

Rho小G蛋白相关激酶的结构与功能

闫慧娟 勿呢尔 莫日根 范丽菲*

(内蒙古大学生命科学学院, 呼和浩特 010021)

摘要 Rho小G蛋白家族是Ras超家族成员之一, 人类Rho小G蛋白包括20个成员, 研究最清楚的有RhoA、Rac1和Cdc42。Rho小G蛋白参与了诸如细胞骨架调节、细胞移动、细胞增殖、细胞周期调控等重要的生物学过程。在这些生物学过程的调节中, Rho小G蛋白的下游效应蛋白质如蛋白激酶(p21-activated kinase, PAK)、ROCK(Rho-kinase)、PKN(protein kinase novel)和MRCK(myotonin-related Cdc42-binding kinase)发挥了不可或缺的作用。迄今研究发现, PAK可调节细胞骨架动力学和细胞运动, 另外, PAK通过MAPK(mitogen-activated protein kinases)参与转录、细胞凋亡和生存通路及细胞周期进程; ROCK与肌动蛋白应力纤维介导黏附复合物的形成及与细胞周期进程的调节有关; 哺乳动物的PKN与RhoA/B/C相互作用介导细胞骨架调节; MRCK与细胞骨架重排、细胞核转动、微管组织中心再定位、细胞移动和癌细胞侵袭等有关。该文简要介绍Rho小G蛋白下游激酶PAK、ROCK、PKN和MRCK的结构及其在细胞骨架调节中的功能, 重点总结它们在真核细胞周期调控中的作用, 尤其是在癌细胞周期进程中所发挥的作用, 为寻找癌症治疗的新靶点提供理论依据。

关键词 Rho小G蛋白; 激酶; 细胞周期调控; 癌症

The Structure and Functions of Small Rho GTPase Associated Kinases

Yan Huijuan, Wunier, Morigen, Fan Lifei*

(School of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China)

Abstract Small Rho GTPase protein family is a member of the Ras superfamily. The human Rho family of small GTPase is comprised of 20 members, of which RhoA, Rac1 and Cdc42 are best-studied. Small Rho GTPases are involved in many important biological processes, such as cell cytoskeleton regulation, cell migration, cell proliferation and cell cycle regulation. The downstream effectors (PAK, ROCK, PKN and MRCK) of small Rho GTPases play indispensable roles during the regulation of these biological processes. PAK regulates actin cytoskeleton dynamics and cell movement, and also is involved in MAPK mediated transcription, apoptosis and cell cycle progression; ROCK induces actin stress fiber and focal adhesion formation, and is a regulator of cell cycle progression as well; PKN regulates cell cytoskeleton rearrangement downstream of RhoA/B/C; MRCK is a central regulator in several physiological processes, like cell cytoskeleton rearrangement, nuclei rotation, microtubule organizing center relocation, cell movement and cancer cell invasion. Here, we summarize the current understanding of the structure information and

收稿日期: 2014-01-15 接受日期: 2014-03-26

内蒙古自然科学基金(批准号: 2013MS0505)、内蒙古大学高层次人才科研任务启动费(批准号: 30105-125128)、内蒙古大学博士后研究人员科研项目(批准号: 30105-135112)和内蒙古自治区高等学校科学研究项目(批准号: NJZY14005)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0471-4992971; E-mail: fanlifei95@gmail.com

Received: January 15, 2014 Accepted: March 26, 2014

This work was supported by the Natural Science Foundation of Inner Mongolia (Grant No.2013MS0505), Program of Higher-level Talents of Inner Mongolia University (Grant No.30105-125128), Postdoctoral Foundation of Inner Mongolia University (Grant No.30105-135112) and Higher Scientific Research Project of Inner Mongolia Autonomous Region (Grant No.NJZY14005)

*Corresponding author. Tel: +86-471-4992971; E-mail: fanlifei95@gmail.com

网络出版时间: 2014-07-02 10:44 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.07.0007.html>

functions of small Rho GTPase associated kinases in cell cytoskeleton rearrangement, highlighting the contribution of these kinases on the eukaryotic cell cycle regulation, especially the roles in cancer cell cycle progression. We are hoping to shed light on the cancer treatment via identifying some new therapeutic targets.

Key words small Rho GTPase; kinases; cell cycle regulation; cancer

1 Rho小G蛋白家族及效应蛋白质

1.1 Rho小G蛋白家族

Rho小G蛋白家族是Ras超家族中的一员, 人类Rho小G蛋白家族由20个成员组成, 分别是RhoA、RhoB、RhoC、Rac1、Rac2、Rac3、Cdc42、RhoD、Rnd1、Rnd2、RhoE/Rnd3、RhoG、TC10、TCL、RhoH/TTF、Chp、Wrch-1、Rif、RhoBTB1和RhoBTB2^[1]。Rho小G蛋白参与细胞中多种生物学过程的调控, 在细胞骨架动力学、细胞移动、细胞增殖、细胞周期进程中具有重要作用^[2]。

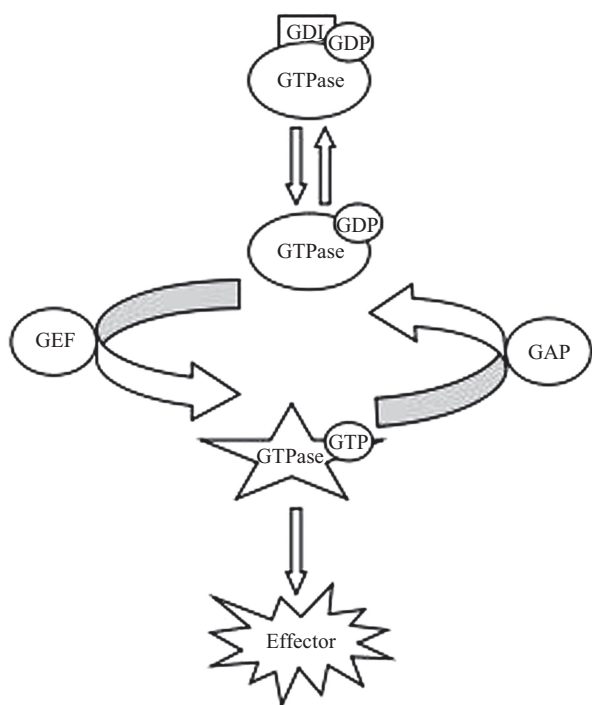
Rho小G蛋白是一类核苷酸依赖型分子开关, 它能用一种简要的机制来控制复杂的细胞生理过程。Rho小G蛋白具有两种结合状态, 一种是结

合GTP的激活状态, 另一种是结合GDP的非激活状态。在激活状态时, GTPase能识别目标蛋白, 即效应蛋白质, 产生反应应答直至GTP水解转变为GDP结合状态。这种活性由鸟嘌呤核苷酸转换因子(guanine nucleotide exchange factors, GEFs)控制。鸟嘌呤核苷酸转换因子催化GDP转变为GTP从而激活开关。GTPase活化蛋白(GTPase activating proteins, GAPs)刺激激活的GTPase转化为非激活状态, 鸟嘌呤核苷酸解离抑制剂(guanine nucleotide dissociation inhibitors, GDIs)抑制GTPase的自发激活。因此, 由这三种蛋白质来调节Rho小G蛋白的活性, 其具体转化方式如图1^[3]。

1.2 Rho小G蛋白效应蛋白质分类

在GTP结合状态下, Rho小G蛋白可以结合其下游效应蛋白质并激活它们, 起始下游信号转导途径并重组肌动蛋白细胞骨架^[5]。到目前为止, 通过亲和纯化实验或酵母双杂交系统已鉴定出30多种Rho小G蛋白效应蛋白质。这些蛋白质根据其保守的GTP结合基序可分为三类, 这些保守的GTP结合基序分别是Cdc42/Rac相互作用结合基序(Cdc42/Rac interactive binding motif, CRIB)、ROCK-I/Kinectin同源结构域(ROCK-I/Kinectin homology region, RKH)和Rho效应蛋白质基序(Rho effector motif, REM)^[6]。

CRIB结构域存在于与Rac和Cdc42结合的效应蛋白质中, 如激活的Cdc42相关酪氨酸激酶(activated Cdc42-associated tyrosine kinase, ACK)、Wiskott-Aldrich综合症蛋白(Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP)、N-WASP(neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein)和p21激活激酶(p-21 activated kinases, PAKs)。有研究表明, CRIB结构域是效应蛋白质与GTPase结合必需的, 但其与GTPase的结合并不紧密^[6]。针对与Cdc42形成复合物的ACK或WASP的结构研究表明, 存在于Rac和Cdc42开关I中(即激活状态下的Rac和Cdc42中)的Asp³⁸对含CRIB的蛋白质是一个必不可少的氨基酸残基。在所有的含“CRIB的效应蛋白”中, 两个保守的His残基与Rac/Cdc42小G蛋白开关I中的Asp³⁸相互作用。这种特殊



Rho小G蛋白具有激活形式和非激活形式。Rho小G蛋白由GEFs、GAPs和GDIs三种调节因子调节其活性。激活的Rho小G蛋白通过与其效应蛋白质相互作用诱导下游反应。

Rho GTPases cycle between an active GTP-bound form and an inactive GDP-bound form. There are three factors (GEFs, GAPs and GDIs) to regulate activity of Rho GTPases. Active GTPases interact with effector proteins and induce downstream responses.

图1 GTPase循环(根据参考文献[4]修改)

Fig.1 The GTPase cycle (modified from reference [4])

的识别机制将Rac的含“CRIB的效应蛋白”与Cdc42的含“CRIB的效应蛋白”加以区分。通过开关I中所含的特殊氨基酸残基,使不同的效应蛋白质与不同的Rho小G蛋白结合。

第二类Rho小G蛋白效应器是包含ROCK/Kinectin同源结构域的蛋白质。这类效应器含有的C-端螺旋基序,在ROCK、香木槎激酶(citron-kinase)和驱动链接蛋白(kinectin)中均有发现。ROCK由一个N-端丝氨酸/苏氨酸激酶结构域、一个位于中心的长 α 螺旋区域、一个C端PH结构域和一个半胱氨酸富集区域以及位于C端的长度为934~1 015残基的Rho结合结构域组成。

蛋白激酶N(protein kinase N, PKN)是典型的第三类Rho小G蛋白效应激酶,可通过其N端Rho效应蛋白质基序(Rho effector motif, REM)与RhoA结合。PKN的REM结合结构域由类似亮氨酸拉链基序的三个重复串联组成[HR1a(homology region 1a)、HR1b和HR1c]。HR1a和HR1b都能独立的结合Rho,但只有HR1a和RhoA之间的相互作用是GTP依赖的^[7]。Rho效应蛋白rothekin与rhopilin含一个N-端HR1结构域(具有RhoA结合能力),因此属于含REM结构域的Rho效应器蛋白质。对RhoA-GTP与PKN N-端形成的复合物的结构研究表明,当HR1a与RhoA的特异区域结合时,HR1a区域形成一个反向平行螺旋(an antiparallel coiled-coil finger fold, ACC)指状折叠^[8]。

1.3 Rho小G蛋白效应激酶的结构与基本功能

1.3.1 PAK PAKs是第一个被发现的Rho小G蛋白调节的激酶,属于STE20丝氨酸/苏氨酸激酶家族成员。PAKs在很多组织中都有表达,在多种癌细胞中均过量表达。PAKs可分为两组,第一组(group I)包含PAK1、PAK2和PAK3;第二组(group II)包含PAK4、PAK5和PAK6。第一组PAKs通过GTPase依赖或非GTPase依赖的形式受细胞外信号激活;第二组PAKs通常是持续激活的^[9]。

Rac、Cdc42的GTP结合形式会与PAK相互作用(图2)。人类的PAK包含6个亚型分别为PAK1、PAK2、PAK3^[10-11]、PAK4、PAK5和PAK6。在体外,PAK1会受Rac1 GTP和Cdc42 GTP刺激,并被磷酸化激活。激活的PAK可磷酸化肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)从而抑制其对肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)的活性,导致

应力纤维的减少。另外,效应蛋白质LIM激酶(LIM domain kinase, LIMK)位于PAK的下游,PAK通过磷酸化LIMK的激活环内的Thr-508氨基酸残基激活LIMK,激活的LIMK磷酸化丝切蛋白(一种肌动蛋白结合蛋白),抑制F-肌动蛋白解聚活性,从而调节肌动蛋白动力学和细胞迁移^[12-15]。

PAK1结合Rac1、Rac2、Rac3和Cdc42,并由此被激活,但PAK1不会与RhoA、RhoB、RhoC、RhoE、Rif和Ras结合。位于PAK1 N端p21结合结构域(p21-binding domain, PBD)内的保守残基可通过与Rho GTPase结合激活PAK1。PAK可以通过CRIB与Rac和Cdc42结合,PAK上的激酶抑制结构域(kinase inhibition, KI)对PAK具有重要的抑制作用,在CRIB上游的赖氨酸束对Rac GTPase结合十分重要^[16]。哺乳动物的PAK1-PAK3 C-端的催化结构域序列相似性较高。PAKs还含有2个保守的PXXP SH3结合基序以及一个保守的非典型SH3结合基序。第一种保守的SH3结合蛋白为Nck,第二种SH3结合Grb2,PAK可以通过Nck和Grb2而被富集到膜上使激酶活性受到刺激,参与脂类(如:鞘氨醇)的相互作用等,此特点也说明,三种PAKs在多种信号转导通路中发挥相同的作用(图2)。

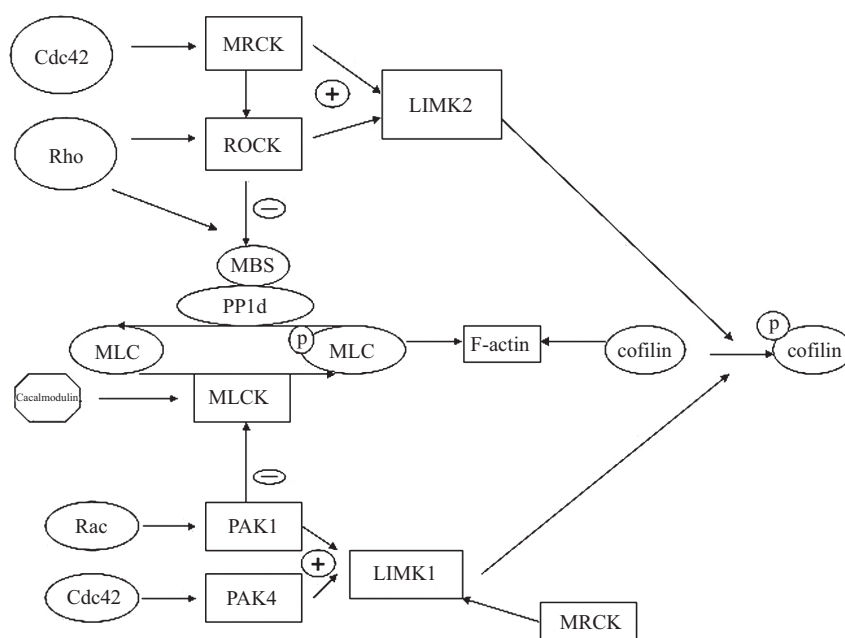
PAK分子水平的调节已研究得较清楚。PAK1在溶液和细胞中具有同源二聚体结构,存在反式抑制构象,PAK1的KI结构域可包被另一个PAK1的催化结构域,从而抑制催化结构域。在这种抑制作用中,PAK1的KI结构域残基发挥着重要的作用^[17]。结构分析和生物化学研究表明,GTPase结合PAK1导致KI结构域的构象发生重要变化,这种变化会破坏KI结构域与催化结构域的相互作用,导致自动磷酸化使全酶激活。位于激活环内催化结构域的单个残基(PAK1的Thr-423)的自动磷酸化,对维持或解除自动抑制以及对外源基质的催化功能具有重要作用。另外,PAK1的Ser-144的自动磷酸化有助于激酶激活,从而PAK1的Ser-198/203的自动磷酸化会下调PIX-PAK(PAK-interacting exchange factor)的相互作用,而降低PIX-PAK在Cdc42调节的趋化白细胞方向感知中的作用^[18]。PIX是一种Cdc42/Rac1鸟嘌呤核苷酸转换因子(GEF),与黏着斑有关,PIX-PAK的相互作用会由于Rac GTP或Cdc42 GTP的局部激活而强烈激活PAK。

1.3.2 ROCK ROCK是第一个被发现的RhoA

下游激酶。ROCK与RhoA的活性有直接关系(图2)。ROCK有2种亚型: ROCK α (ROCKII)和ROCK β (ROCKI/p160ROCK)。ROCKI和ROCKII的功能不同, ROCKI主要在炎症细胞中发挥作用, 而ROCKII主要在血管平滑肌细胞中发挥作用^[19]。在分布上, ROCKI主要存在于肺、肝、脾、肾和睾丸中, ROCKII主要在大脑、肌肉和心脏中表达^[20-21]。在哺乳动物体内, 均存在两种ROCK基因, ROCKI位于18号染色体上, ROCKII基因位于2号染色体上^[22]。前人研究表明, ROCK α /ROCKII是一个独立的Rho结合蛋白。RhoA、RhoB和RhoC可以激活其下游的ROCK分子。ROCK可以磷酸化一系列肌动蛋白细胞骨架调节因子(包括MLCK和LIMK), 激活的LIMK参与丝切蛋白的磷酸化调节, 从而调节细胞骨架和细胞收缩^[23]。另外, ROCKs在有丝分裂中具有多重作用,

如ROCKII磷酸化中间丝蛋白波形蛋白、角质纤维酸性蛋白和神经丝蛋白大亚基, 使局部的中间丝状体分解^[24], 这在有丝分裂后期子细胞分离时是必要的。

ROCKs是一类具有多个结构域的丝氨酸/苏氨酸激酶, 分子量为160 kDa。在其N端存在丝氨酸/苏氨酸激酶结构域。两种ROCK亚型的激酶结构域有高达92%的相似性^[25]。在ROCKs中, 有一个很长的螺旋结构。ROCKII晶体结构显示, 同源二聚体的螺旋结合RhoA·GTP, 此螺旋位于C端的10/13个氨基酸残基的区域^[26]。与Rac1和Cdc42相比, ROCKs与Rho的相互作用与RhoA的Phe-39、Tyr-66、Leu-69残基有关。ROCK的PH结构域被一个富含半胱氨酸的结构中断。ROCK的自我抑制结构域位于激酶的C-端, 在结合Rho·GTP后会解除抑制。自我抑制需要

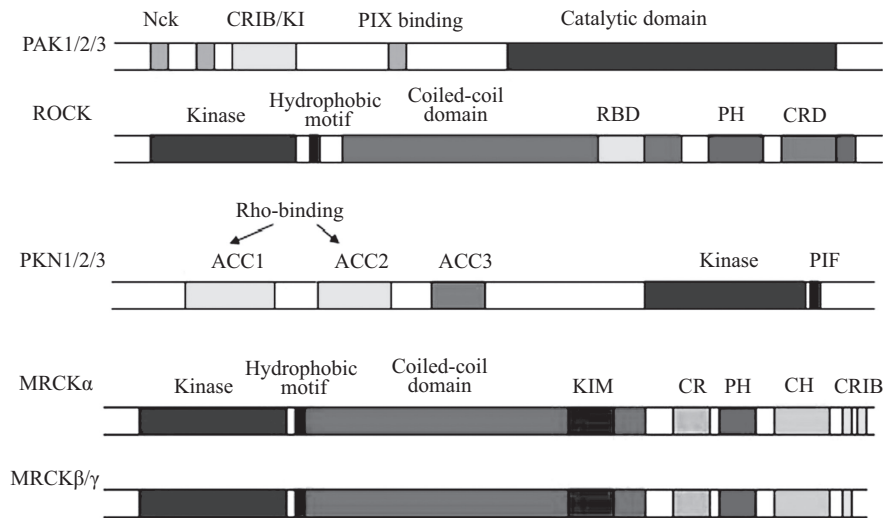


RhoA、Rac1和Cdc42具有数种激酶效应蛋白质。RhoA磷酸化MBS, 导致PP1受到抑制, 促进R-MLC磷酸化, 然而, ROCK却可以使PP1 δ 受到阻滞。ROCK、ROCK、MRCK和PAK调节LIMK的活性, 使其磷酸化而使cofilin失活。当cofilin磷酸化后将不再绑定F-actin, 这些蛋白质可催化F-actin的解聚和活性消失。MLCK是一种钙调激酶, 其可维持MLC复合物处于激活状态, 但PAK可以对MLCK其负调控作用。PAK1通过抑制MLCK的活性调节R-MCL, 另外, PAK1可以结合和调节LIMK1。与PAK相比, Rho和Cdc42与LIMK2的活性关系更紧密。因此, RhoA和Cdc42通过其信号通路中的下游激酶协同或单独发挥作用。

RhoA, Rac1 and Cdc42 have several kinase effectors. RhoA phosphorylates MBS and leads to inhibition of PP1, increasing R-MLC phosphorylation, however, PP1 δ is blocked by ROCK. ROCK, MRCK and PAK regulate LIMK activity, which inactivates cofilin by phosphorylation. Once phosphorylated, cofilin no longer binds to F-actin, and the ability of these proteins to catalyse both F-actin depolymerization and severing is inhibited. Myosin light chain kinase (MLCK) is a calcium/calmodulin-responsive enzyme that maintains the myosin heavy chain (MLC) complex in an active state, but is negatively regulated by PAK. PAK1 regulates R-MLC by inhibition of MLCK activity and also PAK1 can bind to and regulate LIMK1 activation loop downstream of Rac1. Rho and Cdc42 are more closely linked to the effects of LIMK2. Thus the Rac and Cdc42 signalling pathways, acting via PAKs, can function either co-operatively with or antagonistically to Rho/ROCK.

图2 Rho小G蛋白相关激酶在非肌细胞的细胞骨架调节中的作用(根据参考文献[5]修改)

Fig.2 Rho-associated kinases in non-muscle cell cytoskeletal regulation (modified from reference [5])



PAK、ROCK、PKN和MRCK是Rho小G蛋白的下游效应蛋白质。它们具有一些保守的结构域, 这些结构域使其具有了相识的功能。同时也具有不同的结构域, 使其可以结合不同的Rho小G蛋白(这些结构域中, CRIB是Cdc42/Rac相互作用结合基序, KI具有抑制激酶的功能, PIX是PAK相互作用交换基序, RBD是Rho结合结构域, CRD是半胱氨酸富集结构域, PH表示PH结构域, ACC是反向平行螺旋区域, 可与Rho小G蛋白结合, PIF是一种疏水基序, CR是半胱氨酸富集结构域, CH表示香木槲同源结构域)。

PAK, ROCK, PKN and MRCK are downstream effectors of small Rho GTPases. They have some conservative domains, which associate with their similar function. And they also contain some various domain structures through which they can bind to different small Rho GTPases (CRIB: Cdc42/Rac interactive binding motif. KI: kinase inhibition; PIX: PAK-interacting exchange factor; RBD: Rho-binding domain; CRD: cysteine-rich region/domain; PH: PH domain; ACC: anti-parallel coiled-coil; PIF: a hydrophobic motif; CR: cysteine-rich domain; CH: citron homology domain).

图3 PAK、ROCK、PKN和MRCK的结构(根据参考文献[5]修改)

Fig.3 Domain structures of PAK, ROCK, PKN and MRCK (modified from reference [5])

PH/半胱氨酸富集结构域, 它可以激活N-端激酶区域^[27]。由于ROCKII的N-端二聚体结构域对其激酶活性至关重要, 这对其激酶结构域二聚化和反式自身磷酸化必不可少。ROCK的C-端缺失会导致组成型激活^[28](图3)。

1.3.3 PKN PKN又叫PKC依赖激酶(PKC-related kinase, PRK), 具有三个家族成员, 分别是PKN1、PKN2和PKN3。哺乳动物的PKNs既可以与RhoA/B/C相互作用, 也可以与Rac1相互作用^[29]。PKN和PKC催化结构域的结构相似性较大, PKN能有效地磷酸化缩氨酸底物PXS/TXR/K。Rho和PKN1的相互作用有利于PDK1介导的PKN1活化环的磷酸化。PKN1活化环的磷酸化(发生在PKN1的Thr-774残基和PKN2的Thr-816残基)对PKN1的活性是必需的。

PKN的C-端激酶结构域与PKCs的激酶结构域类似, 含有Ser/Thr激酶结构域, N-端含有与Rho相互作用的重复结构域, 例如重复的三个反向平行螺旋(anti-parallel coiled-coil, ACC), 前两个ACC直接参与与Rho的结合, 目前认为, ACC1和ACC2能通过不同的结合模式与RhoA或Rac1结合(图2)。在PKN催化结构域约130个氨基酸的位置, 与PKC的C2结构域

有微弱的相似性, 可能有自动抑制作用, 并对脂质敏感, 例如花生四烯酸^[30]。与其他GTPase相关联的激酶一样, Rho与ACC1/2的相互作用会解除PKN分子内部的自动抑制作用, 进而激活PKN。RhoA竞争性的结合ACC1指状结构域可以脱去PKN的催化结构域^[31]。另外, PKN的ACC结构域能与其他蛋白质相结合, 如锚定蛋白CG-NAPA(centrosome- and Golgi-localized PKN-associated protein)。

1.3.4 MRCK MRCKs是与Cdc42/Rac结合的丝氨酸/苏氨酸激酶, 由MRCKα、MRCKβ和MRCKγ三种亚型组成。MRCKα能结合Cdc42·GTP和Rac·GTP, 其中结合Cdc42·GTP的能力强于对Rac·GTP的结合。它作为Cdc42的受体具有促进细胞骨架重排的能力, 参与肌动蛋白重组和丝状伪足形成(图2)。MRCK的GTPase结合结构域与PAK相似, 但是激酶结构域与Rho的效应蛋白ROCK/CRK(citron kinase)相近。MRCKα具有一个二酰基甘油类似物PMA(benzenetetracarboxylic acid)的结合位点, 可通过其与Cdc42发生相互作用^[32]。

人类的MRCKα基因位于1q42.1, 长度大约是250~300 Kb^[33]。研究表明, MRCKγ基因更简洁, 其

产物具有MRCK α 和MRCK β 的所有特点。在哺乳动物体内, MRCK的表达是普遍的, 在脑中的表达量最高。Ivan等^[34]利用基因组和cDNA序列, 综合分析了人类MRCK α 基因芯片的特点。MRCK α 的CRIB1(外显子36)和CRIB2(外显子37)位于同一个转录单元。在功能上, CRIB1会优先结合Cdc42·GTP, CRIB2可以增强MRCK与Rac·GTP的相互作用。MRCK α 的外显子21~24表达一个可变区, 已经检测到有13种亚型, 位于N-端70个氨基酸残基的保守区是激酶结构域, 该结构域对激酶活性至关重要。延伸到中心的螺旋结构域, 有1个激酶抑制基序(kinase inhibition motif, KIM)^[33]。PH结构域和CH结构域的生物学术功能目前仍不清楚, 这些结构域在其独立表达时, 会抑制MRCK的生物学术活性。不同于ROCK, MRCK活性的调节不包含PH结构域, 而是KIM通过配合和抑制MRCK的催化结构域发挥负向调节功能。MRCK γ 的KIM共表达会抑制MRCK α 和MRCK γ 的活性(图3)。

在Hela和PC12细胞中, MRCK α 参与Cdc42调节的肌动蛋白形成和神经突的生成。另外, MRCK α 可以调节细胞骨架重建, 其机制是通过磷酸化蛋白磷酸酶1(protein phosphatase 1, PP1)和肌球蛋白轻链(MLC2)的肌球蛋白结合亚单位来发挥作用的。MRCK可以调节与细胞突触有关的肌动蛋白活性。MRCK和肌球蛋白II相关的肌球蛋白18A(myosin 18A, MYO18A), 通过接头蛋白LRAP35a(leucine-rich adaptor protein 35a)形成三元复合物。具体的, LRAP35a通过其亮氨酸重复1(leucine Repeat 1, LR1)与MRCK结合, 通过LRAP35a上保守的PDZ-结合基序(PDZ-binding motif)与MYO18A相互结合^[35]。这个三元复合物对薄片肌动蛋白发挥作用。LRAP35a激活MRCK, 通过与MYO18A相互作用而作用于肌动蛋白, 导致薄片RMLC磷酸化和MYO2(myosin 2)依赖的肌动蛋白组装。在LRAP35a激活MRCK过程中, 主要是通过MRCK上的KIM结构域相互作用而激活MRCK。具体作用是这样的, KIM是MRCK分子内的自动抑制结构域, 通过与MRCK上的催化结构域结合来抑制MRCK的活性。LRAP35a与KIM结合导致自动抑制机制解除而使MRCK激活。

MRCK除参与上述的调节外, 还与核转动和微管组织中心(microtubule-organizing center, MTOC)

再定位有关。在迁移的细胞中, MRCK通过F-肌动蛋白逆流(actomyosin retrograde flow)的激活, 从而促进核转动和微管组织中心(microtubule-organizing center, MTOC)再定位。血清中有一种称为溶血磷脂酸(lysophosphatidic acid, LPA)的血清因子。在LPA的刺激下细胞内Cdc42的水平升高。Cdc42刺激下游的MRCK和Par6/PKC两条通路, 第一, MRCK调节肌球蛋白II和F-肌动蛋白流促进核移动, 最终使微管组织中心重新定位; 第二, Par6/PKC与MRCK均可使Dynein/Dynactin在移动的细胞前缘富集, 富集的Dynein/Dynactin使微管组织中心位于细胞中心, 进而使微管组织中心重新定位^[36]。

2 Rho、Cdc42和Rac及其激酶调节肌动蛋白/肌球蛋白II动力学

在多种细胞中, Rho、Cdc42和Rac通过其相关激酶调节具有收缩性的肌动蛋白/肌球蛋白II细丝使细胞迅速的变形。例如, 血管平滑肌细胞通过收缩和舒张控制血流, 而能够刺激血管平滑肌细胞收缩和舒张的生理刺激就包括RhoA/ROCK^[37]。在非肌细胞中, 类似的收缩性部分是由肌动蛋白细丝/肌球蛋白II装配形成的, 在这个过程中需要原肌球蛋白和钙调蛋白等附属蛋白的参与。肌球蛋白磷酸化依赖两种酶的动态平衡: Ca²⁺依赖的调节肌球蛋白轻链激酶(regulatory myosin light chain kinase, R-MLCK)和调节肌球蛋白轻链磷(regulatory myosin light chain phosphatase, R-MLC)。肌动蛋白II的R-MLC的磷酸化导致其与肌动蛋白相互作用, 由此激活肌球蛋白ATPase, 导致细胞收缩性提高。R-MLC磷酸酶由三部分组成: 催化亚单位(protein phosphatase type 1, PP1)、肌球蛋白结合亚基(myosin-binding subunit, MBS)和一个小的非催化亚基。MBS中心区域磷酸化会抑制PP1, 同时增加磷酸化的R-MLC。MBS的N端和C端均可具有结合肌球蛋白的结合位点^[38], C端具有RhoA结合位点。

在体外, ROCK可以磷酸化R-MLC的Ser-19, 相反, 磷酸酶可以抑制R-MLC脱磷酸化。ROCK磷酸化MBS130发生在Thr-697、Ser-854和Thr-855三个氨基酸位点。Thr-855的磷酸化诱导磷酸酶从肌球蛋白上解离下来, 而更重要的是, 在与磷酸酶结合的MBS130的抑制基序中Thr-697的改变会促进MBS130直接结合和抑制PP1。与PAK相似, ROCK可以磷酸化

LIMKs激酶结构域, 如LIMK2的Thr-505, 提高LIMK2磷酸化cofilin的能力。PKN和PAK可以通过一种MBS/PP1抑制剂—蛋白质激酶C抑制剂17(protein kinase C-potentiated inhibitor of 17 kDa, CPI-17), 磷酸化MBS的Thr-38位点并抑制MBS的活性^[39]。肌动蛋白轻链激酶MLCK是一种钙/钙调蛋白(calmodulin)调节的酶, 它受到Ca²⁺的调节后, 可使R-MLC处于活化状态, 磷酸化活化状态的MLC促进F-肌动蛋白组装, 而Rac下游的PAK1对其有负调控作用。位于Cdc42、Rho和Rac下游的MRCK、ROCK、PAK可以磷酸化激活LIMK, 激活的LIMK磷酸化cofilin蛋白N端三个丝氨酸/苏氨酸残基, 抑制其解聚肌动蛋白丝^[40]。

3 Rho小G蛋白效应激酶与细胞周期调控

3.1 PAK与细胞周期调控

PAKs是细胞骨架动力学和细胞运动的重要调节者。另外, PAKs通过MAPK参与转录、细胞凋亡、幸存通路及细胞周期进程^[41]。因此, PAKs在很多病理学调节和细胞形态变化中发挥作用。

细胞中的PAK1定位于中心体、纺锤体和收缩环处, 通过影响细胞周期进程对细胞增殖发挥作用。PAK1参与肿瘤的发生, 在某些癌症, 如乳腺癌、直肠癌、胃癌和卵巢癌细胞中, PAK1的表达均上调。在乳腺癌细胞中, 通过siRNA干扰抑制PAK1的表达能降低cyclinD1的表达量, 说明PAK1有促进细胞增殖的作用^[42]。在成胶质细胞瘤细胞中, PAK1磷酸化与细胞存活时间的降低有关, 敲除PAK1会抑制成胶质细胞瘤的侵袭性^[43]。PAK1的表达会伴随恶性直肠癌肿瘤发生的进程而增加, 敲除PAK1会降低直肠癌的生长速度及其肿瘤体积, 其机制是PAK1下调能延迟细胞周期, 并阻滞细胞周期在G₁期, 从而降低结肠直肠癌(colorectal cancer, CRC)细胞的增殖能力。

PAK1降低结肠直肠癌细胞的增殖能力的具体的机制是这样的, PAK1能调节cyclinD1:Cdk4/Cdk6的表达。细胞从G₀期进入G₁期与cyclinD1:Cdk4/Cdk6的表达和激活有关, cyclinD1:Cdk4/Cdk6在G₁期时磷酸化和钝化视网膜母细胞瘤蛋白(retinoblastoma, Rb)。Rb的磷酸化可与E2F转录因子结合, 这对细胞周期进程及G₁/S转变是必需的。在多种细胞中, JNK(c-Jun N-terminal kinase)通路是细胞增殖和诱导细胞从G₀期进入G₁期的重要通路, 这

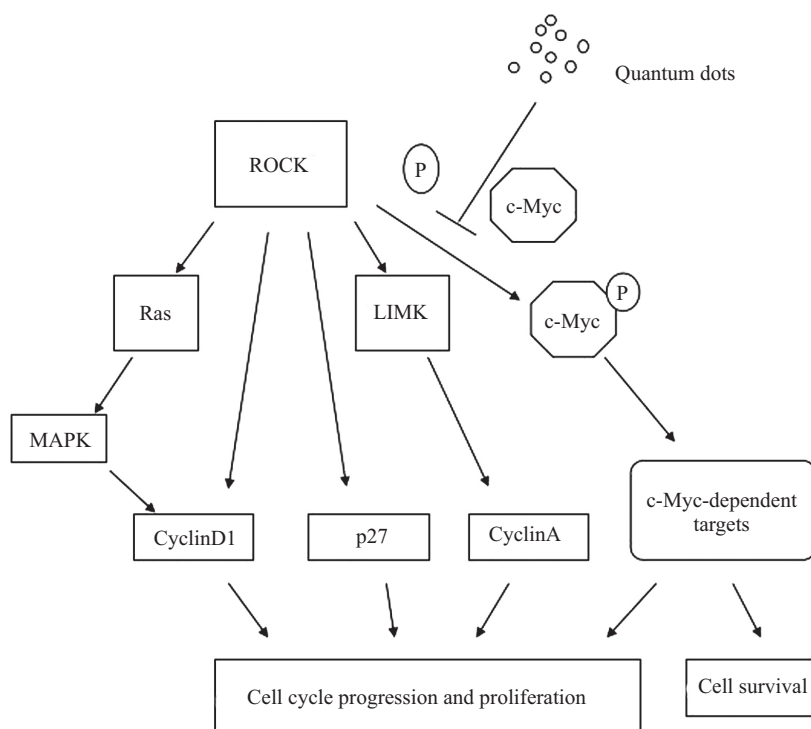
条通路与细胞凋亡关系密切, 它调节cyclinD1/Cdk4的表达。敲除PAK1将使JNK通路受到抑制, 通过降低细胞周期导致G₁期阻滞达到降低癌细胞的增殖的效果。化学抑制剂SP600125可以抑制JNK的活性, 通过PTEN(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10)的积累, 减弱PAK1对结肠直肠癌增殖的影响。PTEN可能会抑制PAK1/JNK调节的细胞增殖和有丝分裂^[44]。

PAK4在细胞凋亡、细胞骨架重排、细胞周期等生物学活动中发挥重要功能, 主要调节诸如: 细胞凋亡调节蛋白(apoptotic regulatory protein, BAD)、细胞骨架效应物蛋白LIMK、Rho GTPase、激活鸟苷酸转换因子-H1(activator guanine nucleotide, GEF-H1)等蛋白质来发挥作用。有研究者在实验中证明, 在裸鼠中过表达激活的PAK4导致癌变, 抑制细胞凋亡, 同时促进细胞增殖, 删除PAK4将产生相反的生物学效应。在HeLa细胞中, PAK4的表达会阻止TNF α 诱导的细胞凋亡^[45]。另有研究发现, PAK5的表达能调节直肠癌细胞的黏附、转移, 促进恶性直肠癌转移^[46]。PAK6是第一个被发现的雄性激素受体(AR)相互作用蛋白质, 在早期前列腺癌细胞和转移性前列腺癌细胞中, PAK6会过量表达^[47]。

近期研究发现, PAK4的ATP竞争性抑制剂PF-3758309能抑制细胞独立锚定生长和增殖, 诱导细胞凋亡和细胞骨架重排。因此, PF-3758309成为一种潜在的治疗人类癌症的药物^[48]。除此之外, 对于第一组PAK来说, 变构抑制剂IPA-3可以抑制PAK1的活性, 一些小分子抑制剂(如CEP-1347、SRC)和酪氨酸激酶(tyrosine kinase, ETK)抑制剂(如AG879、FK228)都能有效地抑制PAK的活性。而对于持续性激活的第2组PAK来说, 还没能找到其有效的抑制剂^[49]。

3.2 ROCK与细胞周期调控

ROCKs与众多的疾病发生有关, 如心血管疾病、神经系统紊乱、癌症以及糖尿病并发症等。在许多肿瘤细胞中, RhoA和RhoC蛋白的表达量较高; 在某些癌细胞中, 如食道鳞状上皮细胞癌、睾丸生殖细胞癌和膀胱癌等, RhoA和RhoC表达量的上升增加了ROCKI和(或)ROCKII的表达量水平。而Rho和ROCK表达量的增加有利于癌细胞的转移, 促进癌细胞的增殖^[50]。有研究表明, 在Swiss3T3细胞中, 高水平的RhoA诱导G₁/S期进程。在NIH3T3细胞中, 激活的ROCK-雌激素受体蛋白(ROCK-estrogen



ROCK通过不同的信号通路调节细胞周期进程、细胞增殖和细胞存活。ROCK激活Ras和MAPK, 提高cyclinD1的表达。ROCK激活LIMK2, 提高cyclinA的表达。另外, ROCK的激活可使p27蛋白质水平降低。ODs通过抑制ROCK的活性降低c-Myc蛋白的稳定性, 提高对c-Myc蛋白的磷酸化抑制, 从而影响细胞周期进程和细胞增殖。

ROCK can regulate cell cycle progression, proliferation and cell survival through different signaling pathways. ROCK activates Ras and MAPK, which along with an additional independent pathway, leading to elevation of cyclinD1 expression. CyclinA is independently elevated in response to ROCK activation via LIMK2. Reduced p27 protein levels were observed following ROCK activation, independent of the effect on cyclinD1, cyclinA. ODs can reduce c-Myc protein stability through inhibiting ROCK activity and impose inhibition on the phosphorylation of c-Myc that takes the principle responsibility for cell cycle progression and proliferation.

图4 ROCK和细胞周期调控(根据参考文献[52-53]修改)

Fig.4 ROCK and cell cycle regulation (modified from references [52-53])

receptor, ROCK-ER)可刺激G₁/S细胞周期进程。来自海蜗牛的Rho可使NIH3T3细胞癌化转变^[51]。另外, ROCK通过Ras和MAPK的激活来提高cyclinD1和p21的表达水平, 通过LIMK提高cyclinA的表达水平, 也可以降低p27的表达水平^[52]。ROCK还可以通过调节致癌基因c-Myc活性来调节癌细胞周期^[53]。因此, ROCK能通过多种机制调节细胞周期和控制肿瘤生长。

在众多癌细胞中, Rho/ROCK的激活和ROCK的过量表达会提高癌细胞的侵袭和转移。因此, 抑制ROCK的活性可以抑制癌细胞的转移和增殖。寻找ROCK的抑制剂, 对其进行抑制成为了治疗这些疾病的新方向。目前研究发现, 量子点(Quantum dots, QDs)通过阻碍癌基因c-Myc对细胞增殖的作用, 达到抑制肿瘤细胞生长, 但其不会使细胞死亡。而且, QD通过抑制ROCK活性, 降低c-Myc蛋白的稳定性, 并减弱c-Myc激活其靶基因的能力^[53]

(图4)。Nakabayashi等^[54]发现, Fasudil通过Rho-ROCK和促分裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶(mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase, MEK/ERK)信号通路抑制神经胶质瘤诱导的血管再生, 使Fasudil成为一种治疗神经胶质瘤的潜在药物。另外有研究表明, Fasudil可阻止小细胞肺癌细胞NCIH446的增殖和转移^[55]。除此之外, 近年来研究者还发现了很多的ROCKs抑制剂, 如Y-27632, 它是一种通过与ATP竞争ROCKI和ROCKII的催化位点的非特异抑制剂, 可以抑制血管平滑肌的收缩^[56]。还有一些吡啶类(如SR-1459、SR-899)和吡啶类的抑制剂也正在进行研发^[57]。

3.3 MRCK与细胞周期调控

有研究表明, MRCK参与癌细胞侵袭。细胞侵袭所需的肌动蛋白收缩力的产生依赖于Cdc42-MRCK信号^[58]。另外, 在间叶细胞侵袭过程中, ROCK和MRCK单独或协同参与调节过程, 并且

ROCK和MRCK能单独或协同促进癌细胞的侵袭。因此,单独抑制ROCK和MRCK或同时抑制ROCK和MRCK均能抑制癌细胞的侵袭,有数据显示,同时抑制ROCK和MRCK对抑制癌细胞侵袭的效果更好。经筛选发现,有3种抑制剂(Y-27632、Fasudil、TPCA-1)对MRCK α 和MRCK β 的抑制效果显著。Y-27632和Fasudil同时也是ROCK抑制剂^[59]。因此,对MRCK参与癌细胞侵袭过程的研究,有望成为开发治疗癌症新药的一个研究方向。

4 问题与展望

目前,对于Rho小G蛋白下游激酶(PAKs、ROCKs、PKNs和MRCKs)的研究多集中在这些激酶的结构、基于保守结构域而发挥的功能(如细胞骨架重排、细胞移动、细胞周期和增殖等方面)以及Rho小G蛋白下游激酶抑制剂开发等方面。

通过前文介绍,这些激酶在其结构上既有相似性也有差异性,而这些结构上的相似性和差异性决定了其功能上的相似性和差异性。例如,ROCK和MRCK在其N-端激酶结构域内有45%~50%的相似性,而在其C-端则有很大的差异性。这些激酶的不同亚型具有更高的相似度,例如ROCKI和ROCKII的激酶结构域相似性高达92%,MRCK α 和MRCK β 在其激酶结构域的相似性达77%。这些激酶结构域的相似性保证其能与相同或相似的底物发生作用,从而使其有相同或相似的生物学作用,例如ROCK、MRCK具有相同的磷酸化底物,而肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)和肌球蛋白磷酸酶的肌球蛋白结合亚基^[60](myosin-binding subunit of myosin phosphatase, MYPT1)均可在形成F-肌动蛋白丝参与细胞骨架重排过程中发挥作用。这些激酶的差异性也使其各自具有多样化的功能,例如MRCK α 还能通过调节转铁蛋白受体,胞吞/胞内体交换(依赖于细胞骨架)参与转铁蛋白的吸收。同时,MRCK α 活性受细胞内铁水平的调节,形成一种分子反馈调节机制^[61]。

对于Rho小G蛋白及其效应蛋白质在细胞骨架重排方面作用的研究已经相当深入,近年来的研究热点转向于Rho小G蛋白及其效应蛋白质在癌症的发生和发展过程中的作用。癌细胞的形成、扩散及侵袭涉及细胞骨架动力学、细胞周期进程、细胞逃逸等生理学过程,Rho小G蛋白及其效应蛋白质在癌细胞周期进程中的作用日益凸显,尤其是Rho小G蛋

白效应激酶分子大多是原癌基因,激酶分子的敲除和抑制能有效地抑制癌细胞的增殖和转移。因此,筛选激酶分子抑制剂有重要的理论和临床意义。研究证明,PAK4抑制剂PF-3758309能抑制细胞独立锚定生长和增殖,诱导细胞凋亡和细胞骨架重排;化学抑制剂SP600125可以间接减弱PAK1对结肠直肠癌增殖的影响;Fasudil、Y-27632、Quantum dots等ROCK抑制剂可以通过抑制ROCK的作用而抑制制肿瘤细胞生长;联合使用Fasudil和Y-27632可以同时抑制ROCK和MRCK,进而增强对癌细胞侵袭的抑制作用。

效应激酶是Rho小G蛋白发挥作用不可缺少的组分,对其深入的研究是阐明Rho小G蛋白信号通路的重要途径,前人对于PAK、ROCK激酶的研究已经比较深入,但是对于MRCK的研究仍不完善,例如MRCK在细胞周期调控中的具体信号通路、MRCK在不同癌症发生发展过程中的作用以及MRCK抑制剂的筛选与研发都是亟待解决的科学问题。

参考文献 (References)

- 1 Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: Biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; 21: 247-69.
- 2 范丽菲, 闫慧娟, 莫日根. Rho小G蛋白介导的细胞周期调控. *中国生物化学与分子生物学报*(Fan Lifei, Yan Huijuan, Morigen. The roles of small Rho GTPases in cell cycle regulation. *Chin J Biochem Mol Biol*) 2013; 29(7): 619-28.
- 3 Ridley AJ. Rho family proteins: Coordinating cell responses. *Trends Cell Biol* 2001; 11(12): 471-77.
- 4 Coleman ML, Marshall CJ, Olson MF. RAS and RHO GTPases in G₁-phase cell-cycle regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5(5): 355-66.
- 5 Zhao ZS, Manser E. PAK and other Rho-associated kinases-effectors with surprisingly diverse mechanisms of regulation. *Biochem J* 2005; 386(Pt 2): 201-14.
- 6 Bishop A, Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 2000; 348(2): 241-55.
- 7 Flynn P, Mellor H, Palmer R, Panayotou G, Parker PJ. Multiple Interactions of PRK1 with RhoA functional assignment of the HR1. *J Biol Chem* 1998; 273(5): 2698-705.
- 8 Maesaki R, Ihara K, Shimizu T, Kuroda S, Kaibuchi K, Hakoshima T. The structural basis of Rho effector recognition revealed by the crystal structure of human RhoA complexed with the effector domain of PKN/PRK1. *Mol Cell* 1999; 4(5): 793-803.
- 9 Molli PR, Li DQ, Murray B, Rayala SK, Kumar R. PAK signaling in oncogenesis. *Oncogene* 2009; 28(28): 2545-55.
- 10 Manser E, Chong C, Zhao ZS, Leung T, Michael G, Hall C, *et al.* Molecular cloning of a new member of the p21-Cdc42/Rac-activated kinase (PAK) family. *J Biol Chem* 1995; 270(42): 25070-8.

- 11 Bagrodia S, Taylor SJ, Creasy CL, Chernoff J, Cerione RA. Identification of a mouse p21Cdc42/Rac activated kinase. *J Biol Chem* 1995; 270(39): 22731-37.
- 12 Bagheri-Yarmand R, Mazumdar A, Sahin AA, Kumar R. LIM kinase 1 increases tumor metastasis of human breast cancer cells via regulation of the urokinase-type plasminogen activator system. *Int J Cancer* 2006; 118(11): 2703-10.
- 13 Davila M, Frost AR, Grizzle WE, Chakrabarti R. LIM kinase 1 is essential for the invasive growth of prostate epithelial cells. *J Biol Chem* 2003; 278(38): 36868-75.
- 14 Yoshioka K, Foletta V, Bernard O, Itoh K. A role for LIM kinase in cancer invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(12): 7247-52.
- 15 Edwards DC, Sanders LC, Bokoch GM, Gill GN. Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol* 1999; 1(5): 253-9.
- 16 Knaus UG, Wang Y, Reilly AM, Warnock D, Jackson JH. Structural requirements for PAK activation by Rac GTPases. *J Biol Chem* 1998; 273(34): 21512-8.
- 17 Manser E, Loo TH, Koh CG, Zhao ZS, Chen XQ, Tan L, *et al.* PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors. *Mol Cell* 1998; 1(2): 183-92.
- 18 Chong C, Tan L, Lim L, Manser E. The mechanism of PAK activation autophosphorylation events in both regulatory and kinase domains control activity. *J Biol Chem* 2001; 276(20): 17347-53.
- 19 Satoh K, Fukumoto Y, Shimokawa H. Rho-kinase: Important new therapeutic target in cardiovascular diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 301(2): H287-H296.
- 20 Tan HB, Zhong YS, Cheng Y, Shen X. Rho/ROCK pathway and neural regeneration: A potential therapeutic target for central nervous system and optic nerve damage. *Int J Ophthalmol* 2011; 4(6): 652.
- 21 Shahin R, Al-Qtaishat S, Taha MO. Elaborate ligand-based modeling reveal new submicromolar Rho kinase inhibitors. *J Comput Aided Mol Des* 2012; 26(2): 249-66.
- 22 Mueller BK, Mack H, Teusch N. Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4(5): 387-98.
- 23 Spiering D, Hodgson L. Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adh Migr* 2011; 5(2): 170-80.
- 24 Kosako H, Amano M, Yanagida M, Tanabe K, Nishi Y, Kaibuchi K, *et al.* Phosphorylation of glial fibrillary acidic protein at the same sites by cleavage furrow kinase and Rho-associated kinase. *J Biol Chem* 1997; 272(16): 10333-6.
- 25 Ishizaki T, Maekawa M, Fujisawa K, Okawa K, Iwamatsu A, Fujita A, *et al.* The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *EMBO J* 1996; 15(8): 1885.
- 26 Dvorsky R, Blumenstein L, Vetter IR, Ahmadian MR. Structural insights into the interaction of ROCKI with the switch regions of RhoA. *J Biol Chem* 2004; 279(8): 7098-104.
- 27 Chen XQ, Tan I, Ng CH, Hall C, Lim L, Leung T. Characterization of RhoA-binding kinase ROKalpha: Implication of the pleckstrin homology domain in ROKalpha function using region-specific antibodies. *J Biol Chem* 2002; 277: 12680-8.
- 28 Sebbagh M, Renvoize C, Hamelin J, Riché N, Bertoglio J, Bréard J. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol* 2001; 3(4): 346-52.
- 29 Mukai H. The structure and function of PKN, a protein kinase having a catalytic domain homologous to that of PKC. *J Biochem* 2003; 133(1): 17-27.
- 30 Flynn P, Mellor H, Casamassima A, Parker PJ. Rho GTPase control of protein kinase C-related protein kinase activation by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2000; 275(15): 11064-70.
- 31 Kitagawa M, Shibata H, Toshimori M, Mukai H, Ono Y. The role of the unique motifs in the amino-terminal region of PKN on its enzymatic activity. *J Biochem* 1996; 220(3): 963-8.
- 32 Leung T, Chen XQ, Tan I, Manser E, Lim L. Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal reorganization. *Mol Cell Biol* 1998; 18(1): 130-40.
- 33 Moncrieff CL, Bailey ME, Morrison N, Johnson KJ. Cloning and chromosomal localization of human Cdc42-binding protein kinase beta. *Genomics* 1999; 57: 297-300.
- 34 Tan I, Cheong A, Lim L, Leung T. Genomic organization of human myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase alpha reveals multiple alternative splicing and functional diversity. *Gene* 2003; 304: 107-15.
- 35 Tan I, Yong J, Dong JM, Lim L, Leung T. A tripartite complex containing MRCK modulates lamellar actomyosin retrograde flow. *Cell* 2008; 135(1): 123-36. (除提示外的页码重新修改过)
- 36 Gomes ER, Jani S, Gundersen G. Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. *Cell* 2005; 121(3): 451-63.
- 37 Sakurada S, Okamoto H, Takuwa N, Sugimoto N, Takuwa Y. Rho activation in excitatory agonist-stimulated vascular smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281(2): C571-C578.
- 38 Hartshorne DJ, Ito M, Erdo F. Myosin light chain phosphatase: Subunit composition, interactions and regulation. *J Muscle Res Cell Motil* 1998; 19(4): 325-41.
- 39 Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non - muscle myosin II. *J Physiol* 2000; 522(2): 177-85.
- 40 Stanyon CA, Bernard O. LIM-kinase 1. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31: 389-94.
- 41 Bokoch GM. Biology of the p21-activated kinases. *Ann Rev Biochem* 2003; 72(1): 743-81.
- 42 Balasenthil S, Sahin AA, Barnes CJ, Wang RA, Pestell RG, Vadlamudi RK, *et al.* p21-activated kinase-1 signaling mediates cyclin D1 expression in mammary epithelial and cancer cells. *J Biol Chem* 2004; 279(2): 1422-8.
- 43 Aoki H, Yokoyama T, Fujiwara K, Tari AM, Sawaya R, Suki D, *et al.* Phosphorylated Pak1 level in the cytoplasm correlates with shorter survival time in patients with glioblastoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13(22): 6603-9.
- 44 Qing H, Gong W, Che Y, Wang X, Peng L, Liang Y, *et al.* PAK1-dependent MAPK pathway activation is required for colorectal cancer cell proliferation. *Tumor Biol* 2012; 33(4): 985-94.
- 45 Ye DZ, Field J. PAK signaling in cancer. *Cell Logist* 2012; 2(2): 105-16.
- 46 Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgleish GL, Hunter

- C, Bignell G. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 2007; 446(7132): 153-8.
- 47 Yang F, Li X, Sharma M, Zarnegar M, Lim B, Sun Z. Androgen receptor specifically interacts with a novel p21-activated kinase, PAK6. *J Biol Chem* 2001; 276(18): 15345-53.
- 48 Murray B W, Guo C, Piraino J, Westwick JK, Zhang C, Lamerdin J, *et al.* Small-molecule p21-activated kinase inhibitor PF-3758309 is a potent inhibitor of oncogenic signaling and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(20): 9446-51.
- 49 Molli PR, Li DQ, Murray BW, Rayala SK, Kumar R. PAK signaling in oncogenesis. *Oncogene* 2009; 28(28): 2545-55.
- 50 Schofield AV, Bernard O. Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) signaling and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2013; 48(4): 301-16.
- 51 Perona R, Esteve P, Jiménez B, Ballester RP, Ramóns Cajal S, Lacal JC. Tumorigenic activity of rho genes from *Aplysia californica*. *Oncogene* 1993; 8: 1285-92.
- 52 Croft DR, Olson MF. The Rho GTPase effector ROCK regulates cyclin A, cyclin D1, and p27Kip1 levels by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* 2006; 26(12): 4612-27.
- 53 Chen L, Qu G, Zhang C, Zhang S, He J, Sang N, *et al.* Quantum dots (QDs) restrain human cervical carcinoma HeLa cell proliferation through inhibition of the ROCK-c-Myc signaling. *Integr Biol* 2013; 5(3): 590-6.
- 54 Nakabayashi H, Shimizu K. HA1077, a Rho kinase inhibitor, suppresses glioma-induced angiogenesis by targeting the Rho-ROCK and the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MEK/ERK) signal pathways. *Cancer Sci* 2011; 102(2): 393-9.
- 55 Yang X, Di J, Zhang Y, Zhang S, Lu J, Liu J. The Rho-kinase inhibitor inhibits proliferation and metastasis of small cell lung cancer. *Biomed Pharmacother* 2012; 66(3): 221-7.
- 56 Dong M, Liao J K, Yan B, Li R, Zhang M, Yu CM. A combination of increased Rho kinase activity and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide predicts worse cardiovascular outcome in patients with acute coronary syndrome. *Int J Cardiol* 2012; 167(6): 2813-9.
- 57 Guan R, Xu X, Chen M, Hu H, Ge H, Wen S, *et al.* Advances in the studies of roles of Rho/Rho-kinase in diseases and the development of its inhibitors. *Eur J Med Chem* 2013; 70: 613-22.
- 58 Wilkinson S, Paterson H F, Marshall CJ. Cdc42-MRCK and Rho-ROCK signalling cooperate in myosin phosphorylation and cell invasion. *Nat Cell Biol* 2005; 7(3): 255-61.
- 59 Heikkilä T, Wheatley E, Crighton D, Schroder E, Boakes A, Kaye SJ, *et al.* Co-crystal structures of inhibitors with MRCK β , a key regulator of tumor cell invasion. *PLoS One* 2011; 6(9): e248252.
- 60 Tan I, Ng CH, Lim L, Leung T. Phosphorylation of a novel myosin binding subunit of protein phosphatase 1 reveals a conserved mechanism in the regulation of actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 2001; 276(24): 21209-16.
- 61 Cmejla R1, Ptackova P, Petrak J, Savvulidi F, Cerny J, Sebesta O. Human MRCKa is regulated by cellular iron levels and interferes with transferrin iron uptake. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 395(2): 163-7.