction protein)也被发现<sup>[64]</sup>。在ATR众多相互作用蛋白中,ATRIP起着非常重要的作用,它与ATR 的稳定、定位和激活都有直接关系。ATR 蛋白在高等真核生物发育中起着重要作用,它的缺失会直接导致小鼠在胚胎期的死亡,这可能是由于ATR 与DNA 复制和 DNA 损伤修复息息相关<sup>[65-66]</sup>。这里,将着重介绍ATR 蛋白在稳定停顿复制叉中的作用。

当用 MMS 和 HU 等药物处理细胞后, DNA 复制叉由于受到复制压力会停顿下来, 在停顿的 DNA 复制叉附近会产生较长的单链 DNA 片段。 RPA 是单链结合蛋白, 可以感知并结合到这些单链 区域。随后,9-1-1 (Rad9-Hus1-Rad1)、TOPBP1 (topoisomerase-binding protein 1) 和 ATRIP 相继结合到 RPA-ssDNA 区域。然后, ATRIP 募集 ATR 到达该 位点,并与TOPBP1蛋白一起激活ATR蛋白<sup>[67]</sup>(图2)。2011年,Elledge实验室报道了一个新的人细胞蛋白RHINO,能和9-1-1和TOPBP1相互作用,他们发现RHINO也是ATR激活过程所必需的蛋白质之一<sup>[68]</sup>。ATR是一个自激活的过程,其1989位丝氨酸的磷酸化是其激活的主要标志<sup>[69]</sup>。在人细胞S期细胞周期检验点激活过程中,ATR蛋白被激活之后,ATR激活的下游核心蛋白激酶不是Chk2蛋白,而主要是Chk1蛋白。ATR蛋白通过调控Chk1蛋白,从而达到控制细胞周期、稳定停顿复制叉并修复DNA损伤的目的。在酵母的S期细胞周期检验点中,Chk1和Chk2蛋白的激活都依赖于ATR蛋白<sup>[70-71]</sup>。

#### 3.2 Chk1蛋白和Chk2蛋白

Chk1 (checkpoint kinase 1) 蛋白是 ATR 蛋白激 酶的下游底物之一,它接收 ATR 的信号并传递给 控制细胞生命活动的其他重要效应蛋白质。从酵母 到人,Chk1 蛋白都比较保守,都在 S 期细胞周期 检验点过程中发挥重要的作用,但是,Chk1 及其 同源蛋白在人和酵母中的功能却有所差异。在爪蟾 和人细胞中,被激活的 ATR 通过 Claspin 介导 Chk1 的激活<sup>[72]</sup>。在裂殖酵母中,ATR 主要激活 Cds1 蛋 白而不是 Chk1 蛋白,以维持复制叉的稳定。1998年, Carr 和 Russell 实验室几乎同时发现 Cds1 蛋白参与



图2 ATR-Chk1通路激活过程及效应发生

第26卷

DNA 损伤应答<sup>[73-75]</sup>。Cds1 蛋白与人细胞的 Chk2 蛋白序列同源,但其功能却与人细胞的 Chk1 蛋白 更为接近。Rad3/Rad26<sup>ATR/ATRIP</sup> 和 Mrc1 蛋白促使 Cds1 蛋白的激活<sup>[76-77]</sup>,激活后的 Cds1 蛋白可以稳定停 顿的复制叉,并启动 DNA 修复系统,还可以直接 磷酸化 Cdc25 以调控裂殖酵母细胞周期<sup>[73]</sup>。因此, Cds1 蛋白在维持 S 期基因组稳定性方面发挥着关 键的作用。

在裂殖酵母中, Chkl 蛋白缺失会导致细胞在 DNA 损伤存在的情况下直接通过而不停留在 G2/M 期,这暗示Chk1蛋白功能的发挥主要在G2/M期<sup>[78]</sup>。 但是其他实验发现,裂殖酵母 Chk1 蛋白在 S 期中 也有比较重要的作用。比如,在Cds1蛋白缺失的 情况下, UV、MMS 引起的细胞损伤也可以激活 Chk1蛋白从而使细胞停留在 S 期<sup>[79]</sup>;即便在 Cds1 蛋白存在并被激活的情况下, Chkl 在 S 期晚期也 会被磷酸化<sup>[80]</sup>。这暗示 Chk1 蛋白很可能作用在 Cds1蛋白之后,负责S期晚期对细胞基因组完整 性的检测,决定细胞是否进入G2期。另外,其他 实验室还发现 Chkl 蛋白被激活后,可以导致细胞 停留在 G1/S 期<sup>[81]</sup>。这表明 Chk1 在 S 期早期也发 挥着重要作用。也就是说,裂殖酵母 Chk1 蛋白在 S期开头和结尾处都起到检查的作用,而Cds1则 是在 DNA 复制过程中发挥着关键作用。

相对于 ATR 蛋白激酶, Chk1 和 Cds1 蛋白则 是更加直接的细胞周期调控因子, 它跟细胞多项生 命活动都有紧密而又重要的联系。Chk1 和 Cds1 蛋 白的缺失会引起细胞对 HU、MMS、UV 和电离辐 射的敏感, 罹患癌症的几率也相应增高。目前认为 Chk1 和 Chk2 蛋白都是抑癌因子, 也是比较有潜力 的能控制癌症的靶标蛋白<sup>[82-84]</sup>。

## 3.3 S期细胞周期检验点的效应发生

S 期细胞周期检验点对于稳定停顿的复制叉具 有极其重要的作用。但是,S 期细胞周期检验点的 相关蛋白主要都是蛋白激酶,这些蛋白激酶不能直 接稳定停顿的复制叉以维持基因组的稳定性,它必 须通过磷酸化调控其他蛋白以发挥其功能<sup>[85]</sup>。

在人细胞中,S期细胞周期检验点通过磷酸化 p53 和 Cdc25 蛋白,调节细胞周期相关蛋白的表达或活性,从而将细胞周期停滞或延迟在 S 期,为细胞修复损伤的 DNA 提供充足的时间<sup>[86]</sup>。在 *S. pombe* 中,Chk1或Cds1蛋白直接磷酸化Cdc25蛋白,抑制 Cdc25 的磷酸酶活性,从而导致 CDK 的活性被抑制,最后使得 S 期被延长<sup>[73]</sup>(图 2B)。

S 期细胞周期检验点还可以抑制晚复制源 (late origin)的起始。在 S. cerevisiae 中, Rad53 可 以直接磷酸化 Sld3 (synthetic lethal mutations with *dpb11-1*)蛋白,阻碍 Sld2-Dpb11-Sld3 复合物形成, 导致 Cdc45 不能定位到被激活的 MCM 蛋白处, 抑制晚复制源处 DNA 的复制起始<sup>[87-88]</sup> (图 2B)。

S 期细胞周期检验点还可以直接稳定停顿的复制叉,防止其倒转或垮塌。2012年,本实验室发现,在 S. pombe 中, Cds1 蛋白可以直接磷酸化 Dna2 蛋白,被磷酸化的 Dna2 蛋白可以更好地结合在染色质上,直接防止停顿复制叉倒转<sup>[28]</sup>。有证据表明,Cds1/Rad53 可以磷酸化 Exo1 和 Mus81 蛋白,使得它们从染色质上掉落下来,以免它们利用自身的核酸酶活性破坏正常的复制叉结构<sup>[89-90]</sup>(图 2B)。

S 期细胞周期检验点也可以直接减慢复制速率,以降低复制压力对复制叉稳定性的影响。2012年,Botchan 实验室发现,在非洲爪蟾中,Chk2蛋白可以在体外直接磷酸化 Mcm3/4、Psf2蛋白,从而抑制 CMG 复合物的解旋酶活性,降低 DNA 的合成速率<sup>[91]</sup>。不仅如此,S 期细胞周期检验点还可以抑制不正常同源重组的发生,并促进复制叉在复制压力解除后重新开始 DNA 合成<sup>[21</sup>(图 2B)。

# 3.4 S期细胞周期检验点与DNA复制的关系

前文已经提到 S 期细胞周期检验点在稳定停顿 的复制叉方面具有重要作用,除此以外,其在正常 DNA 复制过程中也发挥着显著作用。S 期细胞周期 检验点与 DNA 复制的关系具体表现在以下几方面。

(1) 保障 DNA 复制的正常进行。S 期细胞周期 检验点不只是在 DNA 复制受到外界胁迫时才被激 活,在正常的 DNA 复制过程中,S 期细胞周期检 验点也是被微弱激活并发挥其功能。在正常的 DNA 复制过程中, Chk1 蛋白依赖于 ATR 而被激活, 然后 Chk1 可以调节 Cdc25A 的活性,从而调节细 胞周期的正常进行<sup>[92]</sup>。在正常的 DNA 复制过程中, S期细胞周期检验点主要调节复制起始源的起始 时间和顺序,即促进早复制起始源的复制起始,抑 制晚复制起始源在 S 期早期的复制起始,并确保 着丝粒和端粒在染色质其他区域完成复制后再复 制<sup>[93]</sup>。有实验证实,在HU处理的情况下,ATR或 Chk1 缺失株中的晚复制起始源的复制起始将不 能被调控,从而导致 DNA 复制异常<sup>[94]</sup>。ATR<sup>-/-</sup>或 Chk1<sup>-/-</sup>将导致小鼠在胚胎时期就死亡<sup>[95]</sup>。在 S. cerevisiae 中, Mec1 (ATR 的同源蛋白)和 Rad53 (Chk1的同源蛋白)的缺失株不能存活,除非将

Sml1 一起敲除<sup>[96]</sup>。而这些蛋白质被敲除后,主要 影响了 DNA 复制的正确进行,从而导致细胞和个 体的死亡。

(2) 促进 DNA 复制叉跨越天然复制障碍。染色 质中存在很多的转录泡和天然元件,如简单重复序 列、复制缓慢区、复制障碍区、染色体易碎点等, 这些都会胁迫 DNA 复制陀诺进行,影响基因组 的稳定性。在 DNA 复制叉跨越复制屏障等天然元 件过程中,S期细胞周期检验点发挥着非常重要的 作用。当复制叉在 DNA 复制屏障处停顿时,S期 细胞周期检验点将被激活,来稳定这些停顿的复制 叉;如果S期细胞周期检验点不能发挥其正常功能, 将导致大量 DSB 的产生,从而引发高频率的 DNA 重组发生<sup>[97]</sup>。实验证实,S. cerevisiae 中,在 Mec1 功能缺失的情况下,DNA 复制叉穿过复制屏障的 速度明显减缓,并且有大量 DNA 断裂产生<sup>[98]</sup>。

(3) 稳定停顿的 DNA 复制叉。S 期细胞周期检 验点除了能维持内源性的因素造成的 DNA 复制叉 停顿外,还在维持由各种外源性因素造成的 DNA 复制叉停顿中发挥着重要作用。如果停顿的 DNA 复制叉不能被有效稳定,将造成复制叉的坍塌,引 起 DNA 复制不完全,最后导致细胞凋亡、死亡和 癌变等。当 DNA 复制叉遭受复制压力而停顿下来 后, S 期细胞周期检验点通路将被快速而有效地激 活, 被激活的 S 期细胞周期检验点可以维持 DNA 聚合酶在 DNA 复制叉处的结合, 使得 DNA 复制 叉在复制压力解除后可以继续完成 DNA 合成。 Diffley 实验室发现,用 MMS 处理 S 期细胞周期检 验点缺失的 S. cerevisiae 菌株,将导致~16%的停 顿复制叉垮塌,并且晚复制起始源也将在 S 期早期 开始复制起始<sup>[99]</sup>。Foiani 实验室则发现,在用 HU 处理的 rad53 突变株中, 大约有 10% 的 DNA 复制 叉倒转<sup>[100]</sup>。因此,他们认为 DNA 复制叉的倒转是 复制叉垮塌的主要原因。2012年,本实验室在S. pombe 中发现, S 期细胞周期检验点通过磷酸化调 控 Dna2 蛋白来防止被停顿复制叉的倒转,这使得 我们更深入地认识了S期细胞周期检验点在维持停 顿的复制叉中的重要功能<sup>[28]</sup>。

(4) 促进停顿复制叉重新开始 DNA 合成。当复制压力解除后, S 期细胞周期检验点还将促使停顿 复制叉继续完成 DNA 合成。DNA 复制的重新起始 依赖于 ATR 和 ATM 蛋白,而且 Mre11、BLM 和 PARP 在其中也起着至关重要的作用<sup>[101]</sup>。在 DNA 复制重启过程中, S 期细胞周期检验点将调节一系 列相关蛋白,其中最重要的是 CMG 蛋白复合物和 DNA 聚合酶等。复制叉停顿时,ATM 和 ATR 蛋白 可以直接磷酸化 MCM 蛋白,被磷酸化后的 MCM 复合物可以有效地继续结合在被停顿的复制叉 处<sup>[102]</sup>;同时,S 期细胞周期检验点中的其他蛋白 也将磷酸化 GINS 和 Mcm2-7 中的部分亚基从而抑 制其解旋酶活性<sup>[91]</sup>。ATM、ATR 和 Sgs1 蛋白促进 DNA 聚合酶与停顿复制叉的稳定结合<sup>[103]</sup>,如果 DNA 聚合酶从停顿复制叉上解离,其与停顿复制 叉的再次结合则依赖于 ATM 和 ATR 蛋白的直接调 控<sup>[104]</sup>。总之,S 期细胞周期检验点在整个 DNA 复 制过程中都发挥着极其重要的作用,维持了复制叉 的稳定并保证了 DNA 复制的精确、完整、有序的 进行。

### 4 复制叉稳定性与疾病的发生发展和治疗

DNA 复制叉的稳定与基因组的稳定密切相关。 不稳定的基因组通常将导致疾病的发生, 甚至细胞 或个体的死亡,因此,研究稳定 DNA 复制叉的具 体机制有助于认识相关疾病的发生并指导相关疾病 的治疗。ATM 蛋白突变后将导致 AT 综合症 (Ataxia telangiectasia), Seckel 综合症则是由于 ATR 蛋白突 变而造成的,这两种疾病都是神经退行性疾病,严 重威胁人类健康<sup>[105-107]</sup>。Chk1蛋白则与乳腺癌、结 肠癌、肝癌、胃癌和鼻咽癌的发生和形成有重要相 关性,因此,Chk1蛋白被认为是癌症治疗的重要 靶标<sup>[108-109]</sup>。一些癌症通过高表达 Chk1 蛋白从而能 耐受由于治疗而产生的 DNA 损伤,针对这类癌症, 通过抑制 Chk1 的表达,可以很好地解决其对放疗 或化疗的耐受[110]。由于肿瘤细胞的增殖分裂速度 高于正常细胞,因此,能影响复制叉稳定性的药物 或手段都可以成为控制肿瘤细胞的潜在方法。HU 最初就应用于治疗骨髓及外骨髓增殖紊乱,特别是 真性红细胞增多症和血小板增多症,它还被应用于 降低镰刀形红细胞贫血症的疼痛频率,也曾被应用 于艾滋病的治疗: MMS 之前也被用作抗肿瘤药物。 因此,关于 DNA 复制叉稳定性的研究将有效地指 导癌症治疗。

# 5 展望

目前,我们已经知道停顿复制叉的稳定需要一 系列生化事件的协同作用。当复制叉发生停顿时, S期细胞周期检验点将阻滞细胞周期进程,直接调 控复制叉相关蛋白而保证复制叉的功能完整性,并 抑制晚复制源的起始;同时,S期细胞周期检验点 还调控其他蛋白质,如一些核酸酶或解旋酶等直 接或间接稳定复制叉,其他蛋白质,如染色质重构 蛋白(chromatin remodeling proteins)、组蛋白变体及 组蛋白修饰蛋白等都能影响复制叉的稳定<sup>[111-114]</sup>。 但是,我们对维持复制叉稳定性的机制仍然有很多 不清楚之处,如转录与停顿复制叉稳定的关系、S 期细胞周期检验点具体调控哪些复制相关蛋白来稳 定停顿的复制叉、复制叉稳定性与其他类型 DNA 损失的相互联系等。最近的研究主要集中在探寻能 维持复制叉稳定性的新蛋白质或新机制以及进一步 阐明维持复制叉稳定的调节机制,如已知蛋白质的 翻译后修饰调控以及重要蛋白质的定位调控等。虽 然这些研究取得了进步,但这只是冰山一角,DNA 复制叉稳定性的维持机制仍需进一步深入探索。

## [参考文献]

- [1] Bell SP, Dutta A. DNA replication in eukaryotic cells. Annu Rev Biochem, 2002, 71: 333-74
- [2] Friedel AM, Pike BL, Gasser SM. ATR/Mec1: coordinating fork stability and repair. Curr Opin Cell Biol, 2009, 21(2): 237-44
- [3] Nurse P. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. Cell, 2000, 100(1): 71-8
- [4] DePamphilis ML. Origins of DNA replication that function in eukaryotic cells. Curr Opin Cell Biol, 1993, 5(3): 434-41
- [5] Palzkill TG, Newlon CS. A yeast replication origin consists of multiple copies of a small conserved sequence. Cell, 1988, 53(3): 441-50
- [6] Newlon CS, Theis JF. The structure and function of yeast ARS elements. Curr Opin Genet Dev, 1993, 3(5): 752-8
- [7] Clyne RK, Kelly TJ. Genetic analysis of an ARS element from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. EMBO J, 1995, 14(24): 6348-57
- [8] Okuno Y, Satoh H, Sekiguchi M, et al. Clustered adenine/ thymine stretches are essential for function of a fission yeast replication origin. Mol Cell Biol, 1999, 19(10): 6699-709
- [9] Kim SM, Huberman JA. Multiple orientation-dependent, synergistically interacting, similar domains in the ribosomal DNA replication origin of the fission yeast, *Schizo*saccharomyces pombe. Mol Cell Biol, 1998, 18(12): 7294-303
- [10] Kong D, DePamphilis ML. Site-specific DNA binding of the *Schizosaccharomyces pombe* origin recognition complex is determined by the Orc4 subunit. Mol Cell Biol, 2001, 21(23): 8095-103
- [11] Kong D, DePamphilis ML. Site-specific ORC binding, pre-replication complex assembly and DNA synthesis at *Schizosaccharomyces pombe* replication origins. EMBO J, 2002, 21(20): 5567-76

- [12] Aladjem MI, Rodewald LW, Kolman JL, et al. Genetic dissection of a mammalian replicator in the human β-globin locus. Science, 1998, 281(5379): 1005-9
- [13] Aggarwal BD, Calvi BR. Chromatin regulates origin activity in *Drosophila* follicle cells. Nature, 2004, 430(6997): 372-6
- [14] Masai H, Matsumoto S, You Z, et al. Eukaryotic chromosome DNA replication: where, when, and how? Annu Rev Biochem, 2010, 79: 89-130
- [15] Hayashi M, Masukata H. [Regulation of DNA replication and its roles in chromosome maintenance: from DNA replication to chromatin replication]. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 2006. 51(14 Suppl): 2117-22
- [16] Kelly TJ, Brown GW. Regulation of chromosome replication. Annu Rev Biochem, 2000, 69: 829-80
- [17] Bell SP, Stillman B. ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. Nature, 1992, 357(6374): 128-34
- [18] Diffley JF, Cocker JH, Dowell SJ, et al. Two steps in the assembly of complexes at yeast replication origins *in vivo*. Cell, 1994, 78(2): 303-16
- [19] Diffley JF. Eukaryotic DNA replication. Curr Opin Cell Biol, 1994, 6(3): 368-72
- [20] Dowell SJ, Romanowski P, Diffley JF. Interaction of Dbf4, the Cdc7 protein kinase regulatory subunit, with yeast replication origins *in vivo*. Science, 1994, 265(5176): 1243-6
- [21] Waga S, Stillman B. The DNA replication fork in eukaryotic cells. Annu Rev Biochem, 1998, 67: 721-51
- [22] Fachinetti D, Bermejo R, Cocito A, et al. Replication termination at eukaryotic chromosomes is mediated by Top2 and occurs at genomic loci containing pausing elements. Mol Cell, 2010, 39(4): 595-605
- [23] Branzei D, Foiani M. Maintaining genome stability at the replication fork. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010, 11(3): 208-19
- [24] LeClere AR, Yang JK, Kirkpatrick DT. The role of CSM3, MRC1, and TOF1 in minisatellite stability and large loop DNA repair during meiosis in yeast. Fungal Genet Biol, 2013, 50: 33-43
- [25] Razidlo DF, Lahue RS. Mrc1, Tof1 and Csm3 inhibit CAG.CTG repeat instability by at least two mechanisms. DNA Repair: Amst, 2008, 7(4): 633-40
- [26] Katou Y, Kanoh Y, Bando M, et al. S-phase checkpoint proteins Tof1 and Mrc1 form a stable replication-pausing complex. Nature, 2003, 424(6952): 1078-83
- [27] Sogo JM, Lopes M, Foiani M. Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects. Science, 2002, 297(5581): 599-602
- [28] Hu J, Sun L, Shen F, et al. The intra-S phase checkpoint targets Dna2 to prevent stalled replication forks from reversing. Cell, 2012, 149(6): 1221-32
- [29] Leon-Ortiz AM, Svendsen J, Boulton SJ. Metabolism of DNA secondary structures at the eukaryotic replication fork. DNA Repair: Amst, 2014, 19: 152-62
- [30] Postow L, Crisona NJ, Peter BJ, et al. Topological challenges to DNA replication: conformations at the fork. Proc

Natl Acad Sci USA, 2001, 98(15): 8219-26

- [31] Wang JC. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(6): 430-40
- [32] Bermejo R, Doksani Y, Capra T, et al. Top1-and Top2mediated topological transitions at replication forks ensure fork progression and stability and prevent DNA damage checkpoint activation. Genes Dev, 2007. 21(15): 1921-36
- [33] Fields-Berry SC, DePamphilis ML. Sequences that promote formation of catenated intertwines during termination of DNA replication. Nucleic Acids Res, 1989, 17(8): 3261-73
- [34] Mirkin EV, Mirkin SM. Replication fork stalling at natural impediments. Microbiol Mol Biol Rev, 2007, 71(1): 13-35
- [35] Bermejo R, Kumar A, Foiani M. Preserving the genome by regulating chromatin association with the nuclear envelope. Trends Cell Biol, 2012, 22(9): 465-73
- [36] Olavarrieta L, Hernández P, Krimer DB, et al. DNA knotting caused by head-on collision of transcription and replication. J Mol Biol, 2002, 322(1): 1-6
- [37] Pomerantz RT, O'Donnell M. The replisome uses mRNA as a primer after colliding with RNA polymerase. Nature, 2008, 456(7223): 762-6
- [38] Mirkin SM. DNA structures, repeat expansions and human hereditary disorders. Curr Opin Struct Biol, 2006, 16(3): 351-8
- [39] Durkin SG, Glover TW. Chromosome fragile sites. Annu Rev Genet, 2007, 41: 169-92
- [40] Orr HT, Zoghbi HY. Trinucleotide repeat disorders. Annu Rev Neurosci, 2007, 30: 575-621
- [41] Lutz RE. Trinucleotide repeat disorders. Semin Pediatr Neurol, 2007, 14(1): 26-33
- [42] Casper AM, Nghiem P, Arlt MF, et al. ATR regulates fragile site stability. Cell, 2002, 111(6): 779-89
- [43] Lemoine FJ, Degtyareva NP, Lobachev K, et al. Chromosomal translocations in yeast induced by low levels of DNA polymerase a model for chromosome fragile sites. Cell, 2005, 120(5): 587-98
- [44] Admire A, Shanks L, Danzl N, et al. Cycles of chromosome instability are associated with a fragile site and are increased by defects in DNA replication and checkpoint controls in yeast. Genes Dev, 2006, 20(2): 159-73
- [45] Dalgaard JZ, Klar AJ. A DNA replication-arrest site RTS1 regulates imprinting by determining the direction of replication at mat1 in *S. pombe*. Genes Dev, 2001, 15(16): 2060-8
- [46] Lambert S, Watson A, Sheedy DM, et al. Gross chromosomal rearrangements and elevated recombination at an inducible site-specific replication fork barrier. Cell, 2005, 121(5): 689-702
- [47] Hansen RS, Canfield TK, Lamb MM, et al. Association of fragile X syndrome with delayed replication of the FMR1 gene. Cell, 1993, 73(7): 1403-9
- [48] Lu J, Kobayashi R, Brill SJ. Characterization of a high mobility group 1/2 homolog in yeast. J Biol Chem, 1996, 271(52): 33678-85
- [49] Kim H, Livingston DM. Suppression of a DNA poly-

merase delta mutation by the absence of the high mobility group protein Hmo1 in *Saccharomyces cerevisiae*. Curr Genet, 2009, 55(2): 127-38

- [50] Platt OS. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia. N Engl J Med, 2008, 358(13): 1362-9.
- [51] Sabatinos SA, Green MD, Forsburg SL. Continued DNA synthesis in replication checkpoint mutants leads to fork collapse. Mol Cell Biol, 2012, 32(24): 4986-97
- [52] Lundin C, North M, Erixon K, et al. Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable *in vivo* DNA double-strand breaks. Nucleic Acids Res, 2005, 33(12): 3799-811
- [53] Pachkowski BF, Tano K, Afonin V, et al. Cells deficient in PARP-1 show an accelerated accumulation of DNA single strand breaks, but not AP sites, over the PARP-1-proficient cells exposed to MMS. Mutat Res, 2009, 671(1-2): 93-9
- [54] Nasmyth K. Viewpoint: putting the cell cycle in order. Science, 1996, 274(5293): 1643-5
- [55] Garvey N, Witkin EM, Brash DE. Ultraviolet photoproducts at the ochre suppressor mutation site in the glnU gene of *Escherichia coli*: relevance to "mutation frequency decline". Mol Gen Genet, 1989, 219(3): 359-64
- [56] Witkin EM. Ultraviolet mutagenesis and the SOS response in *Escherichia coli*: a personal perspective. Environ Mol Mutagen, 1989, 14 (Suppl 16): 30-4
- [57] Hartwell LH. Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. Exp Cell Res, 1971, 69(2): 265-76
- [58] Culotti J, Hartwell LH. Genetic control of the cell division cycle in yeast. 3. Seven genes controlling nuclear division. Exp Cell Res, 1971, 67(2): 389-401
- [59] Lee MG, Nurse P. Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene cdc2. Nature, 1987, 327(6117): 31-5
- [60] Osborn AJ, Elledge SJ, Zou L. Checking on the fork: the DNA-replication stress-response pathway. Trends Cell Biol, 2002, 12(11): 509-16
- [61] Zou L, Elledge SJ. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. Science, 2003, 300(5625): 1542-8
- [62] Cimprich KA, Shin TB, Keith CT, et al. cDNA cloning and gene mapping of a candidate human cell cycle checkpoint protein. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(7): 2850-5
- [63] Bentley NJ, Holtzman DA, Flaggs G, et al. The Schizosaccharomyces pombe rad3 checkpoint gene. EMBO J, 1996, 15(23): 6641-51
- [64] Cortez D, Guntuku S, Qin J, et al. ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. Science, 2001, 294(5547): 1713-6
- [65] Brown EJ, Baltimore D. ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. Genes Dev, 2000, 14(4): 397-402
- [66] Petermann E, Caldecott KW. Evidence that the ATR/Chk1 pathway maintains normal replication fork progression during unperturbed S phase. Cell Cycle, 2006, 5(19): 2203-9

- [67] Nam EA, Cortez D. ATR signalling: more than meeting at the fork. Biochem J, 2011, 436(3): 527-36
- [68] Cotta-Ramusino C, McDonald ER 3rd, Hurov K, et al. A DNA damage response screen identifies RHINO, a 9-1-1 and TopBP1 interacting protein required for ATR signaling. Science, 2011, 332(6035): 1313-7
- [69] Liu S, Shiotani B, Lahiri M, et al. ATR autophosphorylation as a molecular switch for checkpoint activation. Mol Cell, 2011, 43(2): 192-202
- [70] Lopez-Girona A, Tanaka K, Chen XB, et al. Serine-345 is required for Rad3-dependent phosphorylation and function of checkpoint kinase Chk1 in fission yeast. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(20): 11289-94
- [71] Tanaka K, Russell P. Cds1 phosphorylation by Rad3-Rad26 kinase is mediated by forkhead-associated domain interaction with Mrc1. J Biol Chem, 2004, 279(31): 32079-86
- [72] Kumagai A, Dunphy WG. Claspin, a novel protein required for the activation of Chk1 during a DNA replication checkpoint response in *Xenopus* egg extracts. Mol Cell, 2000, 6(4): 839-49
- [73] Zeng Y, Forbes KC, Wu Z, et al. Replication checkpoint requires phosphorylation of the phosphatase Cdc25 by Cds1 or Chk1. Nature, 1998, 395(6701): 507-10
- [74] Boddy MN, Furnari B, Mondesert O, et al. Replication checkpoint enforced by kinases Cds1 and Chk1. Science, 1998, 280(5365): 909-12
- [75] Lindsay HD, Griffiths DJ, Edwards RJ, et al. S-phase-specific activation of Cds1 kinase defines a subpathway of the checkpoint response in *Schizosaccharomyces pombe*. Genes Dev, 1998, 12(3): 382-95
- [76] Tanaka K, Russell P. Mrc1 channels the DNA replication arrest signal to checkpoint kinase Cds1. Nat Cell Biol, 2001, 3(11): 966-72
- [77] Alcasabas AA, Osborn AJ, Bachant J, et al. Mrc1 transduces signals of DNA replication stress to activate Rad53. Nat Cell Biol, 2001, 3(11): 958-65
- [78] Walworth N, Davey S, Beach D. Fission yeast chk1 protein kinase links the rad checkpoint pathway to cdc2. Nature, 1993, 363(6427): 368-71
- [79] Martinho RG, Lindsay HD, Flaggs G, et al. Analysis of Rad3 and Chk1 protein kinases defines different checkpoint responses. EMBO J, 1998, 17(24): 7239-49
- [80] Brondello JM, Boddy MN, Furnari B, et al. Basis for the checkpoint signal specificity that regulates Chk1 and Cds1 protein kinases. Mol Cell Biol, 1999, 19(6): 4262-9
- [81] Maki K, Inoue T, Onaka A, et al. Abundance of prereplicative complexes (Pre-RCs) facilitates recombinational repair under replication stress in fission yeast. J Biol Chem, 2011, 286(48): 41701-10
- [82] Li P, Goto H, Kasahara K, et al. P90 RSK arranges Chk1 in the nucleus for monitoring of genomic integrity during cell proliferation. Mol Biol Cell, 2012, 23(8): 1582-92
- [83] Carrassa L, Damia G. Unleashing Chk1 in cancer therapy. Cell Cycle, 2011, 10(13): 2121-8
- [84] Antoni L, Sodha N, Collins I, et al. CHK2 kinase: cancer susceptibility and cancer therapy - two sides of the same

coin? Nat Rev Cancer, 2007, 7(12): 925-36

- [85] Xu YJ, Kelly TJ. Autoinhibition and autoactivation of the DNA replication checkpoint kinase Cds1. J Biol Chem, 2009, 284(23): 16016-27
- [86] Sebastian S, Azzariti A, Silvestris N, et al. p53 as the main traffic controller of the cell signaling network. Front Biosci: Landmark Ed, 2010, 15: 1172-90
- [87] Lopez-Mosqueda J, Maas NL, Jonsson ZO, et al. Damage-induced phosphorylation of Sld3 is important to block late origin firing. Nature, 2010, 467(7314): 479-83
- [88] Zegerman P, Diffley JF. Checkpoint-dependent inhibition of DNA replication initiation by Sld3 and Dbf4 phosphorylation. Nature, 2010, 467(7314): 474-8
- [89] Morin I, Ngo HP, Greenall A, et al. Checkpoint-dependent phosphorylation of Exo1 modulates the DNA damage response. EMBO J, 2008, 27(18): 2400-10
- [90] Segurado M, Diffley JF. Separate roles for the DNA damage checkpoint protein kinases in stabilizing DNA replication forks. Genes Dev, 2008, 22(13): 1816-27
- [91] Ilves I, Tamberg N, Botchan MR. Checkpoint kinase 2 (Chk2) inhibits the activity of the Cdc45/MCM2-7/GINS (CMG) replicative helicase complex. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(33): 13163-70
- [92] Sorensen, CS, Syljuåsen RG, Lukas J, et al. ATR, Claspin and the Rad9-Rad1-Hus1 complex regulate Chk1 and Cdc25A in the absence of DNA damage. Cell Cycle, 2004, 3(7): 941-5
- [93] Shechter D. Costanzo V, Gautier J. ATR and ATM regulate the timing of DNA replication origin firing. Nat Cell Biol, 2004, 6(7): 648-55
- [94] Santocanale C, Diffley JF. A Mec1- and Rad53-dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication. Nature, 1998, 395(6702): 615-8
- [95] O'Driscoll M. Mouse models for ATR deficiency. DNA Repair: Amst, 2009, 8(11): 1333-7
- [96] Zhao X, Muller EG, Rothstein R. A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. Mol Cell, 1998, 2(3): 329-40
- [97] Tsang E, Carr AM. Replication fork arrest, recombination and the maintenance of ribosomal DNA stability. DNA Repair: Amst, 2008, 7(10): 1613-23
- [98] Cha RS, Kleckner N. ATR homolog Mec1 promotes fork progression, thus averting breaks in replication slow zones. Science, 2002, 297(5581): 602-6
- [99] Tercero JA, Diffley JF. Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/ Rad53 checkpoint. Nature, 2001, 412(6846): 553-7
- [100] Lopes M, Cotta-Ramusino C, Pellicioli A, et al. The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. Nature, 2001, 412(6846): 557-61
- [101] Bryant HE, Petermann E, Schultz N, et al. PARP is activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and recombination. EMBO J, 2009, 28(17): 2601-15
- [102] Shechter D, Gautier J. MCM proteins and checkpoint kinases get together at the fork. Proc Natl Acad Sci USA,

2004, 101(30): 10845-6

- [103] Cobb JA, Bjergbaek L, Shimada K, et al. DNA polymerase stabilization at stalled replication forks requires Mec1 and the RecQ helicase Sgs1. EMBO J, 2003, 22(16): 4325-36
- [104] Trenz K, Smith E, Smith S, et al. ATM and ATR promote Mre11 dependent restart of collapsed replication forks and prevent accumulation of DNA breaks. EMBO J, 2006, 25(8): 1764-74
- [105] Lavin MF, Khanna KK. ATM: the protein encoded by the gene mutated in the radiosensitive syndrome ataxiatelangiectasia. Int J Radiat Biol, 1999, 75(10): 1201-14
- [106] Lavin MF. ATM: the product of the gene mutated in ataxia-telangiectasia. Int J Biochem Cell Biol, 1999, 31(7): 735-40
- [107] O'Driscoll M, Ruiz-Perez VL, Woods CG, et al. A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. Nat Genet, 2003, 33(4): 497-501
- [108] Goto H, Izawa I, Li P, et al. Novel regulation of checkpoint kinase 1: is checkpoint kinase 1 a good candidate for

anti-cancer therapy? Cancer Sci, 2012, 103(7): 1195-200

- [109] Zhang Y, Hunter T. Roles of Chk1 in cell biology and cancer therapy. Int J Cancer, 2014, 134(5): 1013-23
- [110] Liang Y, Lin SY, Brunicardi FC, et al. DNA damage response pathways in tumor suppression and cancer treatment. World J Surg, 2009, 33(4): 661-6
- [111] Bhaskara S, Jacques V, Rusche JR, et al. Histone deacetylases 1 and 2 maintain S-phase chromatin and DNA replication fork progression. Epigenetics Chromatin, 2013, 6(1): 27
- [112] Trujillo KM, Osley MA. A role for H2B ubiquitylation in DNA replication. Mol Cell, 2012, 48(5): 734-46
- [113] O'Neil NJ, van Pel DM, Hieter P. Synthetic lethality and cancer: cohesin and PARP at the replication fork. Trends Genet, 2013, 29(5): 290-7
- [114] Bustard DE, Menolfi D, Jeppsson K, et al. During replication stress, non-SMC element 5 (NSE5) is required for Smc5/6 protein complex functionality at stalled forks. J Biol Chem, 2012, 287(14): 11374-83