

微管解聚酶MCAK的研究进展和展望

张良余 姚雪彪*

(中国科学技术大学, 安徽细胞动力学与化学生物学省级实验室, 合肥 230027)

摘要 微管骨架是决定细胞可塑性与动力学的重要亚细胞结构, 其动态性的高度可控是细胞健康的重要保证。在细胞内, 微管动力学主要由微管相关蛋白调控。微管结合蛋白MCAK(mitotic centromere-associated kinesin)是细胞内主要的微管解聚酶之一, 它通过调节纺锤体微管的动态性, 保证有丝分裂中染色体的忠实分离。MCAK在有丝分裂中的活性受到多种激酶的严格调控。MCAK活性的异常与多种肿瘤的发生发展密切相关。

关键词 微管; 有丝分裂; 微管解聚酶; MCAK; 磷酸化; 肿瘤

Progress in Microtubule Depolymerase MCAK

Zhang Liangyu, Yao Xuebiao*

(Anhui Key Laboratory of Cellular Dynamics & Chemical Biology, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China)

Abstract The cellular function of microtubule depends on its closely regulated dynamics. In cells, microtubule dynamics is modulated by microtubule-associated proteins. MCAK (mitotic centromere-associated kinesin), a key microtubule depolymerase, orchestrates faithful chromosome segregation in mitotic cells by regulating spindle microtubule dynamics. The microtubule depolymerase activity of MCAK is closely regulated by a variety of mitotic kinases. More and more data indicates that deregulation of MCAK is correlated with tumorigenesis.

Key words microtubule; mitosis; microtubule depolymerase; MCAK; phosphorylation; tumor

1 引言

微管是真核生物三大主要细胞骨架之一, 是由 α 、 β 微管蛋白组成的异二聚体头尾相连形成原纤维, 再由原纤维横向结合形成的直径约25 nm的极性中空管状结构。微管对细胞内许多重要的生命活动都有至关重要的调节作用, 如细胞正常形态和结构的维持、细胞分裂、细胞运动等。微管的这些功能依赖于其高度可控的动态性。在细胞内微管的负端包埋在中心体中, 而正端伸向细胞边缘并不停地处于聚合或解聚或二者相互转换的状态(微管的动态不稳定性)。微管动态不稳定性是由美国细胞生物学家Tim Mitchison与Marc Kirschner于上世纪80年代中提出的微管动态性的普识理论^[1], 但其功能的结

构基础至今仍不清楚。

2 微管解聚酶MCAK的研究进展

在细胞内, 微管的动态性主要由微管结合蛋白调控。在这些调控蛋白中, Kinesin-13家族的微管解聚酶对微管动态性的调控至关重要^[2-3]。和经典的驱动蛋白不一样, Kinesin-13家族成员的马达结构域不在分子的N-端^[4], 也没有沿微管运输货物的功能, 它们主要通过水解ATP诱导微管末端不稳定, 进而促进微管的解聚和崩塌^[5-6]。在哺乳动物中, Kinesin-13家族的基因共表达四种蛋白: Kif2A^[7]、Kif2B^[8]、Kif2C/MCAK(mitotic centromere-associated kinesin)^[9]和Kif24^[10]。Kif2A主要定位在中心体上, 通过解聚微管, 促进纺锤体微管的熔断(flux)^[11]和纺锤体的双极定向^[12]。Kif2B主要定位在着丝粒、纺锤体微管、中体和动点上。Kif2B调节着纺锤体的组装、染色体的运动和胞质分裂^[13]。Kif24定位于中心粒, 在纤毛的

收稿日期: 2013-04-20 接受日期: 2013-05-06

*通讯作者。Tel: 0551-63607141, E-mail: yaorb@ustc.edu.cn

Received: April 20, 2013 Accepted: May 6, 2013

*Corresponding author. Tel: +86-551-63607141, E-mail: yaorb@ustc.edu.cn

网络出版时间: 2013-07-15 15:39

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130715.1539.001.html>

发生方面具有重要的调控作用^[10]。而Kif2C/MCAK是Kinesin-13家族中研究最多的成员。下面我们对MCAK的研究进展进行总结, 介绍目前对其特性和功能的认识, 并对MCAK的进一步研究进行展望。

2.1 MCAK的基本结构

MCAK的马达结构域在其颈部结构域之后, 位于分子的中部。MCAK的N-端有一个球状区域负责MCAK的定位, 而C-端有一段卷曲螺旋负责二聚化^[9]。MCAK的马达结构域加上颈部区域便具有较强的微管解聚活性^[14], 但MCAK的C-端结构域对其活性有明显的调节作用^[15]。这可能是因为MCAK的C-端增强了其微管异二聚体的去除能力^[16]。在MCAK的结构中, 带正电荷的颈部区域对MCAK的微管解聚活性非常重要^[17]。单分子实验发现, MCAK的带正电荷的颈部通过催化MCAK与微管的结合, 促进了MCAK沿着微管向微管末端的扩散^[16], 而微管末端的定位对于MCAK行使微管解聚活性至关重要^[18]。所以, 全长的MCAK具有更高的微管解聚活性^[15]。

2.2 MCAK的定位和功能

在整个细胞周期中, 细胞质中和正在生长的微管末端都有MCAK的定位^[19]。值得注意的是, 当细胞进入有丝分裂, MCAK还动态地富集到许多亚细胞结构上, 比如中心体、内层着丝粒、外层动点、纺锤体微管以及中体等^[9,20-23]。和其定位类似, MCAK在细胞中的功能也比较复杂。MCAK通过解聚微管, 调控着包括微管动态、纺锤体组装、动点-微管连接、染色体运动等多种重要的细胞生命活动^[2]。MCAK可以降低间期细胞中微管的稳定性, 促使微管更为动态^[24-26]。在非洲爪蟾卵细胞裂解液中, 抑制MCAK(*Xenopus* MCAK)的活性, 会导致纺锤体的异常和中期染色体排列的错误^[22,27]。在哺乳动物细胞中, MCAK的敲低会导致有丝分裂中期染色体的错误排列和后期染色体的异常分离^[11,21,28-29]。而细胞内过高的MCAK活性会导致多极纺锤体的形成^[23,30-31]和纺锤体组装的异常^[24,29,32]。在MCAK活性较低的后期细胞中, 染色体桥和后滞染色体的出现, 可能是由于MCAK活性太低不能纠正错误的动点-微管连接导致的^[28-29]。未纠正的错误的动点-微管连接是导致染色体非均等分配的主要原因, 会导致非整倍体细胞的产生。非整倍体可能是肿瘤发生的潜在的诱导原因^[33]。所以, MCAK精确的活性调节对保证

染色体忠实分离和基因组的稳定性至关重要。

2.3 MCAK的微管末端定位及微管解聚机制

MCAK的微管解聚活性依赖于其微管末端的定位^[34-36]。MCAK到达微管末端有多种途径。在体外, 重组MCAK沿着微管侧壁通过一维扩散高效迅速地抵达微管末端^[37]。虽然从溶液中直接结合微管末端的方式也是存在的, 但相比而言, 效率非常之低。MCAK结合微管侧壁的效率主要受到MCAK颈部正电荷氨基酸的调控。MCAK的颈部区域极大地提高了MCAK与微管侧壁的结合效率, 进而促进了MCAK向微管末端的扩散^[36]。

在体内, 由于许多微管结合蛋白的存在, MCAK还可以通过其他方式到达微管末端。EB蛋白(end-binding proteins)是微管正端结合蛋白(plus-end tracking proteins, +TIPs)的核心组分, 它们可以自发地识别和跟踪正在生长的微管末端^[38]。EB蛋白可以招募很多其他的微管正端跟踪蛋白到微管末端^[39]。MCAK也是微管正端跟踪蛋白^[19], 它可以通过N-端的SxIP基序(x代表任意氨基酸残基)与EB蛋白结合并被EB蛋白招募到正在生长的微管末端^[40]。依赖于EB蛋白的微管末端聚集对MCAK的微管解聚功能至关重要, 因为通过突变MCAK的SxIP基序, 破坏其基于EB蛋白的微管末端招募途径, 显著地降低了MCAK的微管解聚活性^[18]。我们最近的研究鉴定了两个新的微管正端跟踪蛋白: TIP150^[41]和DDA3^[42-43]。TIP150可以通过与MCAK的结合促进MCAK在微管末端的定位^[41]。TIP150也是一个依赖于EB1的含有SxIP基序的微管正端跟踪蛋白, 所以TIP150对MCAK的微管末端的定位的促进也是依赖于EB1的^[41]。DDA3是我们最新鉴定的一个的微管正端跟踪蛋白^[43], 它也可以结合MCAK^[44], 所以可能也是MCAK的一个潜在的调节者。我们最新的研究提示: EB1-TIP150以及EB1-DDA3的相互作用都受到PCAF乙酰化的调控, 这种微管末端定位的调节对维系有丝分裂期染色体稳定性以及促进细胞定向迁移方面具有重要作用^[43,45-46]。此外, Kif18B与MCAK在微管末端的结合对MCAK在有丝分裂中的微管解聚活性也非常重要, 但是否通过直接影响MCAK的微管末端定位, 还有待进一步的研究^[47]。

MCAK是如何解聚微管的呢? 体外重组实验及蛋白的结构给了我们一些提示。结合AMPPNP(不水解的ATP类似物)的MCAK可以稳定微管原纤维的卷

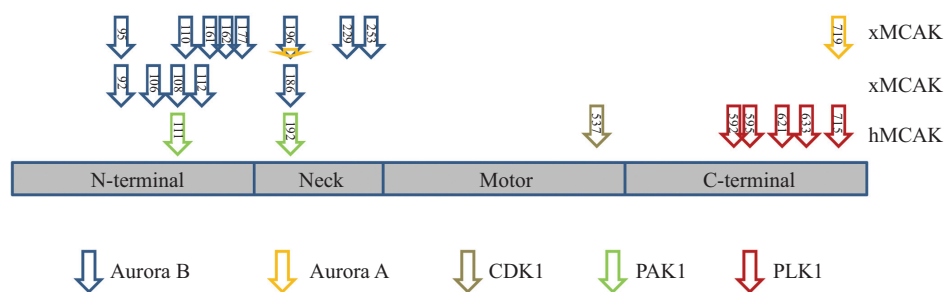
曲和环状结构^[34,48-50]。此外,晶体结构也预示MCAK的马达结构域和微管原纤维的卷曲结构是比较适合相互作用的^[6,51]。所以,MCAK很可能是通过诱导或稳定微管原纤维的弯曲构象,促进微管的不稳定和崩塌的。最近,Friel和Howard^[52]通过对MCAK的ATP酶循环的研究提出了如下的解聚模型:结合ATP的MCAK遇到微管侧壁后便紧密地结合上去;微管侧壁随后刺激ATP水解为ADP;ADP-MCAK或ADP-Pi-MCAK对微管的结合力较小,于是可以沿微管侧壁扩散;有些扩散到微管末端的MCAK(没有到达微管末端的ADP-MCAK,在高ATP浓度下可以转换成ATP-MCAK再结合微管)在微管末端的刺激下,将ADP置换成ATP;ATP-MCAK对微管结合力强,这可能会诱导微管末端弯曲,并解聚微管(MCAK也有可能只水解ATP但不从微管末端解聚微管蛋白);ATP随后水解使MCAK释放微管蛋白异二聚体,而ADP-MCAK可以直接结合微管或置换为ATP-MCAK再结合微管(因为MCAK是个二聚体,所以在解聚微管时可能并没有完全脱离微管,这样一个MCAK分子可在微管末端做多轮的解聚)。在细胞中,在正在生长的微管正末端有个GTP帽,起到稳定微管的作用。MCAK可能正是通过上述机制促进微管末端的GTP帽的水解,进而促进微管的崩塌^[5,35,53]。

2.4 MCAK的磷酸化修饰

MCAK受到许多结合蛋白的调控,除了上述的EB1^[19,54-55]、TIP150^[41]和Kif18B^[47],还有ICIS^[56]、hSgo2^[57]等蛋白的调节。但MCAK调控最为复杂的地方还是有丝分裂相关激酶的磷酸化调节(图1)。

Aurora B是有丝分裂中最为重要的激酶之一,

它依赖动态的地位,调控着包括动点-微管错误连接的纠正,纺锤体检验点的激活,后期收缩环的收缩等多种有丝分裂事件^[58]。Aurora B在动点-微管连接纠错方面的功能近十年来得到了广泛研究。这其中MCAK的调控是Aurora B功能的重要一环。不同研究组通过对不同物种中MCAK的研究,发现在MCAK的N-端和颈部区域有许多Aurora B的磷酸化位点,且这些位点的磷酸化都抑制了MCAK的微管解聚活性^[20,59-60]。在这些位点中Ser196位的磷酸化对MCAK的影响最大^[60]。在爪蟾的卵细胞裂解液中,干扰MCAK Ser196位的磷酸化功能,会导致中期细胞染色体排列的异常^[20]。这些位点的磷酸化之所以抑制MCAK的活性,可能是因为磷酸化影响到了MCAK与微管或微管结合蛋白的作用,进而影响了MCAK到达微管末端的能力。因为MCAK颈部区域的正电荷对其微管结合效率依赖的沿微管侧壁的扩散至关重要^[36],那么Aurora B对MCAK颈部的磷酸化可能会中和这些正电荷,进而影响到MCAK的扩散。而Aurora B对MCAK N-端的磷酸化,可能是因为影响到了MCAK基于SxIP基序的EB1的结合。事实确是如此,Aurora B对MCAK SxIP基序附近的丝氨酸的磷酸化,降低了MCAK与EB1的结合^[19,54]。非但如此,这些磷酸化还降低了MCAK与其它调控蛋白如TIP150及Kif18B^[47]的结合。虽然Aurora B对MCAK的磷酸化可能还通过其他的机制抑制了MCAK的活性,但无疑微管末端的定位能力可能是主要的机制之一。有趣的是,虽然Aurora B抑制MCAK的活性,并且抑制了MCAK的微管末端定位,但Aurora B却是MCAK着丝粒定位必需的^[20,60]。而



不同颜色的箭头代表MCAK被不同的激酶磷酸化。箭头中的数字代表不同物种中MCAK被相应激酶磷酸化的位点。xMCAK: 非洲爪蟾MCAK; cMCAK: 中国仓鼠MCAK; hMCAK: 人源MCAK。

Different colored arrows indicate phosphorylation by different kinases. The numbers in the arrows indicate amino acid positions on MCAK from different species. xMCAK: *Xenopus* MCAK; cMCAK: *Cricetulus griseus* MCAK; hMCAK: *Homo sapiens* MCAK.

图1 有丝分裂蛋白激酶对MCAK的磷酸化位点

Fig.1 Phosphorylation sites on MCAK by mitotic kinases

且, Aurora B磷酸化的MCAK的定位更靠近内层着丝粒, 而非磷酸化的MCAK的定位却更靠近外层着丝粒^[20]。Aurora B对MCAK不同位点的磷酸化, 对MCAK在染色体上的定位视乎有着不同的作用。在爪蟾中, Ser95位的磷酸化促进了MCAK的染色体臂定位, 而Ser196位的磷酸化却促进MCAK从染色体臂上的解离^[61]。所以, Aurora B对MCAK不同位点的磷酸化的时空性, 关联性及功能的协调性还需系统的研究。

Aurora A是Aurora家族的另一个激酶, 主要定位在中心体和纺锤体极上, 对中心体的成熟和分离, 纺锤体的双极定向有着重要的调控作用^[62-63]。在人的U2OS细胞中, Aurora A对招募MCAK到纺锤体极上是必要的, Aurora A可能通过招募MCAK来拮抗微管聚合酶ch-TOG的作用, 从而保证纺锤体极的正常大小^[64]。有趣的是, 爪蟾的Aurora A可以磷酸化MCAK的两个位点, Ser196和Ser719^[65]。在没有染色质和中心体的情况下, Aurora A在Ran诱导的星体中央, 对MCAK Ser196位的磷酸化, 促进了星体极的聚集。而对Ser719的磷酸化却降低了MCAK在星体极的定位, 增加了其在纺锤体极的定位, 促进了纺锤体的双极定向。MCAK颈部区域的Ser196的磷酸化抑制了MCAK的活性(见Aurora B部分及图1), 所以Aurora A可能是通过抑制MCAK的活性, 促进星体的聚集的。Aurora A磷酸化MCAK Ser719是通过什么机制调节MCAK的动态定位, 进而促进纺锤体的双极定向的还需进一步的研究。

CDK1是有丝分裂中最主要的调节激酶之一。在人的细胞中, CDK1对MCAK核心区Thr537位的磷酸化, 在体内外均抑制MCAK的微管解聚活性^[32]。这个位点位于MCAK核心区的L12环状结构内。L12环之后紧接着就是 $\alpha 4$ 螺旋, $\alpha 4$ 螺旋被认为直接参与了MCAK与微管原纤维末端的弯曲构象的结合, 进而促进了MCAK的微管解聚活性^[6]。Thr537位的磷酸化可能是因为在 $\alpha 4$ 螺旋附近引入了负电荷, 影响了MCAK与微管末端的结合, 进而影响了MCAK的微管解聚活性。但这仍需要进一步的实验验证。CDK1对MCAK的磷酸化主要发生在中心体和纺锤体上。CDK1对MCAK的磷酸化抑制了MCAK在中心体上的定位, 从而促进了纺锤体微管的成核及组装。如果干扰CDK1对MCAK的磷酸化, 会导致明显的纺锤体形成的异常和染色体的错误排列。

PAK1(p21-activated kinase 1)在有丝分裂和微管重塑方面有着重要的调节作用。它通过磷酸化调控包括Stathmin^[66], tubulin cofactor B^[67]以及dynein light chain1^[68]等多种蛋白的功能。PAK1对人源MCAK Ser111和Ser192位的磷酸化, 分别调控了MCAK的中心体定位和MCAK的微管解聚酶活性^[69]。这两个位点也是Aurora的磷酸化位点(图1)。MCAK Ser192是Aurora A/B的磷酸化位点^[20,59-60,65], Ser111是Aurora B的磷酸化位点^[20], 此外, PAK1是Aurora A的上游激酶^[70], 所以这些激酶在时空上是如何调控MCAK的定位和活性的尚需进一步的系统研究。

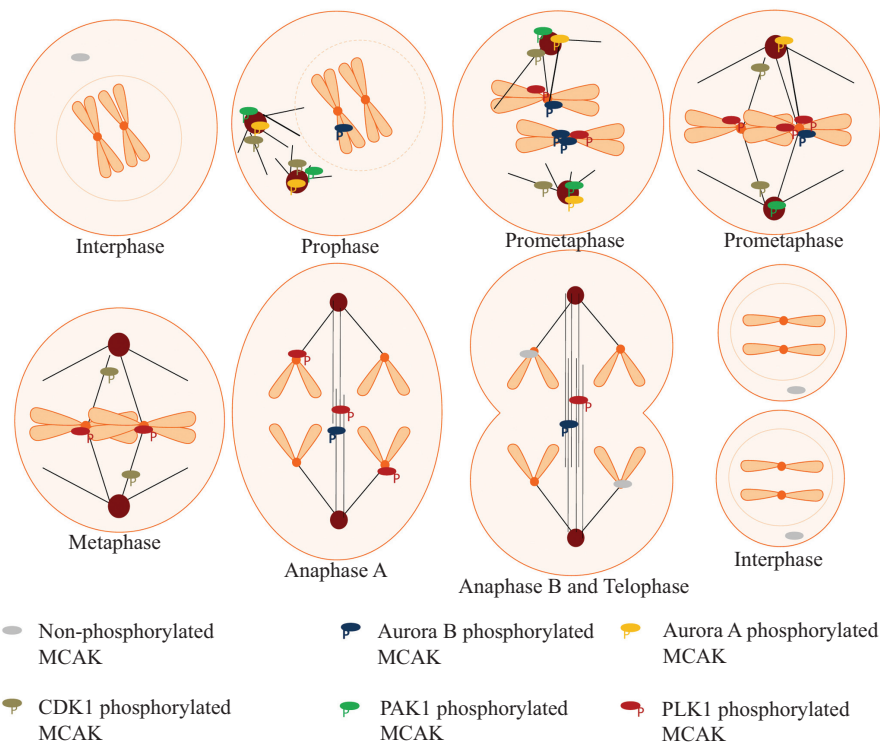
PLK1也是有丝分裂重要的调控激酶之一^[71]。PLK1调控着包括有丝分裂进入、中心体成熟、纺锤体双极定向的形成、稳定的动点-微管连接、cohesion解离、染色体排列和分离以及胞质分裂等多种有丝分裂事件^[72]。通过体外磷酸化和质谱分析, 我们在人源MCAK的C-端鉴定了五个PLK1的磷酸化位点: Ser592、Ser595、Ser621、Ser633和Ser715^[23]。重要的是我们发现, 和其他的有丝分裂激酶不同, PLK1对MCAK C-端的磷酸化上调了MCAK的微管解聚酶活性。有趣的是, 我们发现PLK1介导的磷酸化调节了MCAK的分子内相互作用。所以PLK1很可能通过调节MCAK的分子内构象, 进而调节MCAK的微管解聚酶活性。将来的研究有必要揭示MCAK的活性与其分子构象的直接关系。过表达MCAK的非磷酸化突变体导致有丝分裂后期的异常, 表现为出现后滞染色体的细胞大量增加。这说明, PLK1对MCAK的磷酸化对纠错动点-微管连接至关重要; 而过表达MCAK的模拟磷酸化突变体则导致中期染色体错误排列和有丝分裂多极纺锤体的产生, 说明MCAK磷酸化的适时适当去除对正常的细胞分裂是必需的。MCAK C-端的这些磷酸化位点哪个是最重要的, 以及PLK1对MCAK调节的时空性还有待进一步研究。此外, PLK1对MCAK活性的异常调节可能与染色体的不稳定性有关, 这是否会与某些肿瘤发生有直接的关系也需进一步探索。

MCAK在有丝分裂中受到不同蛋白激酶介导的磷酸化调控, 这些磷酸化发生的时空性不同, 精确地调节着有丝分裂过程中MCAK的活性。根据已有的报道, 我们推测MCAK在有丝分裂中可能存在如下的调控模型(图2): 在细胞进入有丝分裂前期时, 在中心体上的MCAK被CDK1可能还有CaMII γ ^[31]、

Aurora A及PAK1介导的磷酸化抑制,这使得微管可以从中心体处成核、聚合,从而促进纺锤体的组装;在前中期时,着丝粒内层的MCAK的活性被Aurora B抑制,而外层的MCAK被PLK1激活,这使得在前中期部分MCAK可以与Kif2B一起通过调节纺锤体的动态,促进动点-微管连接的错误纠正;快到达中期时,MCAK因动点张力的产生而被拉离着丝粒内层的Aurora B, Aurora B对MCAK的抑制减弱,但PLK1仍可以激活MCAK,这使得MCAK在中期到达之前的一段时间内,可以有足够的活性纠错动点-微管连接,保证后期染色体的平均分离;到了后期A,着丝粒上已经没有Aurora B,但仍有一些PLK1,PLK1此时继续磷酸化激活MCAK,促进后期A染色体向两极的分离运动;到达后期B,PLK1和MCAK的量继续减少;最后汇聚到中体上,被降解或回收到胞质中。在有丝分裂中,不同激酶对MCAK的调节的时空相关性还需进一步系统的研究,以绘制MCAK在有丝分裂中详细的调控网络。

2.5 MCAK与肿瘤

MCAK的调控异常会导致染色体的不稳定^[23],这暗示MCAK的异常可能与肿瘤细胞基因组的不稳定性以及与肿瘤的发生发展有关。MCAK的活性过高或过低可能会通过改变微管的动态性从而抑制微管与染色体的动态衔接,导致染色体的不均等分离,进而导致肿瘤细胞基因组的不稳定性(图3)。事实上,通过对不同肿瘤组织的研究,人们发现MCAK在乳腺癌、胃癌、直肠癌、神经胶质瘤等癌组织中均高表达^[73-77]。此外,MCAK的高表达明显地与胃癌、直肠癌等癌症的发展、浸润、转移和预后有关^[74-75]。MCAK的表达可能还受到抑癌基因p53的抑制^[73]。这些都表明MCAK的表达量可能与肿瘤的发生发展有着直接的关系。除此之外,在乳腺癌中MCAK的磷酸化水平在G₂/M期是明显增加的,考虑到PLK1在包括乳腺癌在内的多种肿瘤中高表达^[78-79],而且PLK1对MCAK的异常调控会导致明显的有丝分裂异常^[23],那么MCAK的异常磷酸化修饰

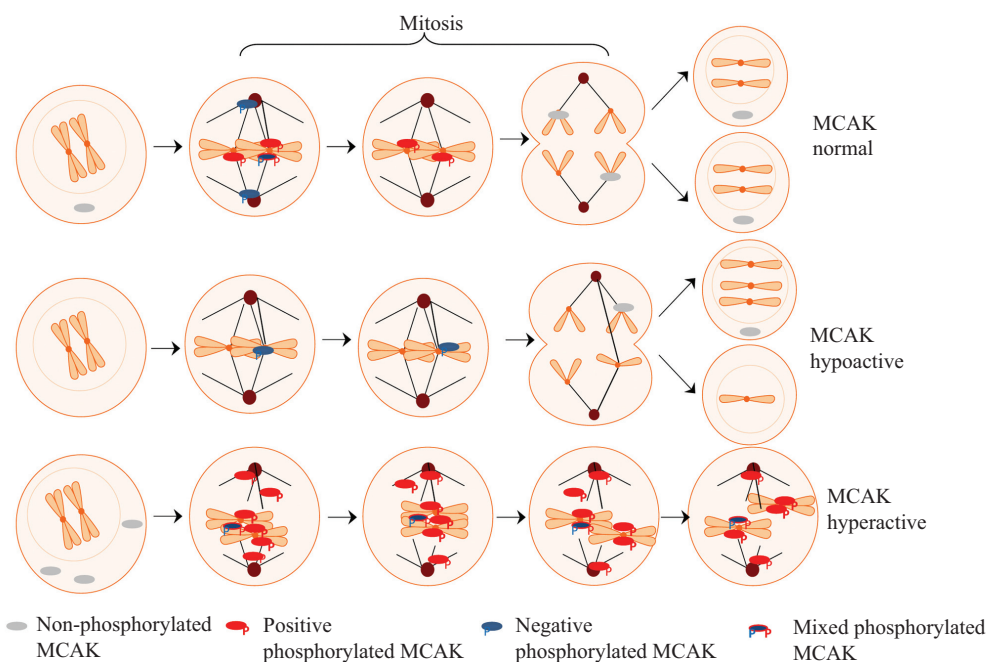


有丝分裂中,MCAK受到Aurora、CDK1、PAK1和PLK1等不同蛋白激酶的磷酸化调控。这些磷酸化在时空上精确地调节着有丝分裂过程中MCAK的活性,进而保证有丝分裂染色体的忠实分离。

In mitosis, MCAK is phosphorylated by a variety of mitotic kinases. The spatio-temporal regulation of MCAK activity by these kinases ensures faithful chromosome segregation.

图2 有丝分裂激酶调节MCAK的时空性

Fig.2 The spatio-temporal regulation of MCAK by different mitotic kinases



正常情况下, 在有丝分裂前期, 中心体上的MCAK受到多种激酶磷酸化的抑制, 这使得纺锤体可以正常组装。从前中期到中期, 着丝粒上的MCAK在PLK1及Aurora B的双重调节下纠正错误的动点-微管连接, 进而保证后期染色体的平均分离。但是, 如果MCAK的量过少或活性过低, 将导致有些错误的动点-微管连接在后期起始前不能被及时纠正, 这样就导致了后期染色体的不均等分配。相反, 如果MCAK的量过多或活性过高, 将导致多个纺锤体极的出现或纺锤体组装的异常, 进而导致染色体双极定向的障碍, 如果这部分细胞逃过凋亡那么可能导致非整倍体细胞的产生。

In common condition, the inhibition of MCAK activity at centrosomes by various mitotic kinases promotes normal spindle assembly in prophase. From prometaphase to metaphase, the precise regulation of MCAK activity at centromeres by PLK1 and Aurora B ensures timely correction of attachment errors between kinetochores with microtubules, and hence, faithful chromosome segregation in anaphase. However, the low expression level or hypoactivity of MCAK in mitotic cells will cause unequal chromosome segregation due to failure to properly correct attachment errors before anaphase onset. On the other hand, the high expression level or hyperactivity of MCAK in mitotic cells will result in chromosome instability due to spindle assembly and dynamics defects if the cells can escape from apoptosis.

图3 MCAK活性的异常与染色体的不稳定性的关系

Fig.3 The deregulation of MCAK results in chromosome instability

可能参与某些肿瘤的发生和发展。最近的研究表明, 高表达的MCAK增加了细胞对paclitaxel的抗性, 而敲低MCAK的表达量则增加了细胞对paclitaxel的敏感性^[80-81]。MCAK在微管动态性调控及肿瘤发生发展中的潜在作用, 使其成为抗肿瘤药物的潜在靶点。我们相信在MCAK抑制剂的配合下, paclitaxel等药物可以更完全地破坏纺锤体的动态性, 进而诱导肿瘤细胞的凋亡。所以针对MCAK的抑制剂的开发, 不论是对MCAK功能的研究还是对相关肿瘤的治理都有重要的意义。

3 展望

近十年来, MCAK的研究不断深入。人们对MCAK的特性和功能已经有了较多的认识。但是仍有许多问题现在还不清楚, 有待进一步的研究。

其中, 最直接也是最重要的就是MCAK的分子

结构。目前为止, 全长MCAK的晶体结构还没有被解析出来。因为MCAK的C-端和颈部区域对MCAK的微管解聚活性有着至关重要的调节作用, 全长MCAK结构的解析无疑可以揭示MCAK的不同结构域是如何相互协调作用的。此外, 我们的研究发现MCAK具有分子内相互作用, 而且PLK1介导的磷酸化可以调节这种相互作用, 进而可能进一步调控了MCAK的解聚酶活性^[23], 但这其中的结构基础我们还不清楚。全长MCAK的结构解析无疑可以揭示其中的调控机制。MCAK的结构和功能的关系使我们想到了Ezrin, Ezrin的磷酸化通过调节Ezrin分子内N-端和C-端的折叠构象进而调节了其细胞学功能^[82-85]。利用原子力显微镜(AFM)对Ezrin构象变化的成功解析提示我们, 利用AFM来揭示磷酸化对MCAK构象的调节应该不失为一种很好的方法^[85]。MCAK越来越受到研究者的重视, 原因之一是MCAK可能会成

为抗肿瘤药物的理想靶点, 但针对MCAK解聚酶活性的药物筛选, 也需要MCAK高质量的结构数据, 所以MCAK的结构解析将是MCAK未来研究中的重要工作之一。

在有丝分裂的前中期, MCAK大量地富集于内层着丝粒区域, 但此时此地的MCAK的活性却受到Aurora B的抑制, 这暗示这部分MCAK除了解聚酶功能外可能还参与了其他的通路, 具有其他的功能。在前中期, 着丝粒外层的动点上有没有有活性的MCAK还需要进一步的探讨。很可能MCAK在前中期也具有动点-微管连接的纠错作用, 但因为Kif2B的代偿机制, 所以此时MCAK纠错作用的丧失所引起的表型不是特别明显^[28]。MCAK在有丝分裂后期的反平行中央微管上有明显的定位, 但这部分MCAK的功能却是未知的, 所以接下来的研究有必要揭示它们的细胞学功能。

在有丝分裂过程中MCAK受到多种有丝分裂激酶的磷酸化调节, 这些激酶调控的时空性, 协调性还需要进一步的系统研究。这需要各个位点特异的磷酸化抗体的制备以及不同蛋白激酶抑制剂的开发。MCAK磷酸化调控异常对基因组的不稳定性的影响也需要系统的研究, 从而评估MCAK的调控异常对肿瘤发生发展的影响。

在细胞内, MCAK微管末端的定位依赖于EB蛋白。但其中的问题是, EB蛋白只定位在正在生长的微管末端, 而MCAK是一个微管解聚酶。MCAK在正在生长的微管末端的微管解聚酶活性是如何调控的, 是不是受到抑制? 基于EB蛋白的MCAK的微管末端定位对MCAK的微管解聚活性至关重要^[18], 但是这种末端定位到底是如何影响MCAK的解聚酶活性的呢? MCAK在微管末端的定位是否还受到其他蛋白的调节, 也需要进一步的探索。在体外MCAK微管解聚机制的模型中, 在ATP水解后, ADP的释放是MCAK的ATP酶循环的限速步骤^[52], 微管的末端可以刺激MCAK将结合的ADP置换为ATP, 但是这种刺激的机制是什么呢? 这可能需要MCAK-微管末端复合物的结构解析或MCAK-tubulin复合物的结构的解析。

目前, 对MCAK微管解聚机制的研究多局限于体外重构体系。但在体内, 由于大量微管结合蛋白的存在, 以及EB蛋白依赖的MCAK的微管末端定位, MCAK的解聚机制和体外的机制应该有较大的区

别。所以体内MCAK微管解聚机制的研究将是一个富有挑战的但很有意义的工作。在体内, MCAK到达微管末端有许多种途径, 这些途径在不同生理条件下或在不同种类的微管上是不是有区别也尚待揭示。

越来越多的证据表明, MCAK活性的异常(表达量的异常或修饰的异常)与多种癌症的发生发展、浸润、转移、预后以及抗药性有关。虽然MCAK的异常所导致的染色体的异常可能进一步引起肿瘤中基因组的不稳定性, 但是MCAK的异常是如何通过微管骨架的调节进而影响到肿瘤细胞的浸润和转移的, 尚需机制性的研究。在肿瘤细胞中, 其他的微管结合蛋白也会表达异常或突变, 如直肠癌中APC的突变^[86], 所以MCAK是否与其它蛋白一起协同调节了肿瘤发生发展中的微管动态性以及肿瘤的抗药性, 还需进一步研究。由于MCAK在肿瘤中的潜在作用, 所以对MCAK功能的全面研究显得十分必要。MCAK除了调节微管动态性外, 是否会通过其他的途径影响细胞的命运尚需揭示。MCAK基因敲出小鼠, 以及多拷贝MCAK转基因小鼠的制备和研究将是未来MCAK研究的重要任务之一。这将有助于揭示MCAK活性异常在动物水平上对肿瘤发生发展的作用。从而为MCAK是否能真正成为抗肿瘤药物的理想靶点提供理论和实验支持。相信针对MCAK的小分子抑制剂或其他类型药物的开发不但能推动MCAK的生物学功能的研究, 而且对于相关肿瘤的治疗也具有非常重要的意义。

参考文献 (References)

- 1 Mitchison T, Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 1984; 312(5991): 237-42.
- 2 Ems-McClung SC, Walczak CE. Kinesin-13s in mitosis: Key players in the spatial and temporal organization of spindle microtubules. *Semin Cell Dev Biol* 2010; 21(3): 276-82.
- 3 Moores CA, Milligan RA. Lucky 13-microtubule depolymerisation by kinesin-13 motors. *J Cell Sci* 2006; 119(Pt 19): 3905-13.
- 4 Lawrence CJ, Dawe RK, Christie KR, Cleveland DW, Dawson SC, Endow SA, *et al.* A standardized kinesin nomenclature. *J Cell Biol* 2004; 167(1): 19-22.
- 5 Desai A, Verma S, Mitchison TJ, Walczak CE. Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes. *Cell* 1999; 96(1): 69-78.
- 6 Ogawa T, Nitta R, Okada Y, Hirokawa N. A common mechanism for microtubule destabilizers-M type kinesins stabilize curling of the protofilament using the class-specific neck and loops. *Cell* 2004; 116(4): 591-602.
- 7 Noda Y, Sato-Yoshitake R, Kondo S, Nangaku M, Hirokawa N. KIF2 is a new microtubule-based anterograde motor that trans-

- ports membranous organelles distinct from those carried by kinesin heavy chain or KIF3A/B. *J Cell Biol* 1995; 129(1): 157-67.
- 8 Miki H, Setou M, Kaneshiro K, Hirokawa N. All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(13): 7004-11.
- 9 Wordeman L, Mitchison TJ. Identification and partial characterization of mitotic centromere-associated kinesin, a kinesin-related protein that associates with centromeres during mitosis. *J Cell Biol* 1995; 128(1/2): 95-104.
- 10 Kobayashi T, Tsang WY, Li J, Lane W, Dynlacht BD. Centriolar kinesin Kif24 interacts with CP110 to remodel microtubules and regulate ciliogenesis. *Cell* 2011; 145(6): 914-25.
- 11 Ganem NJ, Upton K, Compton DA. Efficient mitosis in human cells lacking poleward microtubule flux. *Curr Biol* 2005; 15(20): 1827-32.
- 12 Ganem NJ, Compton DA. The KinI kinesin Kif2a is required for bipolar spindle assembly through a functional relationship with MCAK. *J Cell Biol* 2004; 166(4): 473-8.
- 13 Manning AL, Ganem NJ, Bakhom SF, Wagenbach M, Wordeman L, Compton DA. The kinesin-13 proteins Kif2a, Kif2b, and Kif2c/MCAK have distinct roles during mitosis in human cells. *Mol Biol Cell* 2007; 18(8): 2970-9.
- 14 Maney T, Wagenbach M, Wordeman L. Molecular dissection of the microtubule depolymerizing activity of mitotic centromere-associated kinesin. *J Biol Chem* 2001; 276(37): 34753-8.
- 15 Ems-McClung SC, Hertzner KM, Zhang X, Miller MW, Walczak CE. The interplay of the N- and C-terminal domains of MCAK control microtubule depolymerization activity and spindle assembly. *Mol Biol Cell* 2007; 18(1): 282-94.
- 16 Cooper JR, Wagenbach M, Asbury CL, Wordeman L. Catalysis of the microtubule on-rate is the major parameter regulating the depolymerase activity of MCAK. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17(1): 77-82.
- 17 Ovechkina Y, Wagenbach M, Wordeman L. K-loop insertion restores microtubule depolymerizing activity of a "neckless" MCAK mutant. *J Cell Biol* 2002; 159(4): 557-62.
- 18 Montenegro Gouveia S, Leslie K, Kapitein LC, Buey RM, Grigoriev I, *et al.* *In vitro* reconstitution of the functional interplay between MCAK and EB3 at microtubule plus ends. *Curr Biol* 2010; 20(19): 1717-22.
- 19 Moore AT, Rankin KE, von Dassow G, Peris L, Wagenbach M, Ovechkina Y, *et al.* MCAK associates with the tips of polymerizing microtubules. *J Cell Biol* 2005; 169(3): 391-7.
- 20 Andrews PD, Ovechkina Y, Morrice N, Wagenbach M, Duncan K, Wordeman L, *et al.* Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere. *Dev Cell* 2004; 6(2): 253-68.
- 21 Kline-Smith SL, Khodjakov A, Hergert P, Walczak CE. Depletion of centromeric MCAK leads to chromosome congression and segregation defects due to improper kinetochore attachments. *Mol Biol Cell* 2004; 15(3): 1146-59.
- 22 Walczak CE, Mitchison TJ, Desai A. XKCM1: A *Xenopus* kinesin-related protein that regulates microtubule dynamics during mitotic spindle assembly. *Cell* 1996; 84(1): 37-47.
- 23 Zhang L, Shao H, Huang Y, Yan F, Chu Y, Hou H, *et al.* PLK1 phosphorylates mitotic centromere-associated kinesin and promotes its depolymerase activity. *J Biol Chem* 2011; 286(4): 3033-46.
- 24 Kline-Smith SL, Walczak CE. The microtubule-destabilizing kinesin XKCM1 regulates microtubule dynamic instability in cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13(8): 2718-31.
- 25 Tournebize R, Popov A, Kinoshita K, Ashford AJ, Rybina S, Pozniakovskiy A, *et al.* Control of microtubule dynamics by the antagonistic activities of XMAP215 and XKCM1 in *Xenopus* egg extracts. *Nat Cell Biol* 2000; 2(1): 13-9.
- 26 Mennella V, Rogers GC, Rogers SL, Buster DW, Vale RD, Sharp DJ. Functionally distinct kinesin-13 family members cooperate to regulate microtubule dynamics during interphase. *Nat Cell Biol* 2005; 7(3): 235-45.
- 27 Walczak CE, Gan EC, Desai A, Mitchison TJ, Kline-Smith SL. The microtubule-destabilizing kinesin XKCM1 is required for chromosome positioning during spindle assembly. *Curr Biol* 2002; 12(21): 1885-9.
- 28 Bakhom SF, Thompson SL, Manning AL, Compton DA. Genome stability is ensured by temporal control of kinetochore-microtubule dynamics. *Nat Cell Biol* 2009; 11(1): 27-35.
- 29 Maney T, Hunter AW, Wagenbach M, Wordeman L. Mitotic centromere-associated kinesin is important for anaphase chromosome segregation. *J Cell Biol* 1998; 142(3): 787-801.
- 30 Holmfeldt P, Stenmark S, Gullberg M. Differential functional interplay of TOGp/XMAP215 and the KinI kinesin MCAK during interphase and mitosis. *EMBO J* 2004; 23(3): 627-37.
- 31 Holmfeldt P, Zhang X, Stenmark S, Walczak CE, Gullberg M. CaMKIIgamma-mediated inactivation of the Kin I kinesin MCAK is essential for bipolar spindle formation. *EMBO J* 2005; 24(6): 1256-66.
- 32 Sanhaji M, Friel CT, Kreis NN, Kramer A, Martin C, Howard J, *et al.* Functional and spatial regulation of mitotic centromere-associated kinesin by cyclin-dependent kinase 1. *Mol Cell Biol* 2010; 30(11): 2594-607.
- 33 Pihan G, Doxsey SJ. Mutations and aneuploidy: Co-conspirators in cancer? *Cancer Cell* 2003; 4(2): 89-94.
- 34 Moores CA, Yu M, Guo J, Beraud C, Sakowicz R, Milligan RA. A mechanism for microtubule depolymerization by KinI kinesins. *Mol Cell* 2002; 9(4): 903-9.
- 35 Hunter AW, Caplow M, Coy DL, Hancock WO, Diez S, Wordeman L, *et al.* The kinesin-related protein MCAK is a microtubule depolymerase that forms an ATP-hydrolyzing complex at microtubule ends. *Mol Cell* 2003; 11(2): 445-57.
- 36 Cooper JR, Wagenbach M, Asbury CL, Wordeman L. Catalysis of the microtubule on-rate is the major parameter regulating the depolymerase activity of MCAK. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17(1): 77-82.
- 37 Helenius J, Brouhard G, Kalaidzidis Y, Diez S, Howard J. The depolymerizing kinesin MCAK uses lattice diffusion to rapidly target microtubule ends. *Nature* 2006; 441(7089): 115-9.
- 38 Akhmanova A, Steinmetz MO. Microtubule +TIPs at a glance. *J Cell Sci* 2010; 123(Pt 20): 3415-9.
- 39 Akhmanova A, Steinmetz MO. Tracking the ends: A dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(4): 309-22.
- 40 Lee T, Langford KJ, Askham JM, Bruning-Richardson A, Morrison EE. MCAK associates with EB1. *Oncogene* 2008; 27(17): 2494-500.
- 41 Jiang K, Wang J, Liu J, Ward T, Wordeman L, Davidson A, *et al.* TIP150 interacts with and targets MCAK at the microtubule plus ends. *EMBO Rep* 2009; 10(8): 857-65.

- 42 Zhang L, Yao X. DDA3: A new dancer at the growing end? *Cell Cycle* 2010; 9(2): 227.
- 43 Zhang L, Shao H, Xia P, Adams G, Wang Z, Zhu T, *et al.* DDA3 associates with microtubule plus ends and orchestrates microtubule dynamics and directional cell migration. *Sci Rep* 2013; 3: 1681.
- 44 Jang CY, Fang G. DDA3 associates with MCAK and controls chromosome congression. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 407(3): 610-4.
- 45 Xia P, Wang Z, Liu X, Wu B, Wang J, Ward T, *et al.* EBI acetylation by P300/CBP-associated factor (PCAF) ensures accurate kinetochore-microtubule interactions in mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(41): 16564-9.
- 46 Ward T, Wang M, Liu X, Wang Z, Xia P, Chu Y, *et al.* Regulation of a dynamic interaction between two microtubule-binding proteins, EBI and TIP150, by the mitotic factor PCAF orchestrates kinetochore microtubule plasticity and chromosome stability during mitosis. *J Biol Chem* 2013; 288(22): 15771-85.
- 47 Tanenbaum ME, Macurek L, van der Vaart B, Galli M, Akhmanova A, Medema RH. A complex of Kif18b and MCAK promotes microtubule depolymerization and is negatively regulated by Aurora kinases. *Curr Biol* 2011; 21(16): 1356-65.
- 48 Elie-Caille C, Severin F, Helenius J, Howard J, Muller DJ, Hyman AA. Straight GDP-tubulin protofilaments form in the presence of taxol. *Curr Biol* 2007; 17(20): 1765-70.
- 49 Niederstrasser H, Salehi-Had H, Gan EC, Walczak C, Nogales E. XKCM1 acts on a single protofilament and requires the C terminus of tubulin. *J Mol Biol* 2002; 316(3): 817-28.
- 50 Tan D, Asenjo AB, Mennella V, Sharp DJ, Sosa H. Kinesin-13s form rings around microtubules. *J Cell Biol* 2006; 175(1): 25-31.
- 51 Shipley K, Hekmat-Nejad M, Turner J, Moores C, Anderson R, Milligan R, *et al.* Structure of a kinesin microtubule depolymerization machine. *EMBO J* 2004; 23(7): 1422-32.
- 52 Friel CT, Howard J. The kinesin-13 MCAK has an unconventional ATPase cycle adapted for microtubule depolymerization. *EMBO J* 2011; 30(19): 3928-39.
- 53 Wagenbach M, Domnitz S, Wordeman L, Cooper J. A kinesin-13 mutant catalytically depolymerizes microtubules in ADP. *J Cell Biol* 2008; 183(4): 617-23.
- 54 Honnappa S, Gouveia SM, Weisbrich A, Damberger FF, Bhavesh NS, Jawhari H, *et al.* An EBI-binding motif acts as a microtubule tip localization signal. *Cell* 2009; 138(2): 366-76.
- 55 Groen AC, Maresca TJ, Gatlin JC, Salmon ED, Mitchison TJ. Functional overlap of microtubule assembly factors in chromatin-promoted spindle assembly. *Mol Biol Cell* 2009; 20(11): 2766-73.
- 56 Ohi R, Coughlin ML, Lane WS, Mitchison TJ. An inner centromere protein that stimulates the microtubule depolymerizing activity of a Kif1 kinesin. *Dev Cell* 2003; 5(2): 309-21.
- 57 Huang H, Feng J, Famulski J, Rattner JB, Liu ST, Kao GD, *et al.* Tripin/hSgo2 recruits MCAK to the inner centromere to correct defective kinetochore attachments. *J Cell Biol* 2007; 177(3): 413-24.
- 58 Carmena M, Wheelock M, Funabiki H, Earnshaw WC. The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13(12): 789-803.
- 59 Ohi R, Sapra T, Howard J, Mitchison TJ. Differentiation of cytoplasmic and meiotic spindle assembly MCAK functions by Aurora B-dependent phosphorylation. *Mol Biol Cell* 2004; 15(6): 2895-906.
- 60 Lan W, Zhang X, Kline-Smith SL, Rosasco SE, Barrett-Wilt GA, Shabanowitz J, *et al.* Aurora B phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity. *Curr Biol* 2004; 14(4): 273-86.
- 61 Zhang X, Lan W, Ems-McClung SC, Stukenberg PT, Walczak CE. Aurora B phosphorylates multiple sites on mitotic centromere-associated kinesin to spatially and temporally regulate its function. *Mol Biol Cell* 2007; 18(9): 3264-76.
- 62 Marumoto T, Zhang D, Saya H. Aurora-A—a guardian of poles. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(1): 42-50.
- 63 Barr AR, Gergely F. Aurora-A: the maker and breaker of spindle poles. *J Cell Sci* 2007; 120(Pt 17): 2987-96.
- 64 de Luca M, Brunetto L, Asteriti IA, Giubettini M, Lavia P, Guaraglini G. Aurora-A and ch-TOG act in a common pathway in control of spindle pole integrity. *Oncogene* 2008; 27(51): 6539-49.
- 65 Zhang X, Ems-McClung SC, Walczak CE. Aurora A phosphorylates MCAK to control ran-dependent spindle bipolarity. *Mol Biol Cell* 2008; 19(7): 2752-65.
- 66 Wittmann T, Bokoch GM, Waterman-Storer CM. Regulation of microtubule destabilizing activity of Op18/stathmin downstream of Rac1. *J Biol Chem* 2004; 279(7): 6196-203.
- 67 Vadlamudi RK, Barnes CJ, Rayala S, Li F, Balasenthil S, Marcus S, *et al.* p21-activated kinase 1 regulates microtubule dynamics by phosphorylating tubulin cofactor B. *Mol Cell Biol* 2005; 25(9): 3726-36.
- 68 Vadlamudi RK, Bagheri-Yarmand R, Yang Z, Balasenthil S, Nguyen D, Sahin AA, *et al.* Dynein light chain 1, a p21-activated kinase 1-interacting substrate, promotes cancerous phenotypes. *Cancer Cell* 2004; 5(6): 575-85.
- 69 Pakala SB, Nair VS, Reddy SD, Kumar R. Signaling-dependent phosphorylation of mitotic centromere-associated kinesin regulates microtubule depolymerization and its centrosomal localization. *J Biol Chem* 2012; 287(48): 40560-9.
- 70 Zhao ZS, Lim JP, Ng YW, Lim L, Manser E. The GIT-associated kinase PAK targets to the centrosome and regulates Aurora-A. *Mol Cell* 2005; 20(2): 237-49.
- 71 Sunkel CE, Glover DM. Polo, a mitotic mutant of *Drosophila* displaying abnormal spindle poles. *J Cell Sci* 1988; 89(Pt 1): 25-38.
- 72 Petronczki M, Lenart P, Peters JM. Polo on the rise—from mitotic entry to cytokinesis with Plk1. *Dev Cell* 2008; 14 (5): 646-59.
- 73 Shimo A, Tanikawa C, Nishidate T, Lin ML, Matsuda K, Park JH, *et al.* Involvement of kinesin family member 2C/mitotic centromere-associated kinesin overexpression in mammary carcinogenesis. *Cancer Sci* 2008; 99(1): 62-70.
- 74 Nakamura Y, Tanaka F, Haraguchi N, Mimori K, Matsumoto T, Inoue H, *et al.* Clinicopathological and biological significance of mitotic centromere-associated kinesin overexpression in human gastric cancer. *Br J Cancer* 2007; 97(4): 543-9.
- 75 Ishikawa K, Kamohara Y, Tanaka F, Haraguchi N, Mimori K, Inoue H, *et al.* Mitotic centromere-associated kinesin is a novel marker for prognosis and lymph node metastasis in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2008; 98(11): 1824-9.
- 76 Gnjjatic S, Cao Y, Reichelt U, Yekebas EF, Nolker C, Marx AH, *et al.* NY-CO-58/KIF2C is overexpressed in a variety of solid

- tumors and induces frequent T cell responses in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer* 2010; 127(2): 381-93.
- 77 Bie L, Zhao G, Wang YP, Zhang B. Kinesin family member 2C (KIF2C/MCAK) is a novel marker for prognosis in human gliomas. *Clin Neurol Neurosurg* 2012; 114(4): 356-60.
- 78 Eckerdt F, Yuan J, Strebhardt K. Polo-like kinases and oncogenesis. *Oncogene* 2005; 24(2): 267-76.
- 79 Strebhardt K, Ullrich A. Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(4): 321-30.
- 80 Ganguly A, Yang H, Pedroza M, Bhattacharya R, Cabral F. Mitotic centromere-associated kinesin (MCAK) mediates paclitaxel resistance. *J Biol Chem* 2011; 286(42): 36378-84.
- 81 Ganguly A, Yang H, Cabral F. Overexpression of mitotic centromere-associated Kinesin stimulates microtubule detachment and confers resistance to paclitaxel. *Mol Cancer Ther* 2011; 10(6): 929-37.
- 82 Nakamura F, Amieva MR, Furthmayr H. Phosphorylation of threonine 558 in the carboxyl-terminal actin-binding domain of moesin by thrombin activation of human platelets. *J Biol Chem* 1995; 270(52): 31377-85.
- 83 Hayashi K, Yonemura S, Matsui T, Tsukita S. Immunofluorescence detection of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins with their carboxyl-terminal threonine phosphorylated in cultured cells and tissues. *J Cell Sci* 1999; 112(Pt 8): 1149-58.
- 84 Zhou R, Zhu L, Kodani A, Hauser P, Yao X, Forte JG. Phosphorylation of ezrin on threonine 567 produces a change in secretory phenotype and repolarizes the gastric parietal cell. *J Cell Sci* 2005; 118(Pt 19): 4381-91.
- 85 Liu D, Ge L, Wang F, Takahashi H, Wang D, Guo Z, *et al.* Single-molecule detection of phosphorylation-induced plasticity changes during ezrin activation. *FEBS Lett* 2007; 581(18): 3563-71.
- 86 Nagase H, Nakamura Y. Mutations of the APC (adenomatous polyposis coli) gene. *Hum Mutat* 1993; 2(6): 425-34.