

综述

丝裂原活化蛋白激酶对卵母细胞减数分裂成熟和排卵的调控作用及机制

陈露, 江俊超, 戴兴兴, 范衡宇*

浙江大学生命科学研究院, 杭州 310058

摘要: 丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路是一条从酵母到人都高度保守的信号转导途径, 广泛地存在于各种真核细胞中。近30多年来的研究表明, 在几乎所有物种的雌性生殖细胞发育和减数分裂成熟过程中, 该信号通路都发挥着至关重要的作用。特别是在包括人、小鼠和家畜的哺乳动物中, MAPK信号通路在卵母细胞恢复减数第一次分裂过程中被激活, 调控纺锤体组装和细胞周期进程, 并在颗粒细胞中介导促性腺激素的生理作用, 促进卵丘扩展、排卵和黄体形成。虽然MAPK信号通路在雌性生殖过程中发挥着如此广泛的生理功能, 并且这些功能在进化过程中高度保守, 但是对于其作用机制, 特别是其直接作用靶分子, 在很长一段时间没有被充分研究清楚。近些年, 基于一些新的基因编辑小鼠模型和理论研究成果, 以及各种组学技术的广泛应用, 人们进一步揭示了MAPK在减数分裂恢复过程中直接磷酸化激活RNA结合蛋白——胞质聚腺苷酸化原件结合蛋白1 (cytoplasmic polyadenylation element-binding protein-1, CPEB1), 促进母源mRNA的poly(A)尾延伸, 介导蛋白翻译激活。这些研究结果不但构成了目前本领域哺乳动物卵母细胞成熟和排卵机制的基本理论, 也对本领域其他相关研究提供了可借鉴的研究思路。结合本研究组和其他科学家近年来的系统研究工作, 我们对MAPK与卵母细胞成熟和排卵的研究进行了历史回顾, 介绍了当前研究进展, 提出了新近出现但尚未解决的科学问题, 包括MAPK在颗粒细胞中对mRNA翻译和降解的调控, 以及对翻译起始复合体、mRNA加尾酶的直接磷酸化激活等。

关键词: 丝裂原活化蛋白激酶信号通路; 卵母细胞; 减数分裂成熟; 排卵; 促性腺激素

中图分类号: Q955; Q492; Q492.5

Function and molecular mechanism of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in regulating oocyte meiotic maturation and ovulation

CHEN Lu, JIANG Jun-Chao, DAI Xing-Xing, FAN Heng-Yu*

Life Sciences Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

Abstract: The mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway is a highly conserved signal transduction pathway from yeast to human species, and is widely distributed in various eukaryotic cells. In almost all of the species studied over the past three decades, this signaling pathway plays a crucial role in the development of female germ cells and meiotic maturation. Especially in a variety of mammalian species including primates, rodents, and domestic animals, the MAPK signaling pathway is activated during the resumption of first oocyte meiosis and plays an indispensable role in meiotic spindle assembly and cell cycle progression. In granulosa cells of fully grown ovarian follicles, the MAPK pathway also mediates the physiological action of gonadotropins, including cumulus expansion, ovulation, and corpus luteum formation. Although the MAPK signaling pathway plays a wide range of physiological functions during the female reproduction process, and these functions are highly conserved in evolution, their underlying mechanisms,

Received 2019-06-25 Accepted 2019-09-22

Research from the corresponding author's laboratory was supported by grants from the National Key Research and Development Program of China (No. 2017YFC1001500, 2016YFC1000600) and the National Natural Science Foundation of China (No. 31890781).

*Corresponding author. Tel: +86-571-88981370; E-mail: hyfan@zju.edu.cn

especially their direct and physiological target molecules, have not been sufficiently studied for a long time. In recent years, based on some new gene-editing mouse models and theoretical findings, as well as the wide application of various omics techniques, it has been further revealed that MAPK directly phosphorylates and activates the RNA binding protein cytoplasmic polyadenylation element-binding protein-1 (CPEB1), promoting poly(A) tail extension of maternal mRNA to regulate protein translation during meiotic recovery. These findings not only constitute the current basic mechanism of mammalian oocyte maturation and ovulation, but also provide useful research ideas for other related research in this field. In this review, we summarize the research findings in our laboratory and from other groups regarding the role of MAPK cascade in regulating oocyte maturation and ovulation. We also discuss the latest research progress on MAPK regulation of mRNA translation and degradation by directly activating the translation initiation complex and mRNA poly(A) polymerase by phosphorylation in the granulosa cells.

Key words: mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway; oocyte; meiotic maturation; ovulation; gonadotropin

1 丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路

丝裂原 (mitogen) 亦称有丝分裂原, 是一类可以诱发免疫反应的生物活性分子, 如植物凝集素、细菌脂多糖等, 可通过与淋巴细胞表面相应受体结合, 刺激静止淋巴细胞转化为淋巴母细胞并进行有丝分裂。培养的细胞在受到丝裂原刺激时, MAPK 被激活。该信号通路由一组级联活化的蛋白激酶构成, 包括 MAPK 激酶激酶 (MAP kinase kinase kinase,

MAPKKK)、MAPK 激酶 (MAP kinase kinase, MAPKK) 和 MAPK。

在细胞中, 许多参与生长分化的受体感应到胞外分子刺激后均可激活 MAPK 信号通路, 例如受体酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinase, RTK), 胞外信号分子激活 RTK, RTK 激活 GTP 结合蛋白 RAS, RAS 进而逐级磷酸化激活 MAPKKK、MAPKK、MAPK, 从而激活 MAPK 信号通路 (图 1)。其中 MAPKKK 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 最早被鉴定的 MAPKKK 是 RAF-1, RAF-1 在大多数体

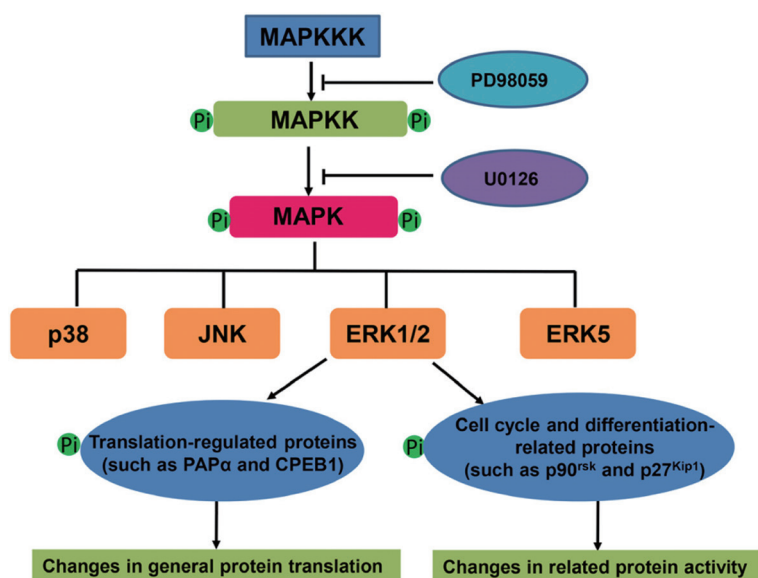


图 1. MAPK级联通路

Fig. 1. MAPK cascade pathway. Through MAPK signaling pathway, the signal from extracellular molecules will be amplified, which enables the cell to respond quickly and sensitively. This pathway is beneficial to orderly life activity. Among them, MAPKKK-mediated phosphorylation of MAPKK can be specifically inhibited by PD98059, and U0126 can inhibit the MAPKK-mediated phosphorylation of MAPK. The MAPK family contains four subfamilies: ERK1/2, p38MAPK, JNK, ERK5. Among them, ERK1/2 regulates the most extensive physiological processes. On the one hand, it regulates overall protein translation levels by phosphorylating poly(A) polymerase α (PAP α), cytoplasmic polyadenylation element-binding protein-1 (CPEB1) and other translational regulatory proteins. On the other hand, it can also phosphorylate some proteins related to cell cycle and cell differentiation, leading to the changes of activity of these proteins. By this manner, it can regulate the corresponding physiological processes.

细胞中是 MAPKK 的直接激活因子,但在卵母细胞中激活 MAPKK 的不是 RAF-1,而是 MOS^[1,2]。MOS 由原癌基因 *c-Mos* 编码,*c-Mos* 基因在哺乳动物生殖细胞中特异性表达,在调控哺乳动物生殖细胞减数分裂进程中发挥至关重要的作用。*c-Mos* 编码的 MOS 蛋白作为 MAPK 信号通路的上游调控激酶,其通过 MAPK 级联通路调节细胞稳态、细胞存活或凋亡^[3]。MAPKK 是一种双特异性蛋白激酶,最常见的 MAPKK 包括 MEK1 和 MEK2,以 MAPK 为唯一底物,催化其苏氨酸 (Thr) 和酪氨酸 (Tyr) 残基的磷酸化,这两个位点的磷酸化修饰是独立发生的,并不相互依赖^[1]。通过双重磷酸化激活模式,可提高信号转导的精确性,确保 MAPK 的正确激活。活化的 MAPK 可进入细胞核内,调节其下游底物包括多种细胞周期和分化相关蛋白以及转录因子的磷酸化,从而影响这些底物的活性^[4]。

MAPK 也是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,其底物磷酸化位点均是 P/L-X-T/S-P。MAPK 可分为 4 个亚族,ERK1/2、p38MAPK、JNK 和 ERK5,其中 ERK1/2 最早被发现且被研究地最广泛(图 1)。在哺乳动物中发现的第一个 MAPK 是 ERK1 (MAPK3),其同源蛋白 ERK2 (MAPK1) 与 ERK1 一起发挥功能,通常统称为 ERK1/2 (MAPK3/MAPK1),ERK1/2 调控底物蛋白的磷酸化,从而调节细胞生长和分化等多种生命活动。PD98059 和 U0126 均为 MAPK 信号通路的抑制剂,但二者的作用机理却不相同,PD98059 抑制的是上游激酶对 MEK 的激活,因此对细胞内已经激活的 MEK 没有抑制作用;而 U0126 抑制的是 MEK 对 ERK 的磷酸化,因此能够比 PD98059 更迅速有效地抑制细胞内所有的 MEK 活性^[5]。JNK 和 p38MAPK 信号通路通常由紫外线、渗透压变化、细胞因子和生理应激等信号激活,又称 MAPK 应激信号通路^[6]。而目前关于 ERK5 的研究还比较少,其主要在一些炎症介导的免疫反应中发挥功能^[7]。

作为一条在细胞中重要的信号通路,MAPK 在多种生命活动中均起着重要作用。在卵母细胞成熟过程中,MAPK 可通过磷酸化核糖体 S6 蛋白激酶 p90RSK 使其激活,活化的 p90RSK 可与 MYT1 结合,使其 C 端磷酸化失活,从而解除对细胞周期蛋白依赖蛋白激酶 1 (cyclin-dependent kinase-1, CDK1) 的 Thr14 和 Tyr15 抑制性磷酸化,使得成熟促进因子 (maturation promoting factor, MPF) 激活,卵母细胞

能够恢复减数分裂,完成 G2/M 期转化^[8,9]。MAPK 对于蛋白翻译调控也起着重要作用,MAPK 可使胞质聚腺苷酸化原件 (cytoplasmic polyadenylation element, CPE) 结合蛋白 1 (CPE-binding protein-1, CPEB1) 磷酸化,从而使得 CPEB1 结合 3' 非编码区 (3'-UTR) 上含有 CPE 的 mRNA,进而促进整体蛋白翻译水平的升高^[10,11]。在细胞增殖过程中,热稳定蛋白 p27^{KIP1} 可与 Cyclin E/CDK2 结合形成复合体,抑制其活性,阻碍 G1/S 的转化。MAPK 可磷酸化 p27^{KIP1},使其发生泛素化降解,解除其对 Cyclin E/CDK2 的抑制,进而调控细胞从 G1 期到 S 期的转化,促进细胞增殖^[6,12]。另外在细胞凋亡过程中,MAPK 可促进 *c-myc*、*p53* 等抑癌基因的表达,使得癌细胞发生凋亡而被及时清除。综上所述,MAPK 信号通路通过级联放大效应,快速将胞外信号传输到胞内,使得细胞能够及时做出应对,维持生命活动的正常进行。虽然目前关于该通路的研究已经较多,但一些关键的作用机制仍然有待深入研究。鉴于该信号通路的重要作用,相关新机制、新功能的研究成果必将促进对细胞周期调控、细胞增殖、凋亡以及动物生殖等生命过程的认识。

2 卵母细胞中 MAPK 级联通路与减数分裂细胞周期

2.1 卵母细胞减数分裂细胞周期

在胚胎发育早期,原始生殖细胞通过有丝分裂增殖到一定数目后停止增殖,在视黄酸的作用下进入减数第一次分裂前期成为初级卵母细胞,随后经细线期、偶线期、粗线期发育到双线期,该时期染色质处于高度去凝集状态,外包重新形成的核膜^[13],此时期的卵母细胞称为生发泡 (germinal vesicle, GV) 期卵母细胞^[14]。性成熟后的每个性周期中,在黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 的刺激下卵母细胞恢复减数分裂,生发泡破裂 (germinal vesicle breakdown, GVBD)、染色质凝集、纺锤体组装、排出第一极体 (polar body 1, PB1),发育到减数第二次分裂中期 (MII),再次发生阻滞^[15]。受精或孤雌激活以后,卵母细胞恢复减数第二次分裂,排出第二极体 (polar body 2, PB2) 完成减数分裂整个过程^[16]。

卵母细胞减数分裂成熟是一个由复杂信号通路诱导产生的细胞周期转换的过程。MPF 是减数分裂细胞周期进程的主要推动者^[17]。大量研究表明 MAPK 级联通路通过与 MPF 协同作用,并通过正

反馈机制相互激活,共同调控减数分裂细胞周期转换^[18]。

2.2.1 MAPK在减数分裂起始阶段并非GVBD所必需

GVBD是启动减数分裂恢复的重要标志,MPF激活几乎与GVBD同时发生,并且对减数分裂启动发挥至关重要的作用。在小鼠^[19]、大鼠^[20]、猪和山羊^[21]卵母细胞中,MAPK激活发生在MPF激活和GVBD之后2h左右^[22],并且*c-Mos*基因敲除(*Mos*^{-/-})小鼠卵母细胞体外培养时,尽管纺锤体和染色体排列出现异常,但仍能发生GVBD,并且延迟排出PB1^[23]。此外,在各种动物卵母细胞成熟过程中MAPK表达量几乎一致,但其活性逐渐增强。MAPK在G2/M期转化过程中被激活,直至MI期达到活性高峰,并维持活性高峰直到受精后原核形成之前。当用蛋白质合成抑制剂放线菌酮和嘌呤霉素处理小鼠和大鼠卵母细胞时,显著抑制了MAPK的激活,但并不影响卵母细胞GVBD^[20]。在爪蟾卵母细胞中,也发现MAPK的激活发生在MPF激活和GVBD之后。以上这些结果表明MAPK活性不是MPF激活和GVBD所必需的,即在脊椎动物中,MAPK不参与减数分裂启动。

MAPK包含4个亚族,在哺乳动物中,ERK1/2是MAPK信号通路的关键蛋白激酶。研究表明卵母细胞中ERK1/2的活性对于其在体外情况下自发恢复减数分裂是不必要的^[24,25],但卵丘细胞中ERK1/2的活性对于促性腺激素诱导的卵母细胞减数分裂恢复是必需的。

2.2.2 MAPK在卵母细胞MII期阻滞的维持中具有关键作用

绝大多数哺乳动物的卵母细胞发育至MII时再次阻滞,只有受精或其他因素诱发孤雌激活后,卵母细胞才能突破MII期阻滞并继续发育,否则将维持在MII期直到退化。那么是什么机制使得卵母细胞阻滞在MII期呢?

先前的研究证明,卵母细胞内MPF和MAPK两种主要激酶维持高活性导致了MII期阻滞,在爪蟾和哺乳动物卵母细胞中,ERK1/2的活性对于调节MPF在减数分裂间期重新激活至关重要^[26]。MPF的激活需要cyclin B的磷酸化,而在细胞周期进程中,cyclin B会被周期性地合成和降解,其含量的变化直接影响MPF的活性^[27]。MPF在MII期时处于活性高峰,一直被认为对维持MII期阻滞具有重要作用^[18]。在青蛙、海鞘和哺乳动物卵母细胞

中,后期促进复合体(anaphase promoting complex, APC)激活后,诱导cyclin B的泛素化降解从而导致MPF活性降低,内源性减数分裂抑制因子2(endogenous meiotic inhibitor 2, EMI2)作为APC的抑制剂,在维持MII期阻滞中发挥作用,并且MOS诱导的MAPK激活可以使得EMI2更加稳定^[3,28]。此外,MII期阻滞的维持依赖于细胞静止因子(cytostatic factor, CSF)的作用,在MII期卵母细胞中能够检测到CSF的活性,受精后CSF活性迅速下降^[29]。CSF抑制APC介导的cyclin B降解,使MPF保持高活性^[30](图2)。

MOS/MEK/MAPK通路对于CSF的功能维持至关重要,*c-Mos*基因敲除小鼠卵母细胞体外培养至MII期或体内正常排卵后均不发生MII期阻滞,而是自发性孤雌激活,孤雌激活后MPF活性迅速下降,cyclin B被降解^[2,31,32]。但是ERK1/2作为卵母细胞中MAPK级联通路的重要蛋白激酶,是否也在MII期阻滞中发挥重要作用呢?研究表明,在原始卵泡中敲除ERK1/2后可以导致排卵后自发排出PB2,卵母细胞阻滞在了另一个中期——减数第三次分裂中期(MIII),MIII期指排卵后部分未受精的MII期卵母细胞会自发模拟受精过程,胞内Ca²⁺浓度增加,排出PB2再次发生阻滞的特殊时期,此过程中有新的畸形纺锤体形成,染色单体散乱分布在赤道板上,卵母细胞不能进入间期,也不能形成原核,这一时期称为MIII^[33,34]。以上这些证据表明ERK1/2在MII期阻滞维持中发挥重要作用^[35]。此外,在老龄化卵子中,由于胞质老化和细胞器退化使得MPF活性和MOS合成均明显下降,最终导致MAPK失活,从而引起卵子自发性孤雌激活^[36,37]。当向2细胞胚胎卵裂球内注射*Mos* mRNA,卵裂球会发生阻滞而不能继续分裂,向卵裂球内注射活性MAPK也能引起卵裂球停止分裂。在猪卵母细胞中,当用MEK抑制剂U0126处理后,MAPK及其下游分子p90^{RSK}都失活,进而诱导猪卵母细胞突破MII期阻滞^[38]。上述研究结果表明MOS/MEK/MAPK/p90^{RSK}级联通路对于卵母细胞MII期阻滞至关重要。然而,也有研究显示,小鼠在受精或孤雌激活4h后,大部分卵子已经排出PB2,但是MAPK活性与受精前水平一致^[39]。此外,MAPK活性在MI期已达到最高峰,且MAPK活性在MI-MII过渡期间没有明显变化,但是卵母细胞并没有阻滞在MI期^[40]。另外也有研究表明,在MII期阻滞的小鼠卵母细胞中

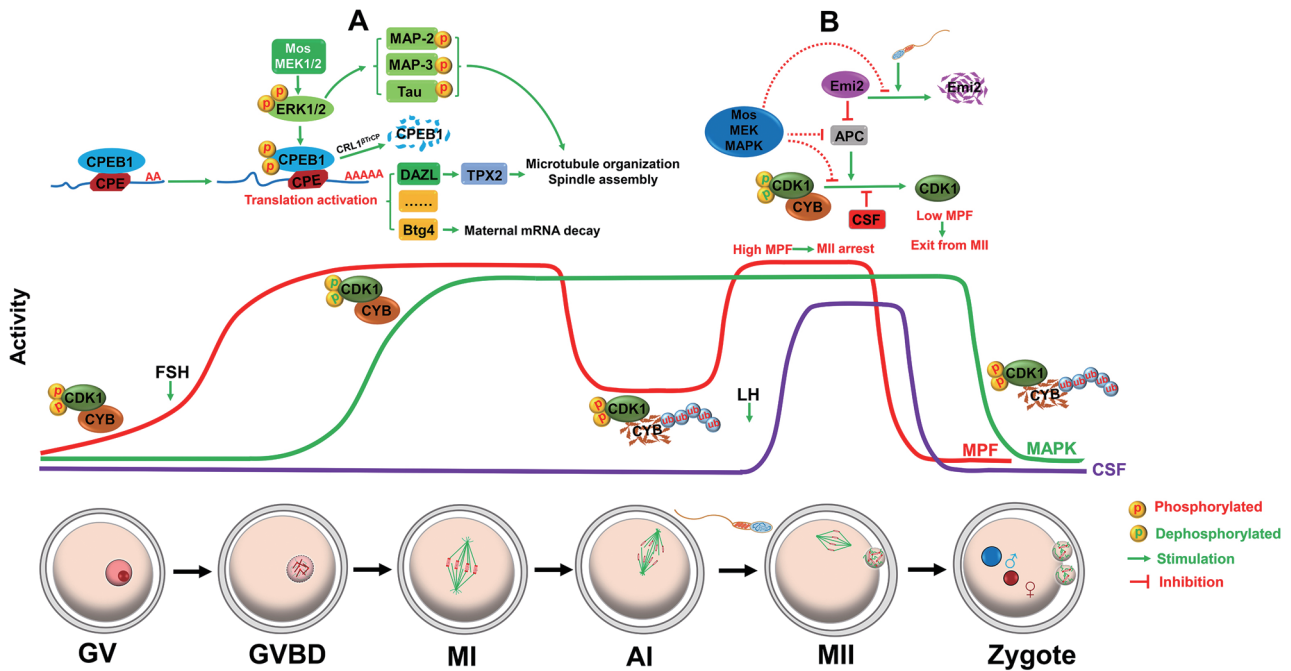


图 2. 减数分裂细胞周期中MAPK和MPF活性变化及MAPK的可能作用

Fig. 2. Schematic representation of the changes in MAPK and MPF activity and the possible role of MAPK during the meiotic cell cycle. *A*: ERK1/2 regulates spindle assembly and triggers maternal mRNA translational activation and degradation. ERK1/2 is activated by upstream kinases and triggers cytoplasmic polyadenylation element (CPE)-binding protein-1 (CPEB1) phosphorylation and CRL1^{BTrCP} dependent degradation. CPEB1 phosphorylation and degradation stimulate polyadenylation and translational activation of multiple CPE-containing maternal mRNAs, including *Dasl* and *Btg4*. The accumulated DAZL proteins lead to further translational activation of maternal mRNAs such as *Btg4* and *Tpx2*, BTG4 targets polyadenylated maternal mRNAs to degradation, and TPX2 induces microtubule nucleation near chromosomes and facilitates spindle pole organization. Additionally, MAPK regulates microtubule reorganization by phosphorylating microtubule-binding proteins MAP-2, MAP-3, Tau, and other target molecules, thereby promoting spindle assembly. *B*: MAPK cascade maintains metaphase II (MII) arrest. MII arrest is dependent on the cytosolic factor (CSF). CSF prevents anaphase promoting complex (APC) dependent destruction of cyclin B, and thus maintains the high MPF activity. Endogenous meiotic inhibitor 2 (EMI2) acts as an inhibitor of APC and plays a role in the maintenance of MII arrest, and MAPK activity can make EMI2 more stable. GV: germinal vesicle; GVBD: germinal vesicle breakdown; MI: metaphase I; AI: anaphase I; MII: metaphase II; CYB: Cyclin B.

敲除 MAPK 下游蛋白激酶 p90^{RSK}, 并不能使卵母细胞发生孤雌激活^[41]。这些研究都表明 MAPK 只是 CSF 中的一条通路, 而所谓 CSF, 并不是卵母细胞中一个单一分子, 而是由多种机制共同维持的一个抑制 APC 活性的状态。

2.2.3 MAPK在受精后失去活性

哺乳动物卵子受精前阻滞在 MII 期, 精卵融合后启动了一系列生化事件, 使得阻滞在 MII 期的卵子“复苏”, 突破 MII 期阻滞, 恢复减数分裂, 排出 PB2, 完成减数分裂过程。在受精过程中, 多种级联通路的活化或失活协调作用, 精密调节着受精过程中的细胞周期事件。只有当 MPF 和 MAPK 的活性迅速降低直至失活后, 才能确保受精卵进入有

丝分裂间期^[42]。受精后 MPF 活性迅速降低 (小鼠中 1~2 h), 而 MAPK 活性降低则发生在受精后原核形成稍前, 并且在其后的细胞周期中不再出现, MAPK 的延迟失活对于维持 PB2 排出之前纺锤体的完整性至关重要^[43]。MAPK 级联通路的失活标志着卵子完成减数第二次分裂, 受精卵进入有丝分裂的第一个间期^[44]。

在青蛙和哺乳动物卵母细胞中, MPF 活性的降低主要是由于 cyclin B 的降解所致, 而 cyclin B 的降解由 APC 蛋白酶活性的激活所触发, APC 自身受到 EMI2 的调节, EMI2 作为 APC 的抑制因子和 MII 期稳定因子, 其稳定性受到 MAPK 活性的调节^[3]。EMI2 和 cyclin B 缺失导致的 MPF 活性的降

低对于中期-后期转换、PB2 排出等减数分裂恢复事件至关重要^[28](图2)。

哺乳动物受精时, 卵子突破 MII 期阻滞的触发信号来源于精子进入卵后引起胞质内持续数小时的、反复性的、短暂性的 Ca^{2+} 浓度升高, 这一过程称为 Ca^{2+} 振荡^[45]。 Ca^{2+} 振荡是哺乳动物受精过程中的普遍现象, 在小鼠卵子中, Ca^{2+} 振荡在受精后原核形成时逐渐停止^[46]。受精后 Ca^{2+} 信号刺激 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II (calmodulin-dependent kinase II, CaMK II), 使得 EMI2 磷酸化, 随后 EMI2 发生降解进而使得 MPF 活性下降, 卵母细胞突破 MII 期阻滞^[47], 因此, Ca^{2+} 信号与 MPF 活性的消失密切相关^[28]。然而, MAPK 活性完全消失发生在 MPF 活性消失后数小时, 并且与 Ca^{2+} 信号无关^[44], 由于 MAPK 的激活受到多种上游蛋白激酶的调节, 那么受精后 MAPK 活性的消失与原核形成是否与 MOS、MEK 等上游激酶的缺失或活性降低有关? 2014 年, 研究人员利用新型化学发光报告子系统检测了受精后小鼠卵母细胞中 MAPK 活性的动态变化情况, 揭示了 MAPK 活性的降低始于 Ca^{2+} 振荡; 过表达 MOS 并没有影响到 MAPK 活性的正常降低; 受精不会导致 MOS 降解增加, MOS 降解不会在受精后小鼠卵 MAPK 失活中起直接作用^[39]。有趣的是, MOS 过表达虽然并不会影响哺乳动物中早期胚胎发育有丝分裂细胞周期^[48], 但却能阻碍海鞘类早期胚胎发育有丝分裂细胞周期进程^[49]。因此, 在尾索动物和哺乳动物受精卵中 MAPK 的调节机制可能不同, 这些问题还有待深入研究。

3 卵母细胞中的 ERK1/2 参与减数分裂纺锤体组装

胚胎非整倍性是造成着床失败、自发性流产、死胎或先天性出生缺陷的重要原因^[50]。减数分裂过程中纺锤体组装异常与染色体错误分离密切相关, 这些异常是造成胚胎非整倍性的原因之一。在有丝分裂过程中, 中心体作为主要的微管组织中心 (microtubule organizing centers, MTOCs) 来起始微管的成核及纺锤体的两极化, 与有丝分裂不同的是, 中心体在哺乳动物卵母细胞减数分裂之前就被降解^[51], 因此减数分裂纺锤体组装需要 RanGTP、Augmin、CPC、aMTOC 等替补途径来起始不依赖于中心体的微管成核、纺锤体两极化以及纺锤体极的形成^[52]。

ERK1/2 在调节卵母细胞减数分裂细胞周期过程中发挥关键作用^[4], 并在 GVBD 后参与卵母细胞中微管装配和减数分裂纺锤体组装^[29, 53]。ERK1/2 蛋白定位在减数分裂纺锤体以及两极的 MTOCs 上^[53], MAPK 与 MTOCs 结合产生组装纺锤体所需的微管, 此外, 微管以及微管结合蛋白 (MAP-2、MAP-3、Tau)、微管相关蛋白 MISS 和 DOC1R 均是 MAPK 的生理靶分子, MAPK 通过磷酸化这些靶分子而调节微管重组, GVBD 后微管在逐步致密化的染色体附近聚集重组, 最终形成纺锤体^[54](图2)。正常情况下, 在小鼠卵母细胞成熟过程中, 纺锤体在细胞中央形成后会向皮质迁移, 并且纺锤体在后期不再伸长, 但在 *Mos* 敲除的卵母细胞中则不同: 尽管 *Mos* 敲除能发生 GVBD 和排出 PB1, 但纺锤体结构明显异常, 纺锤体在中部形成后不能向皮质区域迁移, 后期纺锤体的过度伸长使得卵裂轴发生改变, 因此排出一个异常大的 PB1。进一步研究发现纺锤体无法向皮质区域迁移的原因是 GV 期形成的微管束的长期存在, 正常卵母细胞中星状微管束存在于减数分裂前期, 直到纺锤体开始形成时消失, 而 *Mos* 敲除小鼠卵母细胞中星状微管束在纺锤体形成后没有被正常清除, 阻挡了纺锤体向皮质区域迁移^[55]。在 MII 期猪卵母细胞中, 当用促进微管组装的药物紫杉醇 (Taxol) 处理后可以诱导多个 MTOCs 形成, 且能观察到 MAPK 聚集在了这些新形成的 MTOCs 上^[56]。猪卵母细胞中, MAPK 主要位于中期纺锤体的两极, 在分裂末期迁移到纺锤体中部, 当排出极体时位于细胞分裂环上, 用 U0126 处理抑制 MAPK 活性, 使得染色体分离、PB1 排出以及 MII 期纺锤体形成受到抑制^[57]。另外, 当 cyclin B 达到一定水平后, 激活 MPF 的同时也激活 *c-Mos* 原癌基因产物 p39^{mos} , p39^{mos} 控制 MTOCs 的变化, 影响纺锤体形成, 即使抑制了 MPF 的活性, MAPK 也可以诱导纺锤体形成和染色质凝集^[29, 53]。以上这些结果以及其他研究证明了 MAPK 对于调控微管装配、纺锤体组装、染色质行为至关重要^[58]。

先前关于 ERK1/2 在哺乳动物卵母细胞体内的功能研究大多通过分析 *Mos* 敲除小鼠的表型来间接获得。然而, 单纯通过分析 *Mos* 敲除小鼠卵母细胞的表型并不能解释 ERK1/2 在卵母细胞生长发育以及成熟中的所有功能, *Mos* mRNA 在完全生长期 GV 期卵母细胞中累积, GVBD 后才翻译成蛋白, 因此, 在 MOS 还没翻译出来之前 ERK1/2 的激活

是否还受到其他上游信号的调节？比如膜受体和 RAFs；另外，在调控卵母细胞减数分裂过程中 MOS 是否还有 ERK1/2 之外的其他未知下游靶分子？这些未知靶分子的失活是否可能导致了 *Mos* 敲除的部分表型？

基于这些问题，研究者利用 *Gdf9-Cre* 制作了卵母细胞特异性 ERK1 和 ERK2 敲除小鼠，来研究体内情况下 ERK1/2 在卵母细胞中的直接功能。表型分析发现卵母细胞中 ERK1/2 活性对于原始卵泡维持、激活以及卵泡生长是非必需的；ERK1/2 敲除对卵母细胞 GVBD 没有影响，但在后期 (AI) 时同源染色体迁移到纺锤体极不同步，导致 PB1 排出延迟；ERK1/2 敲除卵母细胞不能维持 MII 期阻滞，MII 期纺锤体出现异常，排卵后自发地排出 PB2，并且绝大部分阻滞在 MIII 期，排出的 PB1 持续存在，没有发生退化；ERK1/2 敲除也阻碍了受精后雄原核形成，造成雌性不育^[35]。有趣的是，这与 *Mos* 敲除的表型不一致，原因可能有以下几个方面：首先，MOS 可能激活了 ERK1/2 以外的其他下游靶分子，比如 SAPKs、p38MAPKs；其次，在 *Mos*^{-/-} 卵母细胞中少部分 ERK1/2 可能也会被其他 MAPK-KKs 激活，因此 ERK1/2 敲除的卵母细胞更适合研究 ERK1/2 在卵母细胞中的直接功能。

诸多研究均表明 ERK1/2 级联在卵母细胞减数分裂进程中发挥重要作用，但是哺乳动物卵母细胞中 ERK1/2 的磷酸化底物还知之甚少。在卵母细胞中抑制 ERK1/2 或者敲除 ERK1/2 均严重影响了微管装配和减数分裂纺锤体组装^[5, 35]，但 ERK1/2 并不是有丝分裂过程中所必需的核心蛋白激酶。ERK1/2 究竟是通过何种底物来调控这些进程的？2017 年，本研究组证明了 ERK1/2 能够直接磷酸化激活细胞质中的 RNA 结合蛋白 CPEB1，激活后的 CPEB1 通过结合到 mRNA 3'-UTR 的 CPE 位点上，促进了编码纺锤体组装的 *Dazl*、*Tpx2* (targeting protein for *Xenopus* kinesin-like protein 2) 等基因的 mRNA 3'-poly(A) 尾的延长并启动翻译，DAZL 蛋白的累积又能进一步促进 TPX2 等母源 mRNA 的翻译激活^[11]。TPX2 定位于纺锤体微管并可以激活 Aurora A，Aurora A 是中心体和纺锤体极组装所必需的蛋白激酶。TPX2 蛋白参与微管成核、微管之间的相互作用、微管的稳定以及动力蛋白的活动^[59]。此外，TPX2 在染色体附近诱导微管成核并促进纺锤体极组装^[60]。目前的研究表明，在 ERK1/2 敲除

卵母细胞中，TPX2 在减数分裂纺锤体上的累积严重受损，因为其蛋白质翻译需要 DAZL，这些新合成的 DAZL、TPX2 蛋白质对于减数分裂纺锤体组装、染色体分离都具有重要的调控作用，该研究证明了 ERK1/2 级联在减数分裂纺锤体组装中具有重要功能^[11] (图 2)。

在减数第二次分裂过程中，纺锤体锚定到卵母细胞皮质区域，并在受精后在排出极体之前旋转到与卵母细胞径向平行的位置，在减数分裂过程中，部分 Arp2/3 复合物会被激活并被招募到卵母细胞皮质肌动蛋白富集的区域，这一区域称为肌动蛋白帽 (actin cap)，纺锤体锚定到皮质区域的过程受到肌动蛋白成核蛋白——Arp2/3 复合体以及其介导产生的肌动蛋白帽的调控。Arp2/3 复合体的激活需要成核促进因子 (nucleation promoting factors, NPFs) 的参与，Arp2/3 复合体及 Wave2、JMY、WHAMM 等 NPFs 对于纺锤体的正确迁移至关重要^[61, 62]。研究表明，Arp2/3 活性受到 MOS-MAPK 通路的调控^[63]，并且 MOS-MAPK 通路通过调控 Wave2 来激活 Arp2/3 复合体，抑制 Arp2/3、Wave2 以及 MOS 活性均导致相似的表型，使得纺锤体从卵母细胞皮质区域脱落^[64, 65]。此外，阻断 MAPK 功能导致外周染色体上的肌动蛋白帽消失^[66]，DNA 磁珠不能诱导 *Mos*^{-/-} 卵母细胞中的肌动蛋白帽产生^[67]。因此，MOS-MAPK 通路促进 Arp2/3 介导的肌动蛋白帽的形成，以维持纺锤体的迁移和正确定位。

4 卵母细胞中的 ERK1/2 把母源性 mRNA 翻译激活与减数分裂耦联起来

在脊椎动物中，发育完全的卵母细胞阻滞在减数第一次分裂的双线期，此时卵母细胞停止转录，但是在卵胞质中储存了大量母源性 mRNA^[68]。这些母源 mRNA 处于翻译抑制状态，不与核糖体结合，从而不能被翻译成蛋白质，但却保持着非常强的稳定性。随后的两次减数分裂和受精过程完全受到卵胞质中母源性 mRNA 和蛋白质的调控，特别是依赖于这些母源性 mRNA 的翻译激活。并且，这些母源性 mRNA 在完成蛋白翻译功能之后被迅速降解。但是，卵母细胞中母源性 mRNA 的翻译和降解是如何调控的呢？

最近的研究显示，MAPK 信号级联通路把母源性 mRNA 的翻译和降解与卵母细胞减数分裂进程耦联在一起。CPEB1 是一个可以调控 mRNA 翻译

的重要蛋白,它可以与位于 mRNA 3'-UTR 的 CPE 元件结合促进翻译^[10]。在卵母细胞中,CPEB1 会随着卵母细胞减数分裂的进程发生磷酸化激活,随后发生 CRL1^{βTrCP} 依赖的降解,是一个促进母源性基因翻译激活的关键因子^[11]。ERK1/2 直接磷酸化激活细胞质中的 CPEB1,后者激活以后,发生了部分降解,并通过与 mRNA 3'-UTR 上其他 RNA 结合蛋白的互作,促进 mRNA 3'-poly(A) 尾的延长并启动蛋白翻译。在卵母细胞中过表达磷酸化位点突变或与 E3 连接酶结合位点突变的 CPEB1,会影响纺锤体组装和 mRNA 翻译激活。并且,通过分析卵母细胞特异性 ERK1/2 基因敲除小鼠表型也发现,缺失 ERK1/2 的卵母细胞除了具有严重的纺锤体组装和减数分裂缺陷,受精之后也不能顺利完成母源 mRNA 的降解并无法启动早期胚胎发育进程,从而用体内实验模型进一步验证了上述生化过程的生理意义^[11]。

因此,ERK1/2 级联信号通路在卵母细胞减数分裂过程中调节 CPEB1 磷酸化或降解,进而促进一些母源性 mRNA 的翻译激活,包括 *Dazl*、*Btg4* 和 *Cnot6l* 等,在小鼠卵母细胞成熟和母体-胚胎转换(maternal-zygotic transition, MZT)过程中起着关键作用。DAZL 蛋白的翻译激活进一步促进母源性基因 *Tpx2* 和 *Btg4* 的翻译激活。BTG4 和 CNOT6L 与 CCR4-NOT 复合物中催化亚基 CNOT7 相互作用,开启母源性 mRNA 的降解,促进受精卵基因组的激活,保证卵母细胞正常发育。因此,在卵母细胞中 ERK1/2 通过调节 CPEB1 的磷酸化/降解,级联性地促进母源性 mRNA 翻译激活,使得卵母细胞中母源性 mRNA 翻译激活以及降解与细胞周期耦联在一起,在小鼠卵母细胞成熟和 MZT 过程中起着关键作用^[5,11](图2)。在 ERK1/2 活性缺失的卵母细胞中回补其重要下游分子,如 DAZL、BTG4 和 CCR4-NOT 催化亚基,就能部分逆转 ERK1/2 活性缺失所造成的减数分裂缺陷,进一步证明了上述假说的正确性,并回答了一个长期以来悬而未解的科学问题^[11]。

虽然十几年前人们就发现,ERK1/2 级联信号通路在卵母细胞恢复减数分裂以后被激活,并且在卵母细胞成熟过程中具有重要生理功能,但是一直未能阐明其关键作用机制。而这些研究证明,ERK1/2 除了磷酸化调控个别与纺锤体组装和染色体排列相关的蛋白之外,其更主要的功能是介导卵母细胞成

熟过程中的母源 mRNA 翻译激活过程,其最主要的磷酸化靶分子是 RNA 结合蛋白 CPEB1。ERK1/2 通过这一关键机制诱发一大批母源性蛋白的积累,从而在 MZT 过程中扮演开关分子的角色。

5 颗粒细胞中的 MAPK 信号通路促进卵母细胞成熟

大多数哺乳动物在胎儿时期就开始卵母细胞的减数分裂,在出生时阻滞在第一次减数分裂的双线期,即 GV 期,根据不同物种,卵母细胞在这个时期可以持续几周甚至几十年的时间^[14]。到青春期之后,哺乳动物在 LH 峰的刺激下,有腔卵泡内被阻滞的卵母细胞恢复减数分裂,发育成熟的卵母细胞发生排卵进入输卵管等待受精^[69]。虽然在实验条件下,GV 期阻滞的哺乳动物卵母细胞被从卵泡中释放出来以后,可以自发恢复减数分裂,但在体内条件下,LH 才是真正启动卵母细胞减数分裂恢复的生理性信号^[15]。

卵泡的发育和排卵是由促卵泡激素(follicle-stimulating hormone, FSH)和 LH 两种垂体激素控制的^[70]。FSH 促进卵泡的生长和发育,促进生长卵泡形成有腔卵泡,使一部分颗粒细胞分化形成卵丘细胞。LH 的主要功能是促进卵母细胞恢复减数分裂,促进排卵前卵泡发生排卵,颗粒细胞分化成黄体细胞和产生孕酮^[71]。

在体内,格拉夫卵泡内卵母细胞停滞在减数分裂的双线期,人们通过实验证实是卵泡体细胞中产生的抑制物质阻止卵母细胞发育^[72]。直到最近,人们才发现这个抑制物质是由壁层颗粒细胞(mural granulosa cells, MGCs)中产生的利钠肽 C(natriuretic peptide precursor C, NPPC, 又称 C-type natriuretic peptide, CNP)。NPPC 可以激活位于壁层颗粒细胞和卵丘细胞上的受体——利钠肽受体 2(natriuretic peptide receptor 2, NPR2),激活的 NPR2 可以产生 cGMP^[73,74]。卵丘细胞和颗粒细胞中的 cGMP 通过缝隙连接可以扩散到卵母细胞中,在卵母细胞中抑制磷酸二酯酶 3A(phosphodiesterase 3A, PDE3A)的活性,进而抑制 cAMP 的水解^[75-79],使卵母细胞产生的 cAMP 维持在很高的浓度,激活蛋白激酶 A(protein kinase A, PKA),使 CDK 处于高磷酸化失活状态,卵母细胞阻滞在减数分裂的前期^[77-79](图3)。

LH 可以触发减数分裂成熟,但它的受体在卵母细胞和卵丘细胞中都不表达。相反,它们是在在壁

层颗粒细胞中表达, 那么 LH 是如何促进卵母细胞恢复减数分裂与排卵的呢? 一项关键研究表明, 是颗粒细胞内的 MAPK 信号通路介导了 LH 的主要生理功能, 在排卵、卵泡闭锁和黄体形成中发挥重要作用。颗粒细胞内敲除 ERK1/2 的小鼠, 在 LH 诱导的卵母细胞减数分裂恢复、排卵和黄体化过程中都存在缺陷^[24]。在排卵前卵泡的颗粒细胞内, LH 与其壁层颗粒细胞受体 LHGCR 结合, 产生 cAMP 并激活 PKA, 触发表皮生长因子相关多肽 AREG (amphiregulin), EREG (epiregulin) 和 BTC (β -cellulin) 的释放, 进而与位于壁层颗粒细胞和卵丘细胞上的 EGF 受体结合^[80], 激活 RAS 和 ERK1/2 信号分子。激活的 ERK1/2 会诱导和激活转录因子 CCAAT/增强结合蛋白 α/β (CCAAT/enhancer binding protein α/β , C/EBP α/β)、转录辅因子 CITED4, 以及与卵母细胞成熟、排卵、黄体化所必需的基因, 同时还会抑制

FSH 通路调节的过程, 包括雌激素的合成、颗粒细胞的增殖^[81, 82]。因此在颗粒细胞内 ERK1/2 是发育程序由 FSH 信号通路控制而转换为由 LH 信号通路控制的开关。

LH 所诱发的 ERK1/2 激活, 也分别抑制了颗粒细胞和卵丘细胞中 *Nppc* 和 *Npr2* 基因的表达, 从而削弱了 cGMP 介导的减数分裂抑制信号。另外, 卵丘细胞中受 EGF 家族旁分泌因子激活的 ERK1/2 也会使缝隙连接蛋白 CX37 磷酸化, 直接导致 cAMP 和 cGMP 分子在卵丘细胞和卵母细胞之间的传递减少。在卵母细胞中, cAMP 抑制减数分裂的恢复, 而 cGMP 抑制负责降解 cAMP 的 PDE3A。当卵母细胞中 cAMP 和 cGMP 减少 (通过卵母细胞和卵丘细胞间接触减少而引起的), 就解除了 PKA 对 CDK1 的抑制, CDK1 的激活使卵母细胞突破 GV 期阻滞, 进入分裂期^[25, 83, 84] (图 3)。

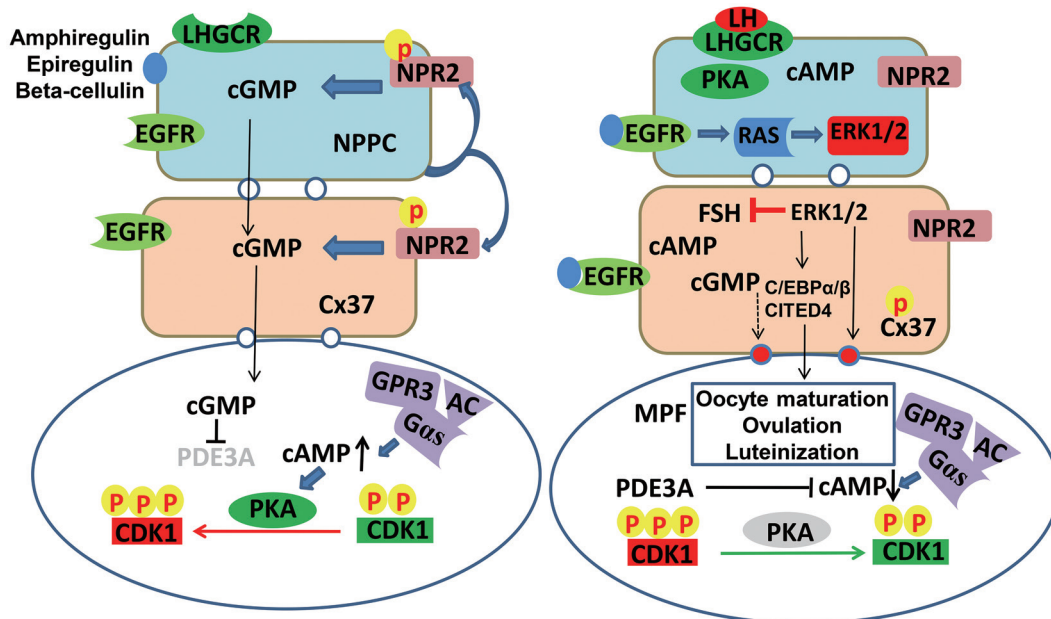


图 3. 颗粒细胞中MAPK信号通路促进卵母细胞减数分裂成熟

Fig. 3. MAPK signaling pathway promotes meiosis maturation of oocytes in granulosa cells. Prior to maturation, natriuretic peptide precursor C (NPPC) secreted by the granulosa cells activates NPR2 receptors, thereby activating cGMP synthesis. cGMP is transferred to the oocyte via gap junctions, where it inhibits phosphodiesterase 3A (PDE3A). This allows the level of cAMP in the oocyte, generated by the activity of GPR3, to remain high. Protein kinase A (PKA) is therefore active and cyclin-dependent kinase-1 (CDK1) is inactive. Upon binding of luteinizing hormone (LH) to its receptor, LHGCR, on the mural granulosa cells, EGFR ligands (amphiregulin, β -cellulin, and epiregulin) are released by the mural granulosa cells and activate EGFR on both mural and cumulus granulosa cells. Then EGFR ligands activate RAS and ERK1/2 signaling molecules. Activated ERK1/2 activates transcription factor CCAAT/enhanced-binding protein- α/β (C/EBP α/β), transcription cofactor CITED4, and genes necessary for oocyte maturation, ovulation, and luteinization, as well as inhibiting processes of the FSH pathway. Activated ERK1/2 phosphorylates gap junction protein Cx37, which directly reduces the flow and transfer of cAMP and cGMP molecules between cumulus cells and oocytes. The net result is a loss of cGMP from the oocyte, thus relieving the inhibition of CDK1 by PKA. Oocyte breaks through the germinal vesicle (GV) stage block and enters the division stage.

6 研究趋势与展望

6.1 MAPK在颗粒细胞中对mRNA翻译和降解的调控

在排卵之前,哺乳动物的卵母细胞在卵巢卵泡内要经历一系列的生长和母源因子积累过程,赋予它可以发育成胚胎的能力。卵母细胞的充分生长和成熟依赖于卵泡内颗粒细胞持续的信号转导,同时卵母细胞发出的信号也会调节颗粒细胞的分化,确保它们为生殖细胞提供一个健康的环境。因此,颗粒细胞正常的生长发育与卵母细胞间的双向信号转导对于产生健康卵子是至关重要的。

卵母细胞的生长伴随着卵泡内颗粒细胞的生长和分化。在颗粒细胞生长和分化过程中,伴随着许多信号通路的激活,同时许多基因存在动态的翻译和降解过程来维持颗粒细胞正常的发育^[85-87]。在腔前卵泡时期,颗粒细胞内 *Amh* 等被翻译出来维持高蛋白水平,抑制 FSH 信号通路诱导的卵泡生长^[88,89]; FSH 信号通路激活之后,它的一些靶基因 *Fshr*、*Cyp19a1* 等会被翻译出来,前期维持腔前卵泡发育的一些基因,如 *Amh*、*Foxo1*、*Inhibins* 等,则表达水平下降,卵母细胞发育到有腔卵泡时期;当卵泡充分生长以后,在排卵前 LH 峰的刺激之下,LH 下游信号通路被激活时,促进排卵和黄体化相关基因的表达,同时 FSH 信号通路所激活的基因表达会下降,卵母细胞恢复减数分裂并发生排卵。那么颗粒细胞中这种动态的基因表达变化,除了发生在基因转录水平以外,FSH 和 LH 是否也通过调控靶基因 mRNA 的翻译和降解,来促进卵泡发育和排卵过程呢?这个问题到目前为止还没有被研究。

ERK1/2 磷酸化激活是在 LH 刺激之下发生的,所以在颗粒细胞中 LH 信号通路中靶基因的翻译可能与卵母细胞中类似,ERK1/2 磷酸化 CPEB1,促进 3'-UTR 上含有 CPE 元件的 mRNA 发生 3'-聚腺苷酸化,进而增强翻译^[11]。除此之外,mRNA 翻译的限速步骤与翻译起始有关,特别是翻译起始阶段 5' 端帽子的识别和核糖体的招募^[90],ERK1/2 在颗粒细胞中也可能促进翻译起始,促进 LH 靶基因的表达。ERK1/2 磷酸化激活之前,FSH 刺激下大量基因的翻译可能与 MAPK 家族中其他成员有关,例如 p38MAPK 激活也可以调节 mRNA 的翻译^[91,92]。

在卵母细胞减数分裂成熟和 MZT 过程中,CCR4-NOT 去腺苷酸化酶复合体对母源 mRNA 的降解有重要催化作用,那么在颗粒细胞中 CCR4-NOT 是否也会促进特定 mRNA 的去腺苷酸化并导

致其被降解,从而介导 FSH 和 LH 引起的生理效应? MAPK 信号通路通过激活与去腺苷酸化复合体中催化亚基结合的识别蛋白 KSRP、HuR、TTP 和 Roquin 等,调节它们与 mRNA 的 3'-UTR 上的 ARE 元件(AU-rich element)、miR (miRNA-binding site)、CDE 元件(constitutive decay element)等的结合,促进 mRNA 的降解^[93]。CCR4-NOT 复合体中 CNOT6/6L 催化亚基在卵母细胞中会与 ZFP36L2 结合,促进减数分裂过程中早期母源性 mRNA 的降解^[11]。*Cnot6/6l* 双基因敲除小鼠可以存活,但是雌鼠卵巢对促性腺激素、特别是 FSH 的反应不好。*Cnot6/6l* 双基因敲除的小鼠与野生型小鼠相比,有更多的腔前卵泡不能继续发育。体外培养颗粒细胞发现 CNOT6/6L 会伴随着 FSH 的加入而表达。所以,CCR4-NOT 复合体中 CNOT6/6L 催化亚基与它的识别蛋白 ZFP36L2 可能在腔前卵泡受 FSH 激素刺激发育到有腔卵泡这个时期发挥重要功能,可能会促进腔前卵泡内高表达基因,如 *Amh*、*Foxo1*、*Inhibins* 等的去腺苷酸化和降解,也可能促进 *Igfbp-2* 等降解,促进颗粒细胞在 FSH 作用下大量增殖和分化(待发表)。CCR4-NOT 复合体也可能在排卵前卵泡促进 FSH 靶基因的降解,可能是 LH 通过 MAPK 信号通路对这个复合体中各个催化亚基和 RNA 结合蛋白促进 mRNA 降解的机制,有待进一步研究证明。

6.2 MAPK在卵母细胞中对mRNA加尾酶和蛋白翻译系统的调控

6.2.1 卵母细胞中MAPK对mRNA加尾酶的调控

在卵母细胞中,ERK1/2 通过磷酸化 CPEB1,使得 CPEB1 结合 3'-UTR 上含有 CPE 的 mRNA,促进相应蛋白的翻译^[11]。但近年来研究表明,ERK1/2 还通过许多其他途径调控蛋白翻译过程。有研究显示,ERK1/2 能够通过磷酸化 mRNA poly(A) 加尾酶 [poly(A) polymerase, PAP],提高其加尾活性,促进其蛋白的翻译激活^[94]。一个基因转录产生的 mRNA 要被翻译成蛋白行使其功能之前,必须在 5' 端加上帽子以及在 3' 端加上 poly(A) 尾巴。在细胞中存在多种 PAP,主要分为两大类,经典 PAP 和非经典 PAP。经典 PAP 有三种: PAP α 、PAP β 和 PAP γ ,主要介导细胞核中 mRNA 的加 poly(A) 尾。PAP α 是最常见的加尾酶,在各种加尾事件中都发挥着重要作用,而 PAP β 主要在雄性精子发育过程中发挥着作用,PAP γ 目前研究较少,只发现其在肿瘤发生过程中具有较高的活性。而非经典的加尾酶则包

括许多种类, 主要调控胞质以及一些特殊环境条件下的 mRNA 加 poly(A) 尾, 如在爪蟾卵母细胞成熟过程中调控胞质加尾的 GLD2、线粒体中的加尾酶 PAPP1^[95]。当细胞核中的基因转录形成 mRNA 前体之后, PAP α 通过切割和多聚腺苷酸化刺激因子 (cleavage and polyadenylation stimulatory factor, CPSF) 复合体结合到 3'-UTR 的多聚腺苷酸化位点 (polyadenylation site, PAS) 上, 调控 mRNA 翻译成蛋白的过程^[96]。在 HeLa 细胞中, ERK 可使 PAP α 发生磷酸化, 而磷酸化位点为第 537 位的丝氨酸残基, 且该位点在人、小鼠、爪蟾中都是保守的。当 PAP α 被磷酸化之后, 其催化活性大大增加, 可促进底物 mRNA 加 poly(A) 尾^[94]。目前尚不清楚, 在生理情况下, 特别是卵母细胞成熟过程中, 是否也同样存在着 ERK1/2 磷酸化激活 PAP α 、进而促进 mRNA 加 poly(A) 和翻译激活的生化过程, 有待进一步研究。

6.2.2 卵母细胞中 MAPK 对翻译起始因子的调控

近年来的研究显示, ERK1/2 对于翻译起始因子的磷酸化也具有调控作用。转录好的 mRNA 在经过 5' 端加帽以及在 3' 端加 poly(A) 尾巴之后, 需要与翻译起始因子结合组装成翻译起始复合体, 才能启动蛋白的翻译。翻译起始因子 eIF4F 主要包括三个因子: eIF4A、eIF4E、eIF4G。其中 eIF4A 为解旋酶, 负责解开 5'-UTR 上的二级结构, 促进翻译起始复合体对起始密码子的识别; eIF4E 则直接结合 5' 端的帽子; eIF4G 是个支架蛋白, 既能结合 eIF4E, 又可以结合 poly(A) 结合蛋白 [poly(A)-binding protein, PABP], 从而将 mRNA 的两端和翻译起始因子连接到一起成闭合的翻译起始复合体^[97]。近年来的研究显示, 在猪卵母细胞 GVBD 之后 eIF4E 会发生磷酸化, 而 ERK1/2 在它的磷酸化中也起着重要作用。当卵母细胞 GVBD 之后, ERK1/2 被激活, 活化的 ERK1/2 可磷酸化其底物——与 MAPK 相互作用的丝氨酸/苏氨酸激酶 (MAPK-interacting serine/threonine kinase, MNK), MNK1 被磷酸化之后与 eIF4G 的结合能力大大增强, 从而能够接近 eIF4E, 使其发生磷酸化^[98], 然而 eIF4E 的磷酸化对于翻译的作用目前仍没有统一的结论。之前有研究表明, eIF4E 被 MNK1 磷酸化之后, 与 eIF4G 和 5' 端帽子的结合会大大增加, 对翻译具有促进作用^[99], 但也有研究表明 eIF4E 磷酸化之后更容易从帽子上解离, 反而减慢了翻译的速率^[100]。因此, 在卵母

细胞成熟过程中 ERK1/2 介导的 eIF4E 磷酸化对蛋白翻译的影响仍需要进一步的深入研究。

总之, 在卵母细胞成熟过程中, MAPK 除了磷酸化 CPEB1 以外, 可能也通过介导 PAP α 和 eIF4E 发生磷酸化, 从多种途径、多个层次对蛋白翻译过程进行调控, 促进卵母细胞发育所需的各种蛋白的及时激活, 有利于减数分裂的顺利进行。但相关研究才刚刚起步, 亟待完善。

参考文献

- 1 Gotoh Y, Nishida E. Activation mechanism and function of the MAP kinase cascade. *Mol Reprod Dev* 1995; 42(4): 486–492.
- 2 Verlhac MH, Kubiak JZ, Weber M, Geraud G, Colledge WH, Evans MJ, Maro B. Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. *Development* 1996; 122(3): 815–822.
- 3 Dupre A, Haccard O, Jessus C. Mos in the oocyte: how to use MAPK independently of growth factors and transcription to control meiotic divisions. *J Signal Transduct* 2011; 2011: 350412.
- 4 Liang CG, Su YQ, Fan HY, Schatten H, Sun QY. Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of mitogen-activated protein kinase. *Mol Endocrinol* 2007; 21(9): 2037–2055.
- 5 Fan HY, Sun QY. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biol Reprod* 2004; 70(3): 535–547.
- 6 Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 2002; 12(1): 9–18.
- 7 Lin EC, Amantea CM, Nomanbhoy TK, Weissig H, Ishiyama J, Hu Y, Sidique S, Li B, Kozarich JW, Rosenblum JS. ERK5 kinase activity is dispensable for cellular immune response and proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113(42): 11865–11870.
- 8 Bhatt RR, Ferrell JE Jr. The protein kinase p90 rsk as an essential mediator of cytotostatic factor activity. *Science* 1999; 286(5443): 1362–1365.
- 9 Frodin M, Gammeltoft S. Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol Cell Endocrinol* 1999; 151(1–2): 65–77.
- 10 Pique M, Lopez JM, Foissac S, Guigo R, Mendez R. A combinatorial code for CPE-mediated translational control. *Cell* 2008; 132(3): 434–448.
- 11 Sha QQ, Dai XX, Dang Y, Tang F, Liu J, Zhang YL, Fan HY.

- A MAPK cascade couples maternal mRNA translation and degradation to meiotic cell cycle progression in mouse oocytes. *Development* 2017; 144(3): 452–463.
- 12 Leone G, DeGregori J, Sears R, Jakoi L, Nevins JR. Myc and Ras collaborate in inducing accumulation of active cyclin E/Cdk2 and E2F. *Nature* 1997; 387(6631): 422–426.
 - 13 Le Bouffant R, Guerin MJ, Duquenne C, Frydman N, Coffigny H, Rouiller-Fabre V, Frydman R, Habert R, Livera G. Meiosis initiation in the human ovary requires intrinsic retinoic acid synthesis. *Hum Reprod* 2010; 25(10): 2579–2590.
 - 14 Sorensen RA, Wassarman PM. Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev Biol* 1976; 50(2): 531–536.
 - 15 Mattioli M, Bacci ML, Galeati G, Seren E. Effects of LH and FSH on the maturation of pig oocytes *in vitro*. *Theriogenology* 1991; 36(1): 95–105.
 - 16 Wang L, Wang ZB, Zhang X, FitzHarris G, Baltz JM, Sun QY, Liu XJ. Brefeldin A disrupts asymmetric spindle positioning in mouse oocytes. *Dev Biol* 2008; 313(1): 155–166.
 - 17 Abrieu A, Doree M, Fisher D. The interplay between cyclin-B-Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes. *J Cell Sci* 2001; 114(Pt 2): 257–267.
 - 18 Kishimoto T. MPF-based meiotic cell cycle control: Half a century of lessons from starfish oocytes. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2018; 94(4): 180–203.
 - 19 Sun QY, Breitbart H, Schatten H. Role of the MAPK cascade in mammalian germ cells. *Reprod Fertil Dev* 1999; 11(7–8): 443–450.
 - 20 Zernicka-Goetz M, Verlhac MH, Geraud G, Kubiak JZ. Protein phosphatases control MAP kinase activation and microtubule organization during rat oocyte maturation. *Eur J Cell Biol* 1997; 72(1): 30–38.
 - 21 Dedieu T, Gall L, Crozet N, Sevellec C, Ruffini S. Mitogen-activated protein kinase activity during goat oocyte maturation and the acquisition of meiotic competence. *Mol Reprod Dev* 1996; 45(3): 351–358.
 - 22 Sun QY, Rubinstein S, Breitbart H. MAP kinase activity is downregulated by phorbol ester during mouse oocyte maturation and egg activation *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 1999; 52(3): 310–318.
 - 23 Araki K, Naito K, Haraguchi S, Suzuki R, Yokoyama M, Inoue M, Aizawa S, Toyoda Y, Sato E. Meiotic abnormalities of c-mos knockout mouse oocytes: activation after first meiosis or entrance into third meiotic metaphase. *Biol Reprod* 1996; 55(6): 1315–1324.
 - 24 Fan HY, Liu Z, Shimada M, Sterneck E, Johnson PF, Hedrick SM, Richards JS. MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. *Science* 2009; 324(5929): 938–941.
 - 25 Su YQ, Wigglesworth K, Pendola FL, O'Brien MJ, Eppig JJ. Mitogen-activated protein kinase activity in cumulus cells is essential for gonadotropin-induced oocyte meiotic resumption and cumulus expansion in the mouse. *Endocrinology* 2002; 143(6): 2221–2232.
 - 26 Cui W, Zhang J, Lian HY, Wang HL, Miao DQ, Zhang CX, Luo MJ, Tan JH. Roles of MAPK and spindle assembly checkpoint in spontaneous activation and MIII arrest of rat oocytes. *PLoS One* 2012; 7(2): e32044.
 - 27 Peter M, Le Peuch C, Labbe JC, Meyer AN, Donoghue DJ, Doree M. Initial activation of cyclin-B1-cdc2 kinase requires phosphorylation of cyclin B1. *EMBO Rep* 2002; 3(6): 551–556.
 - 28 Suzuki T, Suzuki E, Yoshida N, Kubo A, Li H, Okuda E, Amanai M, Perry AC. Mouse Emi2 as a distinctive regulatory hub in second meiotic metaphase. *Development* 2010; 137(19): 3281–3291.
 - 29 Verlhac MH, Kubiak JZ, Clarke HJ, Maro B. Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development* 1994; 120(4): 1017–1025.
 - 30 Kubiak JZ, Weber M, de Pennart H, Winston NJ, Maro B. The metaphase II arrest in mouse oocytes is controlled through microtubule-dependent destruction of cyclin B in the presence of CSF. *EMBO J* 1993; 12(10): 3773–3778.
 - 31 Colledge WH, Carlton MB, Udy GB, Evans MJ. Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature* 1994; 370(6484): 65–68.
 - 32 Wu B, Ignatz G, Currie WB, Yang X. Expression of Mos proto-oncoprotein in bovine oocytes during maturation *in vitro*. *Biol Reprod* 1997; 56(1): 260–265.
 - 33 Kubiak JZ. Mouse oocytes gradually develop the capacity for activation during the metaphase II arrest. *Dev Biol* 1989; 136(2): 537–545.
 - 34 Rawe VY, Olmedo SB, Nodar FN, Doncel GD, Acosta AA, Vitullo AD. Cytoskeletal organization defects and abortive activation in human oocytes after IVF and ICSI failure. *Mol Hum Reprod* 2000; 6(6): 510–516.
 - 35 Zhang YL, Liu XM, Ji SY, Sha QQ, Zhang J, Fan HY. ERK1/2 activities are dispensable for oocyte growth but are required for meiotic maturation and pronuclear formation in mouse. *J Genet Genomics* 2015; 42(9): 477–485.
 - 36 Kikuchi K, Izaiki Y, Noguchi J, Furukawa T, Daen FP, Naito K, Toyoda Y. Decrease of histone H1 kinase activity in relation to parthenogenetic activation of pig follicular oocytes matured and aged *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1995; 105(2): 325–330.
 - 37 Xu Z, Abbott A, Kopf GS, Schultz RM, Ducibella T. Sponta-

- neous activation of ovulated mouse eggs: time-dependent effects on M-phase exit, cortical granule exocytosis, maternal messenger ribonucleic acid recruitment, and inositol 1,4,5-trisphosphate sensitivity. *Biol Reprod* 1997; 57(4): 743–750.
- 38 Tatemoto H, Muto N. Mitogen-activated protein kinase regulates normal transition from metaphase to interphase following parthenogenetic activation in porcine oocytes. *Zygote* 2001; 9(1): 15–23.
- 39 Gonzalez-Garcia JR, Bradley J, Nomikos M, Paul L, Machaty Z, Lai FA, Swann K. The dynamics of MAPK inactivation at fertilization in mouse eggs. *J Cell Sci* 2014; 127(Pt 12): 2749–2760.
- 40 Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2011; 75(1): 50–83.
- 41 Dumont J, Umbhauer M, Rassinier P, Hanauer A, Verlhac MH. p90Rsk is not involved in cyostatic factor arrest in mouse oocytes. *J Cell Biol* 2005; 169(2): 227–231.
- 42 Moos J, Xu Z, Schultz RM, Kopf GS. Regulation of nuclear envelope assembly/disassembly by MAP kinase. *Dev Biol* 1996; 175(2): 358–361.
- 43 Petrunewich MA, Trimarchi JR, Hanlan AK, Hammer MA, Baltz JM. Second meiotic spindle integrity requires MEK/MAP kinase activity in mouse eggs. *J Reprod Dev* 2009; 55(1): 30–38.
- 44 Marangos P, FitzHarris G, Carroll J. Ca^{2+} oscillations at fertilization in mammals are regulated by the formation of pronuclei. *Development* 2003; 130(7): 1461–1472.
- 45 Ducibella T, Fissore R. The roles of Ca^{2+} , downstream protein kinases, and oscillatory signaling in regulating fertilization and the activation of development. *Dev Biol* 2008; 315(2): 257–279.
- 46 Ito M, Shikano T, Kuroda K, Miyazaki S. Relationship between nuclear sequestration of PLCzeta and termination of PLCzeta-induced Ca^{2+} oscillations in mouse eggs. *Cell Calcium* 2008; 44(4): 400–410.
- 47 Madgwick S, Jones KT. How eggs arrest at metaphase II: MPF stabilisation plus APC/C inhibition equals cyostatic factor. *Cell Div* 2007; 2: 4.
- 48 Kashima K, Kano K, Naito K. Mos and the mitogen-activated protein kinase do not show cyostatic factor activity in early mouse embryos. *J Reprod Dev* 2007; 53(6): 1175–1182.
- 49 Dumollard R, Lévassieur M, Hebras C, Huitorel P, Carroll M, Chambon JP, McDougall A. Mos limits the number of meiotic divisions in urochordate eggs. *Development* 2011; 138(5): 885–895.
- 50 Tsuiko O, Jatsenko T, Parameswaran Grace LK, Kurg A, Vermeesch JR, Lanner F, Altmae S, Salumets A. A speculative outlook on embryonic aneuploidy: Can molecular pathways be involved? *Dev Biol* 2019; 447(1): 3–13.
- 51 Manandhar G, Schatten H, Sutovsky P. Centrosome reduction during gametogenesis and its significance. *Biol Reprod* 2005; 72(1): 2–13.
- 52 Bennabi I, Terret ME, Verlhac MH. Meiotic spindle assembly and chromosome segregation in oocytes. *J Cell Biol* 2016; 215(5): 611–619.
- 53 Verlhac MH, de Pennart H, Maro B, Cobb MH, Clarke HJ. MAP kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule-organizing centers during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol* 1993; 158(2): 330–340.
- 54 Gotoh Y, Nishida E, Matsuda S, Shiina N, Kosako H, Shio-kawa K, Akiyama T, Ohta K, Sakai H. *In vitro* effects on microtubule dynamics of purified *Xenopus* M phase-activated MAP kinase. *Nature* 1991; 349(6306): 251–254.
- 55 Verlhac MH, Lefebvre C, Guillaud P, Rassinier P, Maro B. Asymmetric division in mouse oocytes: with or without Mos. *Curr Biol* 2000; 10(20): 1303–1306.
- 56 Sun QY, Lai L, Wu GM, Park KW, Day BN, Prather RS, Schatten H. Microtubule assembly after treatment of pig oocytes with taxol: correlation with chromosomes, gamma-tubulin, and MAP kinase. *Mol Reprod Dev* 2001; 60(4): 481–490.
- 57 Lee J, Miyano T, Moor RM. Localisation of phosphorylated MAP kinase during the transition from meiosis I to meiosis II in pig oocytes. *Zygote* 2000; 8(2): 119–125.
- 58 Goto S, Naito K, Ohashi S, Sugiura K, Naruoka H, Iwamori N, Tojo H. Effects of spindle removal on MPF and MAP kinase activities in porcine matured oocytes. *Mol Reprod Dev* 2002; 63(3): 388–393.
- 59 Meunier S, Vernos I. Acentrosomal microtubule assembly in mitosis: the where, when, and how. *Trends Cell Biol* 2016; 26(2): 80–87.
- 60 Helmke KJ, Heald R. TPX2 levels modulate meiotic spindle size and architecture in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Biol* 2014; 206(3): 385–393.
- 61 Huang X, Ding L, Pan R, Ma PF, Cheng PP, Zhang CH, Shen YT, Xu L, Liu Y, He XQ, Qi ZQ, Wang HL. WHAMM is required for meiotic spindle migration and asymmetric cytokinesis in mouse oocytes. *Histochem Cell Biol* 2013; 139(4): 525–534.
- 62 Liu J, Wang QC, Wang F, Duan X, Dai XX, Wang T, Liu HL, Cui XS, Kim NH, Sun SC. Nucleation promoting factors regulate the expression and localization of Arp2/3 complex during meiosis of mouse oocytes. *PLoS One* 2012; 7(12): e52277.
- 63 Chaigne A, Campillo C, Gov NS, Voituriez R, Azoury J,

- Umana-Diaz C, Almonacid M, Queguiner I, Nassoy P, Sykes C, Verlhac MH, Terret ME. A soft cortex is essential for asymmetric spindle positioning in mouse oocytes. *Nat Cell Biol* 2013; 15(8): 958–966.
- 64 Sun SC, Wang ZB, Xu YN, Lee SE, Cui XS, Kim NH. Arp2/3 complex regulates asymmetric division and cytokinesis in mouse oocytes. *PLoS One* 2011; 6(4): e18392.
- 65 Sun SC, Xu YN, Li YH, Lee SE, Jin YX, Cui XS, Kim NH. WAVE2 regulates meiotic spindle stability, peripheral positioning and polar body emission in mouse oocytes. *Cell Cycle* 2011; 10(11): 1853–1860.
- 66 Deng M, Williams CJ, Schultz RM. Role of MAP kinase and myosin light chain kinase in chromosome-induced development of mouse egg polarity. *Dev Biol* 2005; 278(2): 358–366.
- 67 Deng M, Suraneni P, Schultz RM, Li R. The Ran GTPase mediates chromatin signaling to control cortical polarity during polar body extrusion in mouse oocytes. *Dev Cell* 2007; 12(2): 301–308.
- 68 Chen J, Melton C, Suh N, Oh JS, Horner K, Xie F, Sette C, Blelloch R, Conti M. Genome-wide analysis of translation reveals a critical role for deleted in azoospermia-like (Dazl) at the oocyte-to-zygote transition. *Genes Dev* 2011; 25(7): 755–766.
- 69 Kumar P, Sait SF. Luteinizing hormone and its dilemma in ovulation induction. *J Hum Reprod Sci* 2011; 4(1): 2–7.
- 70 Howles CM. Role of LH and FSH in ovarian function. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 161(1–2): 25–30.
- 71 Kumar TR, Wang Y, Lu N, Matzuk MM. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet* 1997; 15(2): 201–204.
- 72 Pincus G, Enzmann EV. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*: I. the activation of ovarian eggs. *J Exp Med* 1935; 62(5): 665–675.
- 73 Wigglesworth K, Lee KB, O'Brien MJ, Peng J, Matzuk MM, Eppig JJ. Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is required for meiotic arrest of mammalian oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(39): E3723–E3729.
- 74 Zhang M, Su YQ, Sugiura K, Xia G, Eppig JJ. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science* 2010; 330(6002): 366–369.
- 75 Norris RP, Ratzan WJ, Freudzon M, Mehlmann LM, Krall J, Movsesian MA, Wang H, Ke H, Nikolaev VO, Jaffe LA. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development* 2009; 136(11): 1869–1878.
- 76 Vaccari S, Weeks JL, 2nd, Hsieh M, Menniti FS, Conti M. Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biol Reprod* 2009; 81(3): 595–604.
- 77 Hinckley M, Vaccari S, Horner K, Chen R, Conti M. The G-protein-coupled receptors GPR3 and GPR12 are involved in cAMP signaling and maintenance of meiotic arrest in rodent oocytes. *Dev Biol* 2005; 287(2): 249–261.
- 78 Horner K, Livera G, Hinckley M, Trinh K, Storm D, Conti M. Rodent oocytes express an active adenylyl cyclase required for meiotic arrest. *Dev Biol* 2003; 258(2): 385–396.
- 79 Ledent C, Demeestere I, Blum D, Petermans J, Hamalainen T, Smits G, Vassart G. Premature ovarian aging in mice deficient for Gpr3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(25): 8922–8926.
- 80 Conti M, Hsieh M, Zamah AM, Oh JS. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 356(1–2): 65–73.
- 81 Fan HY, O'Connor A, Shitanaka M, Shimada M, Liu Z, Richards JS. Beta-catenin (CTNNB1) promotes preovulatory follicular development but represses LH-mediated ovulation and luteinization. *Mol Endocrinol* 2010; 24(8): 1529–1542.
- 82 Fan HY, Shimada M, Liu Z, Cahill N, Noma N, Wu Y, Gosson J, Richards JS. Selective expression of KrasG12D in granulosa cells of the mouse ovary causes defects in follicle development and ovulation. *Development* 2008; 135(12): 2127–2137.
- 83 Fan HY, Liu Z, Johnson PF, Richards JS. CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP)-alpha and -beta are essential for ovulation, luteinization, and the expression of key target genes. *Mol Endocrinol* 2011; 25(2): 253–268.
- 84 Sela-Abramovich S, Chorev E, Galiani D, Dekel N. Mitogen-activated protein kinase mediates luteinizing hormone-induced breakdown of communication and oocyte maturation in rat ovarian follicles. *Endocrinology* 2005; 146(3): 1236–1244.
- 85 El-Hayek S, Clarke HJ. Control of oocyte growth and development by intercellular communication within the follicular niche. *Results Probl Cell Differ* 2016; 58: 191–224.
- 86 Monniaux D. Driving folliculogenesis by the oocyte-somatic cell dialog: Lessons from genetic models. *Theriogenology* 2016; 86(1): 41–53.
- 87 Sanchez F, Smitz J. Molecular control of oogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1822(12): 1896–1912.
- 88 Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, Rose UM, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 2001; 142(11): 4891–4899.
- 89 Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Control of primordial fol-

- licle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 1999; 140(12): 5789–5796.
- 90 Guo H. Specialized ribosomes and the control of translation. *Biochem Soc Trans* 2018; 46(4): 855–869.
- 91 Danckwardt S, Gantzert AS, Macher-Goeppinger S, Probst HC, Gentzel M, Wilm M, Grone HJ, Schirmacher P, Hentze MW, Kulozik AE. p38 MAPK controls prothrombin expression by regulated RNA 3' end processing. *Mol Cell* 2011; 41(3): 298–310.
- 92 Dean JL, Brook M, Clark AR, Saklatvala J. p38 mitogen-activated protein kinase regulates cyclooxygenase-2 mRNA stability and transcription in lipopolysaccharide-treated human monocytes. *J Biol Chem* 1999; 274(1): 264–269.
- 93 Djuranovic S, Nahvi A, Green R. miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. *Science* 2012; 336(6078): 237–240.
- 94 Lee SH, Choi HS, Kim H, Lee Y. ERK is a novel regulatory kinase for poly(A) polymerase. *Nucleic Acids Res* 2008; 36(3): 803–813.
- 95 Laishram RS. Poly(A) polymerase (PAP) diversity in gene expression--star-PAP vs canonical PAP. *FEBS Lett* 2014; 588(14): 2185–2197.
- 96 Dickson KS, Bilger A, Ballantyne S, Wickens MP. The cleavage and polyadenylation specificity factor in *Xenopus laevis* oocytes is a cytoplasmic factor involved in regulated polyadenylation. *Mol Cell Biol* 1999; 19(8): 5707–5717.
- 97 Kuhn U, Wahle E. Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1678(2–3): 67–84.
- 98 Shveygert M, Kaiser C, Bradrick SS, Gromeier M. Regulation of eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) phosphorylation by mitogen-activated protein kinase occurs through modulation of Mnk1-eIF4G interaction. *Mol Cell Biol* 2010; 30(21): 5160–5167.
- 99 Minich WB, Balasta ML, Goss DJ, Rhoads RE. Chromatographic resolution of *in vivo* phosphorylated and nonphosphorylated eukaryotic translation initiation factor eIF-4E: increased cap affinity of the phosphorylated form. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(16): 7668–7672.
- 100 Scheper GC, van Kollenburg B, Hu J, Luo Y, Goss DJ, Proud CG. Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E markedly reduces its affinity for capped mRNA. *J Biol Chem* 2002; 277(5): 3303–3309.