



姚雪彪博士、教授、博士生导师,教育部“长江计划”特聘教授,细胞动力学与化学生物学安徽省重点实验室主任,美国细胞生物物理学会国际事务部主任。1995年毕业于美国加利福尼亚大学伯克莱分校并获细胞分子生物学博士学位,1995年获“Bank of America-Gianni Scholar Award”,1997年被聘为美国威斯康星大学医学院助理教授,1999年获“American Cancer Society Scholar Award”,2004年获“Georgia Cancer Coalition Eminent Scholar Award”。“国家自然科学基金杰出青年基金”获得者。作为项目首席科学家主持了973项目“调控细胞增殖重要蛋白质作用网络的研究”(2002~2008)、科技部重点研发项目“着丝粒蛋白质机器调控细胞命运抉择的分子机制”(2017~2022)、基金委创新研究群体项目“着丝粒动态组装与调控”(2017~2022)。担任国际期刊*J Biol Chem*、*Cell Research*编委,*J Mol Cell Biol*、*BMC Cell Biol*副主编。姚雪彪教授主要从事细胞有丝分裂动力学调控机制方面的研究,已在*Nature*、*Nat Rev Mol Cell Biol*、*Cancer Cell*、*Gastroenterology*、*Ann Rev in Physiol*、*Nat Chem Biol*、*Nat Cell Biol*、*PNAS*等国际学术期刊上发表学术论文100余篇,被他引6200次以上。姚雪彪教授已经培养了70名博士毕业生,其中包括6名中组部“青年千人”获得者、1名“吴瑞奖学金”获得者、1名“青年长江学者”获得者、4名“中科院优秀博士论文”获得者和教育部“百篇优秀博士论文提名奖”获得者。

http://dsxt.ustc.edu.cn/zj_js.asp?zzid=54

纺锤体可塑性与动力学调控

刘行 刘旭 姚雪彪*

(中国科学技术大学,安徽省细胞动力学与化学生物学重点实验室,合肥 230026)

摘要 细胞精确的自我复制依赖纺锤体的可塑性和精准调控。功能纺锤体的形成取决于着丝粒动力学、纺锤体微管和星状微管可塑性的时空动态调控。纺锤体的可塑性研究在过去的三十年间取得了迅猛的发展,生物化学研究发现并鉴定了大量的纺锤体蛋白与翻译后修饰,结构生物学研究解析和阐明了部分关键蛋白的结构和作用机制。如何解析纺锤体高级结构的变化与其对应的生物学意义,并把纺锤体的动态表观标示转化为三维类器官干细胞增殖的质量控制标准将是下一阶段纺锤体可塑性与调控研究的重要科学问题。该文将简介纺锤体可塑性与动力学研究进展及研究前景。

关键词 细胞有丝分裂;纺锤体;化学生物学;类器官;干细胞动力学

Regulation of Spindle Plasticity and Dynamics

Liu Xing, Liu Xu, Yao Xuebiao*

(Anhui Key Laboratory for Cellular Dynamics and Chemical Biology, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

科技部重点研发计划(批准号: 2017YFA0503600、2016YFA0100500)、国家自然科学基金(批准号: 31621002、31320103904)和中国科学院战略性先导科技专项(B类)(批准号: XDB19040100)资助的课题

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

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2017YFA0503600, 2016YFA0100500), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31621002, 31320103904), and ‘Strategic Priority Research Program’ of the Chinese Academy of Sciences (Grant No.XDB19040100)

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

网络出版时间: 2019-04-02 13:30:19

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190402.1330.012.html>

Abstract Accurate chromosome segregation depends on the spatiotemporal orchestration of centromere assembly, spindle and astral microtubule plasticity. The spindle plasticity control and regulation have been exciting subjects for intensive cross-disciplinary research over the last three decades. Biochemical characterization has identified a diversified spectrum of post-translational modifications while structure studies have determined the atomic determinants functional activity. However, it has remained elusive as to the relationship between dynamics of biomolecular conformation and functional activity in space and time. In addition, it is poorly illustrated as whether regulatory mechanisms underlying two dimensional control of mitotic spindle plasticity can be translated into the molecular delineation of cell cycle regulation in three dimensional cultures such as organoids. This article summarizes the progresses and perspectives of spindle plasticity and molecular dynamics.

Keywords mitosis; spindle; chemical biology; organoids; stem cell dynamics

细胞精确的自我复制是其生活史的重要组成部分,复制的高保真性在生物及物种的繁衍生息过程中举足轻重。在细胞有丝分裂过程中,包含在染色体中的父代遗传信息在经历诸多复杂的运动后,均匀地准确无误地传递给两个子细胞。这一过程是通过纺锤体调控染色体的系列运动及其与细胞皮层的有机结合而完成。因此,纺锤体在细胞周期中的动态组装和有序解聚(又称可塑性)是细胞健康的保证;其结构组装异常导致染色体丢失,从而使细胞生长失控^[1-2]。

微管作为细胞骨架的重要组成部分,参与了细胞形态的建立和维持、细胞运动、胞内物质运输以及细胞纤毛的形成与功能调控等重要的细胞生命活动。纺锤体是细胞有丝分裂的调控中心,承载姐妹染色单体的均等分配、有丝分裂的质量控制及子细胞命运可塑性的设置和程序化。

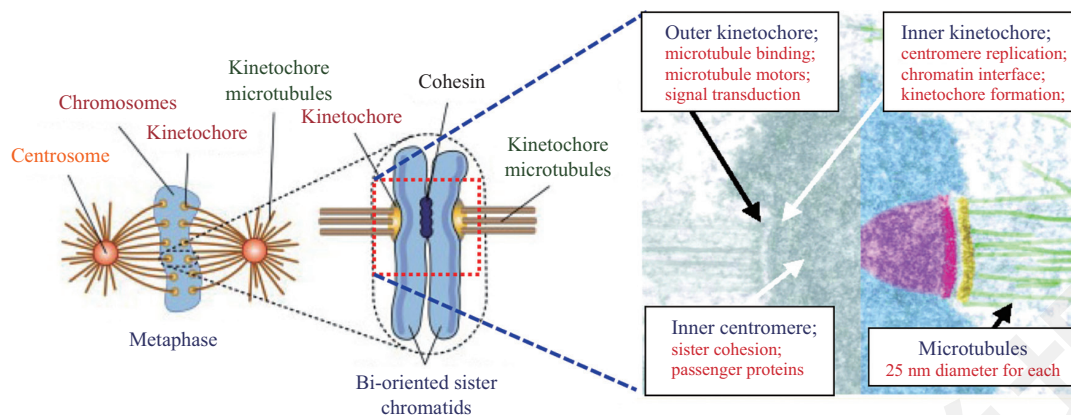
1 纺锤体微管正端与着丝粒衔接的可塑性

着丝粒是纺锤体的重要构架组分,负责纺锤体微管与异染色质核小体多组分蛋白质机器CCAN(constitutive centromere-associated network)的结合,调控父代遗传信息在有丝分裂过程中的准确传递。着丝粒通过一系列高复杂度蛋白质机器与微管正端有机结合,调控染色体运动与姐妹染色单体分离的时空动态性(图1)。但是,人类细胞着丝粒的详尽分子构成、着丝粒区域的核小体特征及着丝粒组装蛋白识别的结构基础仍是制约着丝粒与纺锤体可塑性功能解析的主要瓶颈。

中国科学技术大学着丝粒可塑性协作组^[3-5]利用生物信息学、功能蛋白质组学、生物化学与细胞生物学功能鉴定系统解析了人类细胞着丝粒的

构成、翻译后修饰及动态作用网络。利用分子生物物理学技术,他们解析了着丝粒区域的类核小体组分CENP-S/X(MHF1/2)复合物的晶体结构^[6]。该结构分析和生化数据表明,CENP-S/X都呈现出经典的组蛋白折叠(histone fold)结构,MHF1和MHF2形成1:1的异源四聚体,四聚体的结构与组蛋白(H3-H4)₂结构非常相似。这部分工作与国际同行的工作同步^[7],为着丝粒可塑性研究打下了良好的基础。他们的后续工作揭示,有丝分裂蛋白激酶通过磷酸化调控CENP-A(centromere protein-A)伴侣蛋白HJURP(holliday junction recognition protein)的定位,从而决定CENP-A组装的时空动态性^[8],Aurora B蛋白激酶通过磷酸化调控CENP-C功能^[9],HJURP调控CENP-T蛋白上传着丝粒的时空动力学机制^[10]。中国科学院生物物理研究所许瑞明与李国红团队^[11-12]利用分子生物物理学与生物化学技术解析了磷酸化HJURP调控CENP-A核小体上传着丝粒的时空动力学机制。此外,他们揭示了着丝粒蛋白CENP-N识别CENP-A核小体的可能机制^[13]。利用冷冻电镜单颗粒分析技术,中国科学技术大学臧建业课题组与合作伙伴^[14]解析了着丝粒蛋白CENP-N/L蛋白质机器识别CENP-A核小体的结构基础。这部分工作与国际同行的工作基本同步^[15-16],为着丝粒蛋白质机器的连接图谱与体外全组装研究打下了良好的基础。

中国科学技术大学细胞动力学实验室利用功能蛋白质组学技术鉴定了一系列新动粒功能蛋白及其作用网络,其中包括TTK/Mps1^[19]、NEK2^[20]、Zwint1^[17]、TIP60^[21-23]、TIP150^[24]、DDA3^[25]、SKAP^[26-27]及LRIF1^[28]等。它们的功能实验揭示,DDA3、SKAP与TIP150均为依赖于EB1的微管正端追踪蛋白,在有丝分裂染色体的精准排列过程中起



正常的纺锤体含着丝粒微管、星体微管、着丝粒与染色体。人类细胞染色体的着丝粒与30~50根微管结合, 动态的着丝粒-纺锤体微管作用决定染色体的可塑性与细胞命运。着丝粒的结构与功能在真核细胞进化过程中非常保守^[1-2]。虽然模式体系如酵母为研究有丝分裂纺锤体与着丝粒组装提供了诸多便利, 但是我们至今对着丝粒高级结构变化的基础与其对应的生物学意义了解甚少。值得一提的是, 一系列研究提示, 后生代细胞着丝粒进化, 形成了一套新的染色体稳定性维系生化通路, 其中包括ZW10、BubR1、CENP-E、SKAP、TIP150等^[17-18]。

The mitotic spindle is composed of spindle microtubules, astral microtubules, chromosomes and centromere. In human cells, each centromere contains 30-50 spindle microtubules and dynamic interaction between centromere and spindle microtubule determines the chromosome plasticity and cell fate^[1-2]. Although model systems such as yeasts provide powerful model for genetic dissection of spindle and centromere assembly, it has remained unknown as to the relationship between dynamics of biomolecular conformation and functional activity in space and time. Interestingly, research over the last decade points to notion that metazoan has evolved an elaborated biochemical pathways which contains ZW10, BubR1, CENP-E, SKAP, TIP150, to guard the chromosome stability in mitosis^[17-18].

图1 纺锤体及其组成示意图

Fig.1 Schematic drawing of spindle assembly

重要作用^[27,29-30]。TIP60是细胞周期主控激酶Cdk1的生理学底物, Cdk1-TIP60信号轴在着丝粒形成与可塑性调控中起重要作用^[31-34]。该工作迅速触发了一系列TIP60新底物与新机制的发现^[33-35]。

国际同行在新动粒功能蛋白与新机制亦作出了非常出色的进展, 其中包括发现了新动粒功能蛋白Bora^[36-37]、SKAP^[38-39]、Spindly及RZZ^[40-42]。国际同行研究的特点是聚焦于着丝粒/动粒与纺锤体微管界面的细节及其识别的结构基础^[43]。

着丝粒可塑性研究在过去的30年间取得了迅猛的发展, 生物化学研究发现并鉴定了大量的着丝粒蛋白及修饰, 结构生物学研究解析和阐明了部分关键蛋白的结构和作用机制。然而一系列的挑战仍然存在, 例如, 如何找到新的、具有功能性基础的着丝粒组装调控因子, 从而为着丝粒动力学研究提供新的生长点? 如何解析着丝粒高级结构的变化与其对应的生物学意义等问题。

2 星状微管正端与细胞皮层结合机制

有丝分裂中染色体的精确分离依赖于双极纺锤体的形成以及染色体沿纺锤体微管定向迁移。染色体通过其着丝粒外侧的超分子复合物“动点”寻

找并捕获纺锤体微管^[1,44-45]。纺锤体的位置和方向决定于来自细胞外环境中的应力以及细胞内部的机械力传递^[46]。在动物组织中, GPI锚定域连接到细胞膜的Gai, 它们共同决定了Pins/LGN的顶膜定位, 而Pins/LGN可以结合NuMA, NuMA招募dynein-dynactin复合体, 进而将星体微管与细胞膜皮层有机联系起来, 以感受细胞外微环境的调控。北京大学张传茂团队^[47-49]在Ran信号通路调控纺锤体功能方面做出了一系列原创性工作。他们的系统工作解析了在星体微管牵拉下, Ran信号通路是如何调控纺锤体得以正确定位和定向的, 以及LaminA/C-LAP2-BAF1信号轴在有丝分裂中是如何调控纺锤体的取向与可塑性的^[50]。值得一提的是, 他们的工作解析了TpX2-Ran信号通路调控纺锤体正确定向与纺锤体长度及细胞大小的关联机制^[51], 为阐明细胞大小调控的分子机制提供了新的视角。以中心体蛋白Cep57为模式分子, 北京大学陈建国团队^[52]系统地解析了其在中心粒黏连、双极纺锤体完整性及纺锤体检验点动态性的环境依赖性调控机制^[53-54], 为阐明中心体Cep57时空动力学特征提供新的依据与视角。

值得一提的是, 中国科学院上海生命科学研究院朱学良课题组^[55]发现了Nudel蛋白的环境依赖性

功能作用: 当Nudel单独与dynein结合时, Nudel激活dynein的马达蛋白活性; 但当Nudel与dynein及mitosin同时结合时, Nudel稳定dynein在着丝粒的定位。朱学良课题组与美国Zheng Yixian课题组^[56]合作发现了锌指蛋白BuGZ的微管结合活性, 他们新近研究提示, BuGZ具有较强的相变能力, 并在微管表面形成液滴状稳态结构^[57], BuGZ调节纺锤体基质的组装及其与质膜的动态结合。为此, BuGZ相变活性的揭示与研究将为纺锤体可塑性及其动力学特征的解析提供新的视角。

此外, 浙江大学周天华课题组^[58]解析了NudCL2与dynein的互作机制及其调控纺锤体的功能。围绕纺锤体定向调控机制, 南开大学周军课题组^[59]进行了一系列探索, 他们解析了CYLD蛋白通过稳定微管与dynein/NuMA复合体来调节纺锤体定向与可塑性的分子机制。

国际同行在纺锤体定向与细胞外微环境的关联做出了一系列创意的工作, 其中包括美国麻省理工学院的Cheeseman课题组^[60-61], 他们发现, PLK1-NuMA-LGN及dynein马达蛋白调控网络的作用英国Baum课题组^[62]揭示了蛋白磷酸酶在纺锤体定向及有丝分裂中期-后期转变过程中的切换作用。近年来, 德国马普研究所的Hyman研究组^[63]与英国Raff研究组^[64]报道了蛋白质相变在中心体形成与纺锤体可塑性调控中的作用。新的纺锤体调控蛋白的发现与大量着丝粒与微管调控蛋白修饰谱的解析推动了纺锤体可塑性研究。目前的主要科学问题是如何解析微管调控蛋白的动态结构变化与其对应的生物学意义。

3 纺锤体可塑性与翻译后修饰

参与微管调控和行使功能的蛋白包括微管结合蛋白、马达蛋白以及微管正端示踪蛋白。微管正端示踪蛋白是一类特殊的微管结合蛋白, 它们特异地定位于微管正端, 目前已知的微管正端示踪蛋白多达22种^[65]。中国科学技术大学着丝粒可塑性协作组^[30,66]利用功能蛋白质组学、生物化学与细胞生物学功能鉴定系统解析了人类细胞EB1的翻译后修饰谱, 他们发现, EB1第220位赖氨酸乙酰化修饰导致EB1无法结合其他微管正端示踪蛋白的分子机理。同时, 他们发现, K220乙酰化修饰水平在细胞有丝分裂期明显升高, 但是如果人为干扰抑制去乙酰化

会激活有丝分裂检验点, 导致中期延滞, 提示该乙酰化修饰与有丝分裂期动点-微管连接的纠错机制相关。山东师范大学刘敏课题组^[67]解析了一些新的EB1乙酰化位点, 他们的研究结果提示, 第212位赖氨酸乙酰化参与调控纺锤体可塑性。南开大学周军课题组^[68]解析了ASK1通过磷酸化EB1 Linker区来调控纺锤体正确定向的分子机制。

TIP60是一个调控真核细胞基因组稳定性的重要的乙酰转移酶, 但其是如何维系真核细胞有丝分裂染色体稳定性的尚不清楚。中国科学技术大学着丝粒可塑性协作组^[22]成功地揭示了一个调控真核细胞染色体稳定性的Cdk1-TIP60-Aurora B信号轴, 并详尽地阐明了蛋白质磷酸化与乙酰化修饰动态调控Aurora B激酶活性的新机制。这项研究阐明了细胞有丝分裂主控激酶Cdk1通过周期性地磷酸化TIP60, 提高TIP60在有丝分裂前中期的乙酰转移酶活性, 促进Aurora B激酶对未排列好的染色体错误动点-微管连接的有效纠正, 从而保证了姐妹染色单体的正确分离与染色体稳定性的细胞动力学机制^[31]。他们的最新工作揭示了TIP60乙酰转移酶的新底物Ndc80^[34]、Ran^[32-33]。值得一提的是, Ran GTPase是细胞有丝分裂纺锤体建立三条通路的重要一条^[32], TIP60乙酰化Ran, 从而精密调控Ran效应蛋白Mog1的解离与RCC1的结合, 为有丝分裂期纺锤体可塑性的精准调控研究提供了一个极佳的模式体系。NDC80是真核细胞有丝分裂精准调控的重要蛋白质机器, 中国科学技术大学着丝粒可塑性协作组^[34]新近揭示, TIP60乙酰化Ndc80如何与Aurora B介导磷酸化动态交流和协调Ndc80复合物在微管表面滑行的机制。为此, TIP60介导的乙酰化与Aurora B介导的磷酸化驱动了Ndc80复合物在纺锤体微管表面的运动。未来的研究焦点之一将是利用超高分辨显微成像, 在纳米尺度上揭示不同翻译后修饰如何协同调控Ndc80复合物在微管上“行走”动态特征及其对应的生物学意义。

国际同行在纺锤体可塑性与蛋白质翻译后动态修饰的关联做出了一系列有创意的工作, 其中包括马达蛋白Eg5极向运输的调控^[69]、序列性多位点磷酸化对纺锤体可塑性与检查点的关联^[70]以及蛋白激酶PLK4乙酰化如何调控纺锤体可塑性^[71]。未来的研究焦点之一将是利用光谱成像高分辨显微技术结合高内涵测定技术揭示不同翻译后修饰是如何协

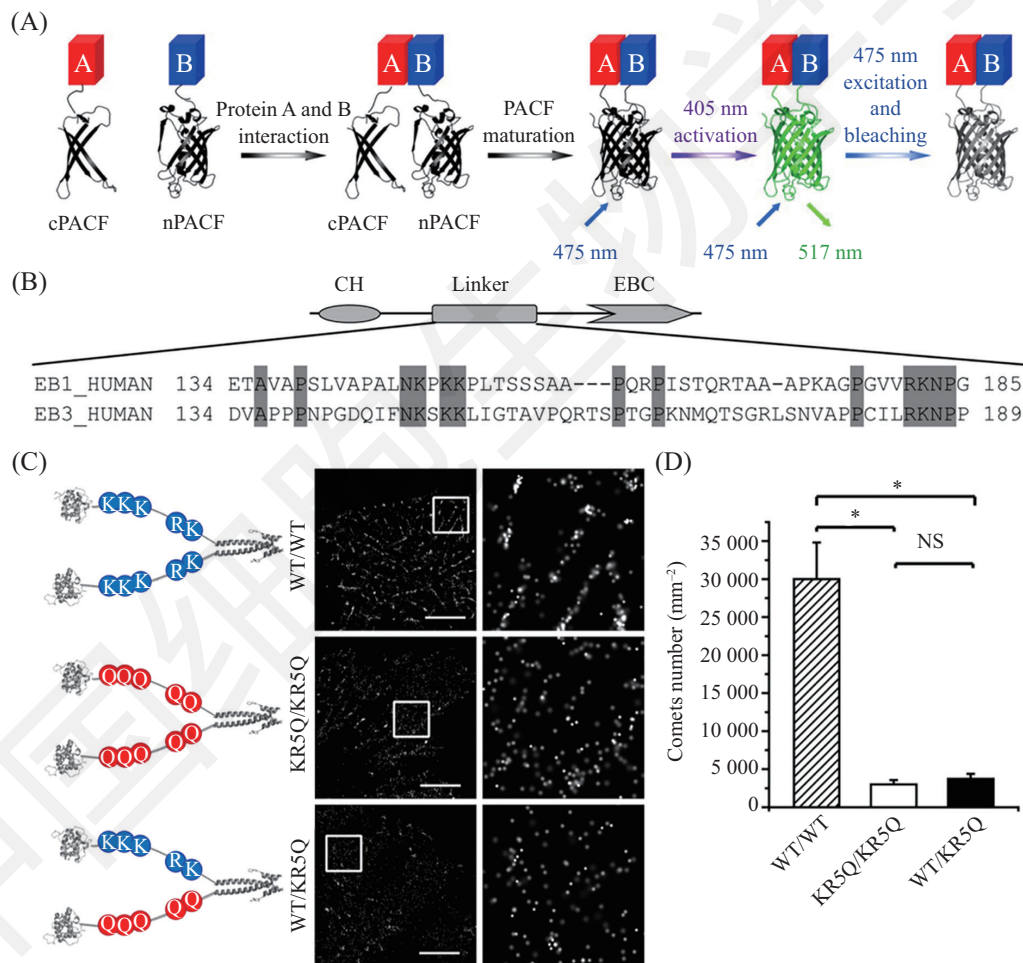
同调控纺锤体主要调控因子动态特征与其对应的生物学意义的^[72-73]。

4 纺锤体微管动力学研究新技术

绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)的发现与应用极大地推动了细胞生物学的进程。Tsien等^[74]多个研究组将GFP发色团周边的氨基酸进行了一系列点突变, 试图衍生出具有其他荧光等特性的荧光蛋白, 并且取得了一系列研究成果。2002年, Jennifer Lippincott-Schwartz研究组^[75]对绿色荧光蛋白进行了更精细的突变实验, 最终确定将203位的苏氨酸突变为组氨酸可以最大程度地减小480 nm

处的光吸收, 而此时突变的绿色荧光蛋白只能通过400 nm左右的荧光照射后才能被480 nm左右的激发光激发, 他们将这种荧光蛋白命名为可激活绿色荧光蛋白(PA-GFP), 其随后被广泛应用于活体细胞蛋白靶分子示踪。利用PA-GFP、Jennifer Lippincott-Schwartz和Eric Betzig联合开发并构建超高分辨率显微镜成像, 这个技术被命名为光敏定位显微术(photoactivated localization microscopy, PALM)^[76]。

由于微管正端在细胞内高度动态且具有空间特异性, 针对细胞内不同空间的微管正端精细结构的动态观测与对应的生物学功能成为本领域的重要课题。为此, 开发针对微管正端的新型高分辨成像

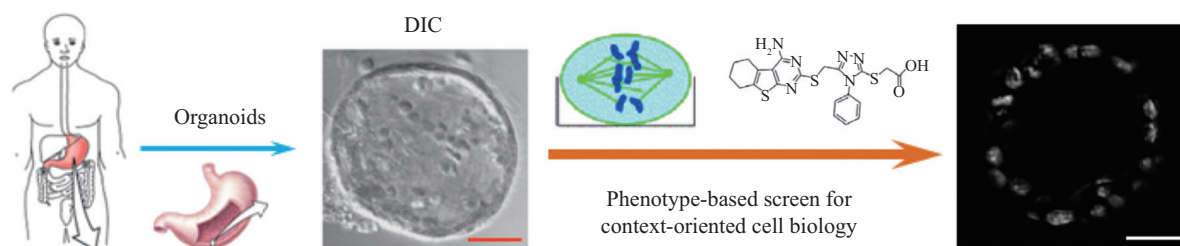


A: 可激活型荧光互补系统的构建原理与实验流程; B: EB1柔性非保守Linker区氨基酸比对分析, 保守性氨基酸残基用灰色背景标注; C: EB1分子Linker区中阳性氨基酸对其折叠程度影响的研究, 标尺=5 μm ; D: 二聚化EB1单分子定点氨基酸电荷改变对EB1分子追踪微管正末端的统计分析, * $P < 0.05$; NS: 无显著性。

A: construction principle and experimental procedure of photoactivatable complementary fluorescence (PACF). B: schematic drawing of sequence alignment of the linker region of EB1 and EB3 molecules. The conserved residues are presented and highlighted with a gray background. C: schematic illustration of positively charged residues in Linker region on regulating EB1 folding. Scale bars=5 μm . D: statistical analyses of histograms of comet numbers per square micrometer in live MCF7 cells expressing site-specific mutants of EB1. Error bars indicate SD. * $P < 0.05$; NS: no significance.

图2 可激活型荧光互补系统示意图(根据参考文献[77]修改)

Fig.2 Characterization of photoactivatable complementary green fluorescent proteins (modified from reference [77])



基于3D类器官的研究体系为系统解析纺锤体可塑性与调控提供了一个极佳的环境依赖性模式体系。3D类器官可以是来自病人的正常与疾病组织, 亦可是遗传操作(genetically edited)小鼠的组织。这些类器官不仅可用来研究类器官有丝分裂染色体可塑性、着丝粒组装动力学及纺锤体方向性, 同时可作为转化医学精准治疗的理论来源。

Cartoon presentation of generation of patient-derived gastric organoids. The research system based on 3D organoids provides an excellent context-dependent model system for the systematic study of spindle plasticity and regulation. The 3D organoids can be derived from the normal and diseased tissue of the patient, or from tissue of genetically edited mouse. The organoid model provides a unique platform to delineate cellular dynamics during cell division in native tissue and constitutes synthetic lethal strategy to design individualized regimen for individualized precision treatment.

图3 利用类器官体系系统解析纺锤体可塑性与调控策略示意图(根据未发表资料和参考文献[83]修改)

Fig.3 Modeling mitosis using organoids and chemical probes (modified from unpublished observation and references [83])

方法, 如光敏定位显微术(PALM)对活细胞内微管正末端进行单分子水平的分析就显得非常重要。在光敏定位显微术的理论与实践基础上, 中国科学技术大学细胞动力学实验室与Lippincott-Schwartz研究组^[77]合作构建了一种可激发型荧光互补系统(photo-activatable complementary fluorescent system, PACF), 成功地实现了在25~35纳米分辨率水平, 专一性地观测二聚化EB1的分子行为。利用PACF系统, 他们成功地解析了EB1柔性非保守Linker区对其微管正端定位的重要性。他们系统地研究揭示, Linker区的折叠使二聚化EB1的N-端的两个球状结构域处于一定的相对位置或角度内, 同时具有一定的灵活度, 这种特殊的结构特点使得EB1具有独一无二的微管正端示踪特性(图2)。同时, PACF为研究低复杂度蛋白的作用动态性提供有效工具。

值得一提的是, 北京大学孙育杰研究组^[78]与美国Nan Xiaolin研究组^[79]分别利用mEOS与mCherry, 成功地搭建了互补式可激活型荧光蛋白系统, 实现了在不同模式体系的荧光互补和超高分辨率成像。可以相信, 未来纺锤体可塑性研究的焦点之一将是利用超高分辨显微成像, 在纳米尺度上揭示不同翻译后修饰如何协同调控Ndc80复合物在微管上“行走”动态特征与其对应的生物学意义。此外, 结合基于FRET的荧光报告体系^[72,80]与靶向独特翻译后修饰的小分子探针, 我们将能够把微管蛋白的表观特征(epigenetic marks)转变成细胞动力学的调控规律与功能代码(functional codes)^[66,80]。

国际同行最近已开始利用胃肠类器官来研究

纺锤体定向与细胞外微环境的关联并做出了一系列有创意的工作, 其中包括美国UCSF的Vale课题组^[81], 他们发现, 细胞有丝分裂纺锤体朝向与上皮细胞极化的关联; 美国麻省理工学院的Amon课题组^[82], 他们发现, 上皮细胞的致密作用力调控细胞有丝分裂的保真度, 为研究正常与疾病上皮组织细胞更新质量控制提供了新的视角(图3)^[83]。

5 总结和展望

细胞有丝分裂是一个由纺锤体构成的复杂交响乐, 各个微管结合蛋白的功能、作用方式、相互作用模式及调控关系错综复杂。它们的分子功能的阐明不仅需要单个蛋白水平的研究, 在实时2D细胞分裂过程的作用, 更需要在3D类器官体系(如同一病人健康与疾病组织)评估。由于多基因操纵的复杂性及局限性, 特异性靶向化学小分子探针(如马达蛋白CENP-E小分子抑制剂syntelin等)为研究细胞有丝分裂过程中CENP-E的时空特异性功能提供了有效工具^[84]。

同一蛋白质在不同时空状态下与不同蛋白质的结合从而形成具有不同生物学效应的功能蛋白质机器。为此, 开发针对多标识的新型高分辨成像方法, 如光谱成像^[85], 对活细胞内细胞器在不同焦平面的快速、高分辨3D成像分析就显得非常重要。值得一提的是, 中国科学院生物物理研究所李栋课题组与Jennifer Lippincott-Schwartz和Eric Betzig课题组^[86]联合开发了掠入射结构照明显微镜(grazing inference structure illumination microscope, GI-SIM)。

鉴于细胞有丝分裂纺锤体可塑性调控的时空效应(如动点微管、中体微管和星状微管)^[4], 化学小分子探针与生物光子学技术的有机结合将使我们能够清楚地描绘有丝分裂纺锤体组装全息动态分子过程。细胞动力学研究的趋向将从目前关注的动态性逐步转向时空动力学的量化分析。例如, 不同染色体在有丝分裂过程中其动粒蛋白质机器(如NDC80)与对应数目的微管数及可塑性是否相同? 着丝粒蛋白质机器(如CCAN)高级结构的变化与其对应的生物学意义? 我们相信: 靶向小分子探针与高分辨、多标识快速成像联合应用将能展现染色体运动过程纺锤体-着丝粒-细胞皮层动力学的全息画面。可以相信, 基于类器官干细胞分裂纺锤体的分子动力学与化学生物学研究的集成将加速基础细胞生物学理论与精准转化医学研究。

参考文献 (References)

- Cleveland DW, Mao Y, Sullivan KF. Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* 2003; 112(4): 407-21.
- McKinley KL, Cheeseman IM. The molecular basis for centromere identity and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016; 17(1): 16-29.
- Yao X, Fang G. Visualization and orchestration of the dynamic molecular society in cells. *Cell Res* 2009; 19(2): 152-5.
- Ren J, Liu Z, Gao X, Jin C, Ye M, Zou H, *et al.* MiCroKit 3.0: an integrated database of midbody, centrosome and kinetochore. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: D155-60.
- Xue Y, Zhou F, Zhu M, Ahmed K, Chen G, Yao X. GPS: a comprehensive www server for phosphorylation sites prediction. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: W184-7.
- Tao Y, Jin C, Li X, Qi S, Chu L, Niu L, *et al.* The structure of the FANCM-MHF complex reveals physical features for functional assembly. *Nat Commun* 2012; 3: 782.
- Nishino T, Takeuchi K, Gascoigne KE, Suzuki A, Hori T, Oyama T, *et al.* CENP-T-W-S-X forms a unique centromeric chromatin structure with a histone-like fold. *Cell* 2012; 148(3): 487-501.
- Wang J, Liu X, Dou Z, Chen L, Jiang H, Fu C, *et al.* Mitotic regulator Mis18beta interacts with and specifies the centromeric assembly of molecular chaperone holliday junction recognition protein (HJURP). *J Biol Chem* 2014; 289(12): 8326-36.
- Zhou X, Zheng F, Wang C, Wu M, Zhang X, Wang Q, *et al.* Phosphorylation of CENP-C by Aurora B facilitates kinetochore attachment error correction in mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; 114(50): E10667-76.
- Ding M, Jiang J, Yang F, Zheng F, Fang J, Wang Q, *et al.* HJURP interacts with and specifies the centromeric assembly of CENP-T. *J Biol Chem* 2019; 294(3): 968-80.
- Hu H, Liu Y, Wang M, Fang J, Huang H, Yang N, *et al.* Structure of a CENP-A-histone H4 heterodimer in complex with chaperone HJURP. *Genes Dev* 2011; 25(9): 901-6.
- Yu Z, Zhou X, Wang W, Deng W, Fang J, Hu H, *et al.* Dynamic phosphorylation of CENP-A at Ser68 orchestrates its cell-cycle-dependent deposition at centromeres. *Dev Cell* 2015; 32(1): 68-81.
- Fang J, Liu Y, Wei Y, Deng W, Yu Z, Huang L, *et al.* Structural transitions of centromeric chromatin regulate the cell cycle-dependent recruitment of CENP-N. *Genes Dev* 2015; 29(10): 1058-73.
- Tian T, Li X, Liu Y, Wang C, Liu X, Bi G, *et al.* Molecular basis for CENP-N recognition of CENP-A nucleosome on the human kinetochore. *Cell Res* 2018; 28(3): 374-8.
- Pentakota S, Zhou K, Smith C, Maffini S, Petrovic A, Morgan GP, *et al.* Decoding the centromeric nucleosome through CENP-N. *eLife* 2017; 6: pii: e33442.
- Chittori S, Hong J, Saunders H, Feng H, Ghirlando R, Kelly AE, *et al.* Structural mechanisms of centromeric nucleosome recognition by the kinetochore protein CENP-N. *Science* 2018; 359(6373): 339-43.
- Wang H, Hu X, Ding X, Dou Z, Yang Z, Shaw AW, *et al.* Human Zwint-1 specifies localization of Zeste White 10 to kinetochores and is essential for mitotic checkpoint signaling. *J Biol Chem* 2004; 279(52): 54590-8.
- 薛宇, 刘丹, 符传孩, 窦震, 姚雪彪. 哺乳动物驱动蛋白的计算基因组学分析与鉴定. *科学通报(Xue Yu, Liu Dan, Fu Chuanhai, Dou Chen, Yao Xuebiao. Chinese Science Bulletin)* 2006; 51(14): 1654-65.
- Dou Z, Sawagechi A, Zhang J, Luo H, Brako L, Yao XB. Dynamic distribution of TTK in HeLa cells: insights from an ultrastructural study. *Cell Res* 2003; 13(6): 443-9.
- Lou Y, Yao J, Zereshki A, Dou Z, Ahmed K, Wang H, *et al.* NEK2A interacts with MAD1 and possibly functions as a novel integrator of the spindle checkpoint signaling. *J Biol Chem* 2004; 279(19): 20049-57.
- Cheng Z, Ke Y, Ding X, Wang F, Wang H, Wang W, *et al.* Functional characterization of TIP60 sumoylation in UV-irradiated DNA damage response. *Oncogene* 2008; 27(7): 931-41.
- Mo F, Zhuang X, Liu X, Yao PY, Qin B, Su Z, *et al.* Acetylation of Aurora B by TIP60 ensures accurate chromosomal segregation. *Nat Chem Biol* 2016; 12(4): 226-32.
- Wu Q, Hu H, Lan J, Emenari C, Wang Z, Chang KS, *et al.* PML3 orchestrates the nuclear dynamics and function of TIP60. *J Biol Chem* 2009; 284(13): 8747-59.
- 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.
- Zhang L, Shao H, Zhu T, Xia P, Wang Z, Liu L, *et al.* DDA3 associates with microtubule plus ends and orchestrates microtubule dynamics and directional cell migration. *Sci Rep* 2013; 3: 1681.
- Huang Y, Wang W, Yao P, Wang X, Liu X, Zhuang X, *et al.* CENP-E kinesin interacts with SKAP protein to orchestrate accurate chromosome segregation in mitosis. *J Biol Chem* 2012; 287(2): 1500-9.
- Wang X, Zhuang X, Cao D, Chu Y, Yao P, Liu W, *et al.* Mitotic regulator SKAP forms a link between kinetochore core complex KMN and dynamic spindle microtubules. *J Biol Chem* 2012; 287(47): 39380-90.
- Akram S, Yang F, Li J, Adams G, Liu Y, Zhuang X, *et al.* LRIF1

- interacts with HP1alpha to coordinate accurate chromosome segregation during mitosis. *J Mol Cell Biol* 2018; 10(6): 527-38.
- 29 Cao D, Su Z, Wang W, Wu H, Liu X, Akram S, *et al.* Signaling scaffold protein IQGAP1 interacts with microtubule plus-end tracking protein SKAP and links dynamic microtubule plus-end to steer cell migration. *J Biol Chem* 2015; 290(39): 23766-80.
- 30 Ward T, Wang M, Liu X, Wang Z, Xia P, Chu Y, *et al.* Regulation of a dynamic interaction between two microtubule-binding proteins, EB1 and TIP150, by the mitotic p300/CBP-associated factor (PCAF) orchestrates kinetochore microtubule plasticity and chromosome stability during mitosis. *J Biol Chem* 2013; 288(22): 15771-85.
- 31 Zachos G. Cell division: TIPs for shaping Aurora B activity. *Nat Chem Biol* 2016; 12(4): 204-5.
- 32 Yang Y, Yu H. Partner switching for Ran during the mitosis dance. *J Mol Cell Biol* 2018; 10(1): 89-90.
- 33 Bao X, Liu H, Liu X, Ruan K, Zhang Y, Zhang Z, *et al.* Mitosis-specific acetylation tunes Ran effector binding for chromosome segregation. *J Mol Cell Biol* 2018; 10(1): 18-32.
- 34 Zhao G, Cheng Y, Gui P, Cui M, Liu W, Wang W, *et al.* Dynamic acetylation of the kinetochore-associated protein HEC1 ensures accurate microtubule-kinetochore attachment. *J Biol Chem* 2019; 294(2): 576-92.
- 35 Lee HS, Lin Z, Chae S, Yoo YS, Kim BG, Lee Y, *et al.* The chromatin remodeler RSF1 controls centromeric histone modifications to coordinate chromosome segregation. *Nat Commun* 2018; 9(1): 3848.
- 36 Macurek L, Lindqvist A, Lim D, Lampson MA, Klompaker R, Freire R, *et al.* Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature* 2008; 455(7209): 119-23.
- 37 Seki A, Coppinger JA, Jang CY, Yates JR, Fang G. Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science* 2008; 320(5883): 1655-8.
- 38 Fang L, Seki A, Fang G. SKAP associates with kinetochores and promotes the metaphase-to-anaphase transition. *Cell Cycle* 2009; 8(17): 2819-27.
- 39 Schmidt JC, Kiyomitsu T, Hori T, Backer CB, Fukagawa T, Cheeseman IM. Aurora B kinase controls the targeting of the Astrin-SKAP complex to bioriented kinetochores. *J Cell Biol* 2010; 191(2): 269-80.
- 40 Ciossani G, Overlack K, Petrovic A, Huis In't Veld PJ, Koerner C, Wohlgemuth S, *et al.* The kinetochore proteins CENP-E and CENP-F directly and specifically interact with distinct BUB mitotic checkpoint Ser/Thr kinases. *J Biol Chem* 2018; 293(26): 10084-101.
- 41 Gassmann R, Essex A, Hu JS, Maddox PS, Motegi F, Sugimoto A, *et al.* A new mechanism controlling kinetochore-microtubule interactions revealed by comparison of two dynein-targeting components: SPDL-1 and the Rod/Zwilch/Zw10 complex. *Genes Dev* 2008; 22(17): 2385-99.
- 42 Sacristan C, Ahmad MUD, Keller J, Fermie J, Groenewold V, Tromer E, *et al.* Dynamic kinetochore size regulation promotes microtubule capture and chromosome biorientation in mitosis. *Nat Cell Biol* 2018; 20(7): 800-10.
- 43 Monda JK, Cheeseman IM. The kinetochore-microtubule interface at a glance. *J Cell Sci* 2018; 131(16): pii: jcs214577.
- 44 Cheeseman IM, Desai A. Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(1): 33-46.
- 45 Santaguida S, Musacchio A. The life and miracles of kinetochores. *EMBO J* 2009; 28(17): 2511-31.
- 46 Morin X, Bellaiche Y. Mitotic spindle orientation in asymmetric and symmetric cell divisions during animal development. *Dev Cell* 2011; 21(1): 102-19.
- 47 Bian M, Fu J, Yan Y, Chen Q, Yang C, Shi Q, *et al.* Short exposure to paclitaxel induces multipolar spindle formation and aneuploidy through promotion of acentrosomal pole assembly. *Sci China. Life Sci* 2010; 53(11): 1322-9.
- 48 Clarke PR, Zhang C. Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(6): 464-77.
- 49 Wu Z, Jiang Q, Clarke PR, Zhang C. Phosphorylation of Crm1 by CDK1-cyclin-B promotes Ran-dependent mitotic spindle assembly. *J Cell Sci* 2013; 126(Pt 15): 3417-28.
- 50 Qi R, Xu N, Wang G, Ren H, Li S, Lei J, *et al.* The lamin-A/C-LAP2alpha-BAF1 protein complex regulates mitotic spindle assembly and positioning. *J Cell Sci* 2015; 128(15): 2830-41.
- 51 Fu J, Bian M, Xin G, Deng Z, Luo J, Guo X, *et al.* TPX2 phosphorylation maintains metaphase spindle length by regulating microtubule flux. *J Cell Biol* 2015; 210(3): 373-83.
- 52 Wu Q, He R, Zhou H, Yu AC, Zhang B, Teng J, *et al.* Cep57, a NEDD1-binding pericentriolar material component, is essential for spindle pole integrity. *Cell Res* 2012; 22(9): 1390-401.
- 53 He R, Wu Q, Zhou H, Huang N, Chen J, Teng J. Cep57 protein is required for cytokinesis by facilitating central spindle microtubule organization. *J Biol Chem* 2013; 288(20): 14384-90.
- 54 Zhou H, Wang T, Zheng T, Teng J, Chen J. Cep57 is a Mis12-interacting kinetochore protein involved in kinetochore targeting of Mad1-Mad2. *Nat Commun* 2016; 7: 10151.
- 55 Kotak S, Busso C, Gonczy P. NuMA phosphorylation by CDK1 couples mitotic progression with cortical dynein function. *EMBO J* 2013; 32(18): 2517-29.
- 56 Jiang H, He X, Wang S, Jia J, Wan Y, Wang Y, *et al.* A microtubule-associated zinc finger protein, BuGZ, regulates mitotic chromosome alignment by ensuring Bub3 stability and kinetochore targeting. *Dev Cell* 2014; 28(3): 268-81.
- 57 Jiang H, Wang S, Huang Y, He X, Cui H, Zhu X, *et al.* Phase transition of spindle-associated protein regulate spindle apparatus assembly. *Cell* 2015; 163(1): 108-22.
- 58 Yang Y, Yan X, Cai Y, Lu Y, Si J, Zhou T. NudC-like protein 2 regulates the LIS1/dynein pathway by stabilizing LIS1 with Hsp90. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(8): 3499-504.
- 59 Yang Y, Liu M, Li D, Ran J, Gao J, Suo S, *et al.* CYLD regulates spindle orientation by stabilizing astral microtubules and promoting dishevelled-NuMA-dynein/dynactin complex formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(6): 2158-63.
- 60 Kiyomitsu T, Cheeseman IM. Chromosome- and spindle-pole-derived signals generate an intrinsic code for spindle position and orientation. *Nat Cell Biol* 2012; 14: 311-7.
- 61 Kiyomitsu T, Cheeseman IM. Cortical dynein and asymmetric membrane elongation coordinately position the spindle in anaphase. *Cell* 2013; 154(2): 391-402.
- 62 Rodrigues NT, Lekomtsev S, Jananji S, Kriston-Vizi J, Hickson GR, Baum B. Kinetochore-localized PP1-Sds22 couples

- chromosome segregation to polar relaxation. *Nature* 2015; 524(7566): 489-92.
- 63 Feng Z, Caballe A, Wainman A, Johnson S, Haensele AFM, Cottee MA, *et al.* Structural basis for mitotic centrosome assembly in flies. *Cell* 2017; 169(6): 1078-89. e13.
- 64 Woodruff JB, Ferreira Gomes B, Widlund PO, Mahamid J, Honigsmann A, Hyman AA. The Centrosome Is a Selective Condensate that Nucleates Microtubules by Concentrating Tubulin. *Cell* 2017; 169(6): 1066-77. e10.
- 65 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.
- 66 Xia P, Wang Z, Liu X, Wu B, Wang J, Ward T, *et al.* EB1 acetylation by P300/CBP-associated factor (PCAF) ensures accurate kinetochore-microtubule interactions in mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(41): 16564-9.
- 67 Xie S, Yang Y, Lin X, Zhou J, Li D, Liu M. Characterization of a novel EB1 acetylation site important for the regulation of microtubule dynamics and cargo recruitment. *J Cell Physiol* 2018; 233(3): 2581-9.
- 68 Luo Y, Ran J, Xie S, Yang Y, Chen J, Li S, *et al.* ASK1 controls spindle orientation and positioning by phosphorylating EB1 and stabilizing astral microtubules. *Cell Discov* 2016; 2: 16033.
- 69 Mann BJ, Wadsworth P. Kinesin-5 Regulation and Function in Mitosis. *Trends Cell Biol* 2019; 29(1): 66-79.
- 70 Ji Z, Gao H, Jia L, Li B, Yu H. A sequential multi-target Mps1 phosphorylation cascade promotes spindle checkpoint signaling. *eLife* 2017; doi: 10.7554/eLife.22513.
- 71 Fournier M, Orpinell M, Grauffel C, Scheer E, Garnier JM, Ye T, *et al.* KAT2A/KAT2B-targeted acetylome reveals a role for PLK4 acetylation in preventing centrosome amplification. *Nat Commun* 2016; 7: 13227.
- 72 Chu Y, Yao PY, Wang W, Wang D, Wang Z, Zhang L, *et al.* Aurora B kinase activation requires survivin priming phosphorylation by PLK1. *J Mol Cell Biol* 2011; 3(4): 260-7.
- 73 Xue Y, Ren J, Gao X, Jin C, Wen L, Yao X. GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7(9): 1598-608.
- 74 Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 509-44.
- 75 Patterson GH, Lippincott-Schwartz J. A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science* 2002; 297(5588): 1873-7.
- 76 Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, *et al.* Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* 2006; 313(5793): 1642-5.
- 77 Xia P, Liu X, Wu B, Zhang S, Song X, Yao PY, *et al.* Superresolution imaging reveals structural features of EB1 in microtubule plus-end tracking. *Mol Biol Cell* 2014; 25(25): 4166-73.
- 78 Liu Z, Xing D, Su QP, Zhu Y, Zhang J, Kong X, *et al.* Super-resolution imaging and tracking of protein-protein interactions in sub-diffraction cellular space. *Nat Commun* 2014; 5: 4443.
- 79 Nickerson A, Huang T, Lin LJ, Nan X. Photoactivated localization microscopy with bimolecular fluorescence complementation (BiFC-PALM) for nanoscale imaging of protein-protein interactions in cells. *PLoS One* 2014; 9(6): e100589.
- 80 Chu L, Zhu T, Liu X, Yu R, Bacanamwo M, Dou Z, *et al.* SUV39H1 orchestrates temporal dynamics of centromeric methylation essential for faithful chromosome segregation in mitosis. *J Mol Cell Biol* 2012; 4(5): 331-40.
- 81 McKinley KL, Stuurman N, Royer LA, Schartner C, Castillo-Azofeifa D, Delling M, *et al.* Cellular aspect ratio and cell division mechanics underlie the patterning of cell progeny in diverse mammalian epithelia. *eLife* 2018; 7: pii: e36739.
- 82 Knouse KA, Lopez KE, Bachofner M, Amon A. Chromosome Segregation Fidelity in Epithelia Requires Tissue Architecture. *Cell* 2018; 175(1): 200-11. e13.
- 83 Yao X, Smolka A. Cellular dynamics underlying gastric parietal cell physiology and microbial-induced pathobiology. *Gastroenterology* 2019; doi: 10.1053/j.gastro.2019.02.036.
- 84 Ding X, Yan F, Yao P, Yang Z, Wan W, Wang X, *et al.* Probing CENP-E function in chromosome dynamics using small molecule inhibitor syntelin. *Cell Res* 2010; 20(12): 1386-9.
- 85 Valm AM, Cohen S, Legant WR, Melunis J, Hershberg U, Wait E, *et al.* Applying systems-level spectral imaging and analysis to reveal the organelle interactome. *Nature* 2017; 546(7656): 162-7.
- 86 Guo Y, Li D, Zhang S, Yang Y, Liu JJ, Wang X, *et al.* Visualizing intracellular organelle and cytoskeletal interactions at nanoscale resolution on millisecond timescales. *Cell* 2018; 175(5): 1430-42. e17.