

评述 青年科学家专栏

染色体着丝粒的动态组装与调控

胡诚诚^{1,2,#}, 王志凯^{1,2}, 刘行^{1,2,*}, 姚雪彪^{1,2,*}

¹中国科学技术大学生命科学学院, 细胞动力学教育部重点实验室, 合肥, 230027

²合肥微尺度物质科学国家研究中心分子与细胞生物物理研究部, 合肥, 230027

作者: 胡诚诚, huchengcheng@mail.ustc.edu.cn

*通讯作者: 姚雪彪, 教授, yaoxb@ustc.edu.cn; 刘行, 教授, xing1017@ustc.edu.cn

科技部重点研发计划(批准号: 2022YFA1303100、2022YFA0806800、2022YFA1302700)

和国家自然科学基金(批准号: 32090040、W2411017、31621002)资助的课题。

2025-04-17; 2025-07-01

摘要: 在细胞有丝分裂过程中, 染色体的特化区域——着丝粒负责精确的遗传物质分配。结构上高度有序的着丝粒既参与姐妹染色单体之间的黏连又介导染色体与纺锤体微管之间的稳定连接。从芽殖酵母的点状着丝粒到人类的区域性着丝粒拥有高度保守的动态组装与调控模式, 其中人类细胞着丝粒的组装和调控异常会引起染色体不稳定性进而促进癌症的发生与发展。最新研究提示: 着丝粒组装不是经典的板块与层级式结合, 而是生物大分子凝聚态驱动的区域化模式。因此, 解析完整着丝粒的功能模块, 对于理解着丝粒的区域化与鲁棒性调控机制具有重要意义, 是人类健康研究的重要方向。

关键词: 有丝分裂, 染色体, 着丝粒, 动粒, 纺锤体

Research progress on dynamic assembly and regulation of centromere

Chengcheng Hu^{1,2,#}, Zhikai Wang^{1,2}, Xing Liu^{1,2,*}, Xuebiao Yao^{1,2,*}

¹MOE Key Laboratory for Cellular Dynamics & School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China; ²Department of Chemical Physics, Hefei National Research Center for Interdisciplinary Sciences at the Microscale, Hefei 230027, China.

Author: Chengcheng Hu, huchengcheng@mail.ustc.edu.cn

*Correspondence should be addressed to: Xuebiao Yao, Professor, yaoxb@ustc.edu.cn; Xing Liu, Professor, xing1017@ustc.edu.cn

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No. 2022YFA1303100, 2022YFA0806800, 2022YFA1302700) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 32090040, W2411017, 31621002).

Abstract: During cell division, the accurate segregation of genetic material relies on specialized regions of chromosomes named the centromere. This highly integrated structure mediates the cohesion of sister chromatids and the stable attachment of spindle microtubules to kinetochores. From the point-centromere in budding yeast to the regional centromere in human cells, a highly conserved pattern of assembly and regulation exist. Disruption of this pattern can cause chromosomal instability, leading to the occurrence and development of cancer. The latest advancements suggest that centromere assembly is driven by biomolecular condensation-elicited compartmentalization rather than the classic model of hierarchical organization. Therefore, defining the high-order structure of the centromere is significant for better understanding the nucleation process underlying centromere compartmentalization and regulation of the robustness of centromere during cell division. This is also an important and promising direction for future human health research.

Keywords: Mitosis, Chromosome, Centromere, Kinetochore, Spindle

引言:

1965 年诺贝尔生理医学奖得主、法国生物学家 François Jacob 曾说:“每个细胞的梦想是成为两个细胞”。细胞要准确分裂,遗传物质的精准分配至关重要。复制后的遗传信息在有丝分裂过程中均等分配给子代细胞,这个过程是依赖于从两极中心体发出的纺锤体微管与染色体着丝粒之间的动态相互作用完成的^[1, 2]。染色体上特化的着丝粒区域,是纺锤体微管和染色体的连接点,是调控细胞有丝分裂的关键枢纽^[3]。如图 1 所示,完整的着丝粒功能依赖于着丝粒 DNA 序列、CENP-A 核小体以及着丝粒蛋白质之间的相互作用,着丝粒 DNA 主要由 α 卫星 DNA (alpha-Satellite DNA, α -Sat) 构成,其片段大小从芽殖酵母的一百多碱基对(base pair, bp)到人类的几万碱基对不等^[4]。CENP-A 是首个被鉴定的着丝粒蛋白^[5],其作为 H3 组蛋白的变体^[6],是着丝粒的表观遗传标记,也是动粒(kinetochore)的组装平台^[4, 7]。在脊椎动物中,动粒从空间结构上可分为内层动粒 CCAN (Constitutive Centromere Associated Network)和外层动粒 KMN (KNL1 复合物, MIS12 复合物以及 NDC80 复合物)网络^[8]。在整个细胞周期中,内层动粒 CCAN 组成型地定位于染色体着丝粒,有丝分裂前期,内层动粒招募 KMN 复合物,组装成外层动粒。在微管尚未连接染色体着丝粒时,外层动粒招募更多蛋白质,形成纤维冠组分,确保纺锤体组装检查点(Spindle Assembly Checkpoint, SAC)的建立,保证染色体准确分离。当微管正确连接染色体着丝粒后,纤维冠组分蛋白脱离动粒,外层动粒直接结合纺锤体微管,从而发挥连接染色体和纺锤体微管的重要功能。着丝粒蛋白的缺失或功能异常会导致染色体错误分配,产生染色体不稳定性(Chromosomal Instability, CIN),进而形成非整倍体,引发细胞死亡、发育缺陷(如遗传综合征)和癌症(>90%的癌细胞为非整倍体),威胁人类健康^[9]。然而,着丝粒-动粒复合物的时空动态组装模式和调控机制尚不清楚。在这篇综述中,我们将总结近年来有关于着丝粒功能分子机制的研究,特别是构成该稳定结构的不同蛋白质核心组分,以及它们如何有序募集和组装,以实现复杂的染色体分离过程。

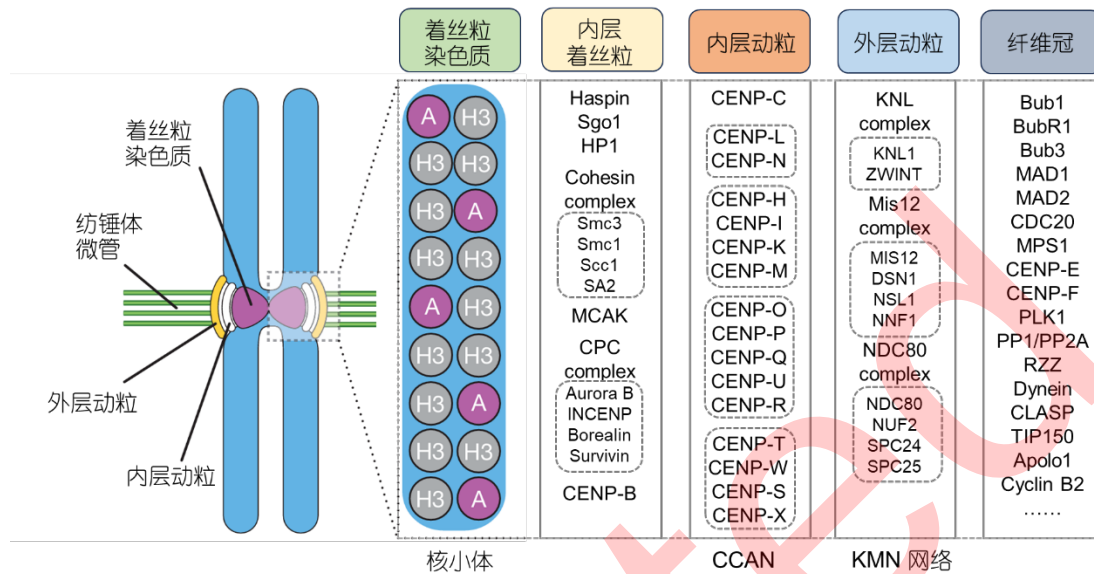


图 1: 人类染色体着丝粒区域的层级结构模式图及其关键蛋白组分, 改编自参考文献^[8]。CENP-A 核小体作为着丝粒特有的表观遗传标记分子形成特征性的着丝粒染色质结构, 决定着动粒的精确定位。内层着丝粒由 Sgo1、Cohesin 复合物及相关激酶等核心组分构成, 这些分子协同作用维持姐妹染色单体在有丝分裂期的正确黏连。动粒可进一步区分为内层动粒和外层动粒: 内层动粒由 CCAN 蛋白复合物组成, 负责招募外层动粒 KMN 网络, 后者直接介导动粒与纺锤体微管的结合。当动粒尚未建立微管连接时, 外层动粒能够特异性地募集纤维冠组分, 这一机制对于纺锤体组装检验点的正确建立至关重要。

Figure 1: The hierarchical organization of the centromere and the key components, adapted from reference^[8]. CENP-A nucleosomes serve as a unique epigenetic marker, ensuring precise positioning and formation of the kinetochore. The inner centromere consists of core components such as Sgo1, the Cohesin complex, and associated kinases, which cooperate to maintain proper sister chromatid cohesion. The kinetochore can be further divided into the inner kinetochore and the outer kinetochore: The inner kinetochore is composed of the CCAN complex, which recruits the outer kinetochore KMN network; the latter mediates spindle microtubule attachment. When microtubule connections are not established, the outer kinetochore specifically recruits the fibrous corona components, which is critical for establishing the proper spindle assembly checkpoint.

1、着丝粒 DNA 序列特征:

着丝粒可分为点状着丝粒和区域着丝粒, 其 DNA 序列的大小也从一百多碱基对到几万碱基对不等。如图 2 所示, 在芽殖酵母的点状着丝粒中, 约 120bp 的 DNA 序列即可决定着丝粒的位置和功能^[10]。该 DNA 序列包含三个着丝粒 DNA 元件 (Centromere DNA Element, CDE), 每个元件都具有特殊作用。CDEI (8 bp) 募集一种亮氨酸拉链型 DNA 结合蛋白 CBF1, 帮助 DNA 弯曲并抑制基因转录; CDEII (80-90 bp) 富含腺嘌呤-胸腺嘧啶(AT), 包裹 Cse4 (哺乳动物中的 CENP-A) 形成单个八聚体核小体, 为下游动粒的组装提供平台; CDEIII (25 bp) 可以结合序列特异性结合蛋白 CBF3 复合物, 从而结合 Scm3 (哺乳动物中的 HJURP), 将 Cse4 加载到 CDEII 上^[11]。这种精细的组装分配模式形成了完整的动粒组装平台, 介导着丝粒与微管的连接。

在其他大多数真核生物中, 着丝粒 DNA 序列大多由几百个碱基对的短串联重复序列所

形成,长度因物种而异,这种重复序列结构指导区域着丝粒的形成,其组装过程也更加复杂。在某些特殊物种,如线虫中,着丝粒会覆盖整条染色体形成区域弥散性着丝粒^[12]。人类染色体着丝粒位于串联重复的 α -Sat DNA 序列内,通常横跨数百万个碱基对。最近的基因组测序工作揭开了着丝粒 DNA 序列的面纱,并详细阐明了着丝粒 DNA 的组织模式^[13]。卫星重复序列占整个 T2T-CHM13 基因组的 6.2%,其中 α -Sat 是最大的一个组成部分,占该基因组的 2.8%。如图 2 所示,171 bp 的 α -Sat 序列以从头到尾的方式重复 2-14 次,这些序列模式形成高阶重复结构(Higher-Order Repeats, HOR),HOR 再重复数千次,其中还有其他非 α -Sat 序列参插,最终形成 0.3-4.8 Mbp 的大规模着丝粒重复序列^[11]。每串 α -Sat 内的重复序列与内部的动粒蛋白 CENP-A 相互作用,形成着丝粒区域特有的 CENP-A 核小体,染色质纤维实验表明在着丝粒处 CENP-A 核小体和 H3 核小体随机交替存在^[14, 15]。最近新开发的一种 DNA 甲基化长读长单分子测序(DiMeLo-seq)技术表明,在人类着丝粒处的低甲基化区域,CENP-A 核小体的分布密度较高,平均每 4 个核小体中就有 1 个核小体含有 CENP-A 组蛋白^[16],但是 CENP-A 在着丝粒处的精细排列方式和组装压缩机制仍不清楚。

值得关注的是,人类着丝粒的 α -Sat 重复序列中还散布着 17 bp 长度的 CENP-B 特异性识别序列,被称为“CENP-B 盒”^[17]。CENP-B 是着丝粒处唯一具有序列依赖性的 DNA 结合蛋白,与 H3 组蛋白变体 CENP-A、内层动粒蛋白 CENP-C 同时被发现^[5]。早期的研究发现 CENP-B 的缺失仅导致小鼠胚胎发育异常,成年细胞仍然存活^[18],并且人类 Y 染色体以及部分物种(如:果蝇)的染色体着丝粒上不存在 CENP-B^[19],表明其在胚胎早期发育中更为关键且可能存在进化上的不保守性,因此其功能在很长一段时间内一直没有明确定论。最新研究发现,在 HT1080 细胞内构建的人工染色体(Human Artificial Chromosome, HAC)形成和着丝粒组装过程依赖于 CENP-B 蛋白以及 CENP-B 盒的存在^[20, 21]。单分子研究发现 CENP-B 位于内着丝粒层^[22],能够募集组蛋白的伴侣蛋白和多种染色质修饰酶^[23],包括 H3K36 甲基化酶 ASH1L,异染色质成分 Suv39h1、HP1 和 ZNF518^[24]。因此,CENP-B 可能在着丝粒异染色质建立、DNA 拓扑结构形成等方面发挥重要贡献,与 CENP-A 共同重塑着丝粒处的染色体结构,促进着丝粒相关因子的结合^[25]。此外,CENP-B 被发现是锌指转录调节因子 ZFAT 的着丝粒定位以及 ncRNA 正确转录所必需的^[26],提示 CENP-B 可能与着丝粒 RNA 的转录相关,但相关分子机制仍需进一步探究。

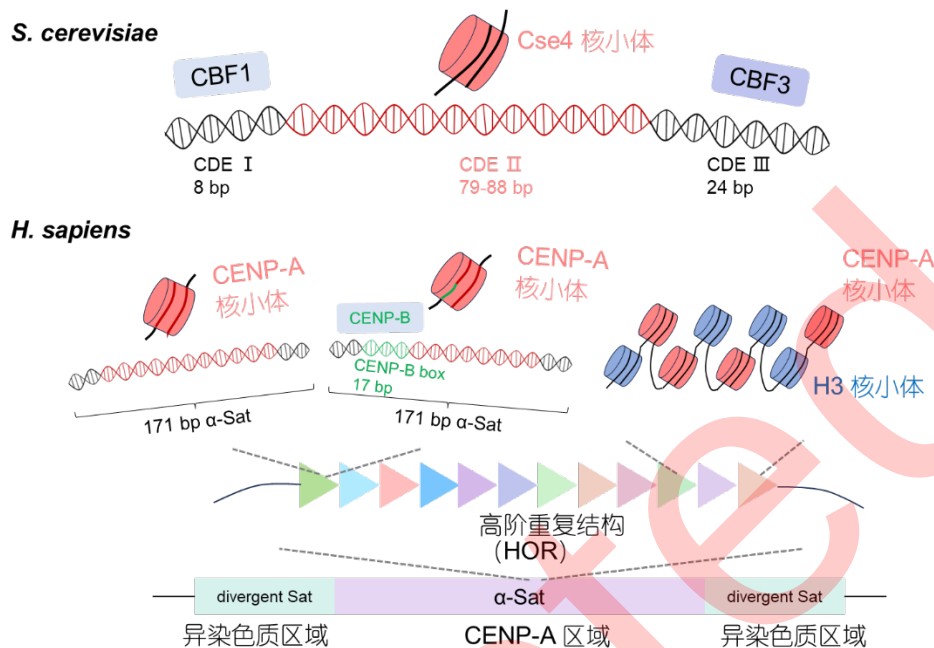


图 2: 酿酒酵母的点状着丝粒与人类区域性着丝粒的 DNA 序列特征, 改编自参考文献^[11]。在点状着丝粒中, 一段约 120 bp 的 DNA 序列可划分为三个功能元件, 各自特异性招募不同蛋白质因子, 共同介导单个 Cse4 核小体的形成。而在人类区域性着丝粒中, 171 bp 的 α -Sat 序列可包裹形成 CENP-A 核小体, 并与 H3 核小体交替分布, 该序列经数十次重复形成高阶重复结构 (HOR), HOR 再进一步重复数千次, 最终构成大规模着丝粒重复序列。 α -Sat 序列中随机分布的 CENP-B 盒, 是 CENP-B 蛋白特异结合基序。

Figure 2: DNA sequence features of the point centromere in *S.cerevisiae* and the regional centromere in humans, adapted from reference^[11]. In the point centromere, an approximately 120 bp DNA sequence is composed of three functional elements, with each element specifically recruiting distinct protein factors to cooperatively form a single Cse4 nucleosome. In the human regional centromere, repeats of the 171 bp α -satellite (α -Sat) DNA wrap around CENP-A nucleosomes, which intersperse with H3 nucleosomes. These α -Sat repeats are tandemly arranged into higher-order repeat (HOR) units, which are further repeated thousands of times, ultimately forming megabase-scale centromeric DNA. The randomly distributed CENP-B box within the α -Sat DNA is the specific binding site for CENP-B.

2、着丝粒染色质结构的建立:

细胞有丝分裂前, 复制好的染色体通过着丝粒黏连, 确保染色体不会提前分离, 形成类 "X" 形状。位于内着丝粒层的染色体结构维持蛋白 (Structural Maintenance of Chromosome, SMC) 家族及其相互作用蛋白在此过程中起关键作用。真核生物的 SMC 主要形成 Cohesin、Condensin 和 SMC5/6 三种复合物^[27]。每个 SMC 复合物都有一个约 50 nm 的卷曲螺旋臂, 两端都有一个二聚化界面。二聚化的 SMC 蛋白头部结构域相互作用, 形成类 ATP 酶结构域, 并由第三种蛋白质桥连, 形成环形复合物^[28], 环形复合物再由其他不同的辅助亚基补充, 在不同时期发挥不同的功能^[27]。其中 Cohesin 复合物主要由 Smc1、Smc3 和两个非 SMC 蛋白 SA1/SA2、Scc1/Rad21 组成, 除了像其他 SMC 一样通过环挤出模型介导基因组转录调控和有丝分裂期染色体的组装之外 (Cis-Cohesin)^[29], 它还能在着丝粒处连接复制好的姐妹

染色单体并提供凝聚力，防止其过早分离(Trans-Cohesin)^[30]。基于此，相较于其他的 SMC，Cohesin 具有更加复杂的结合亚基调控网络。如图 3 所示，细胞完成有丝分裂后，在 NIPBL 和 MAU2 等结合因子的协助下，黏连蛋白 (Cohesin) 即被加载至整条染色体上^[31, 32]，在哺乳动物基因组中，Cohesin 在染色体臂上的分布模式由 CCCTC 结合因子 (CCCTC binding factor, CTCF) 识别的 DNA 序列元件所指定^[33]。DNA 复制完成后，Cohesin 与 Esco1/Esco2 及 Sosorin 结合，通过环状结构将姐妹染色单体凝聚在一起。其中，Sosorin 作为关键的维持因子，不仅为染色单体提供凝聚力，还能改变 Cohesin 的拓扑结构，通过拮抗 Wapl 蛋白来防止 Cohesin 环的过早解离^[34-35]。

有丝分裂时期形成的类“X”染色体是由于 Cohesin 分两步从染色体上释放解离。首先，在有丝分裂前期和前中期，Polo 样激酶 (Polo-like kinase 1, PLK1)、CDK1 和 Aurora B 等激酶活性上调，对 Cohesin 亚基 (如 SA2、Sosorin) 进行磷酸化修饰，降低其凝聚力，使 Wapl 能够移除染色体臂上的大部分 Cohesin^[35]。然而，着丝粒处的 Cohesin 由于受到 Shugoshin (Sgo1) 蛋白的保护，从而免受这一途径的影响^[36, 37]。Sgo1 通过募集蛋白磷酸酶 2A (Protein Phosphatase 2A, PP2A) 到着丝粒处^[38]，促进底物蛋白的去磷酸化以维持着丝粒处的凝聚力。这些被 Sgo1-PP2A 保护的着丝粒 Cohesin 只能通过分离酶 (Seprease) 从染色体中去除，Seprease 可在两个不同的位点切割黏连蛋白的 Scc1 亚基，从而打开黏连蛋白环^[39]。该过程对于姐妹染色单体分离至关重要，因为不可切割的 Scc1 的表达或 Seprease 的失活都会阻止适当的姐妹染色单体分离，阻止后期起始^[40]。

如图 3 所示，除了 Sgo1，Haspin 激酶也被证明可以保护着丝粒处的 Cohesin^[41]，Yamagishi 等人发现，Haspin 可以与 Cohesin 相互作用，保护这些染色体着丝粒区域凝聚力的维持^[42]。与此同时，Haspin 激酶可磷酸化组蛋白 H3，磷酸化后的 H3 可以被 Survivin 所识别^[43]，而 Survivin 是染色体乘客复合体 (Chromosome Passenger Complex, CPC) 的成员，从而决定了 CPC 的着丝粒定位模式，CPC 又是 Shugoshin 蛋白家族着丝粒定位所必需的。除此之外，也有研究发现 Sgo1 在着丝粒处的募集也由纺锤体组装检验点蛋白激酶 Bub1 对 H2A 组蛋白的磷酸化所介导^[44]，但是这些内着丝粒蛋白具体的定位模式是多种方式依赖的，目前尚未十分明确 Bub1 激酶在招募 Sgo1 和 CPC 复合物中的具体上下游关系。

值得一提的是，由 Aurora B 激酶、INCENP、Survivin 和 Borealin 四个亚基组成的 CPC 复合物，其各组分相互依赖，任一成分的缺失均会导致其他成员定位异常和功能丧失，进而影响有丝分裂进程^[45, 46]。如图 3 所示，作为 CPC 复合物的催化核心，Aurora B 激酶在有丝分裂不同时期通过特异性定位磷酸化相应底物，其修饰范围受着丝粒张力和空间距离所调控

[47-50]。在前中期，定位于内层着丝粒的 CPC 复合物具有多重功能：通过招募 Sgo1、HP1 等蛋白维持着丝粒染色质结构^[51-53]；参与动粒组装并纠正错误的微管-动粒连接^[54]；通过调控 MCAK 酶活性和 NDC80 复合物对微管的亲和力，确保染色体双极定向的正确建立^[55, 56]。

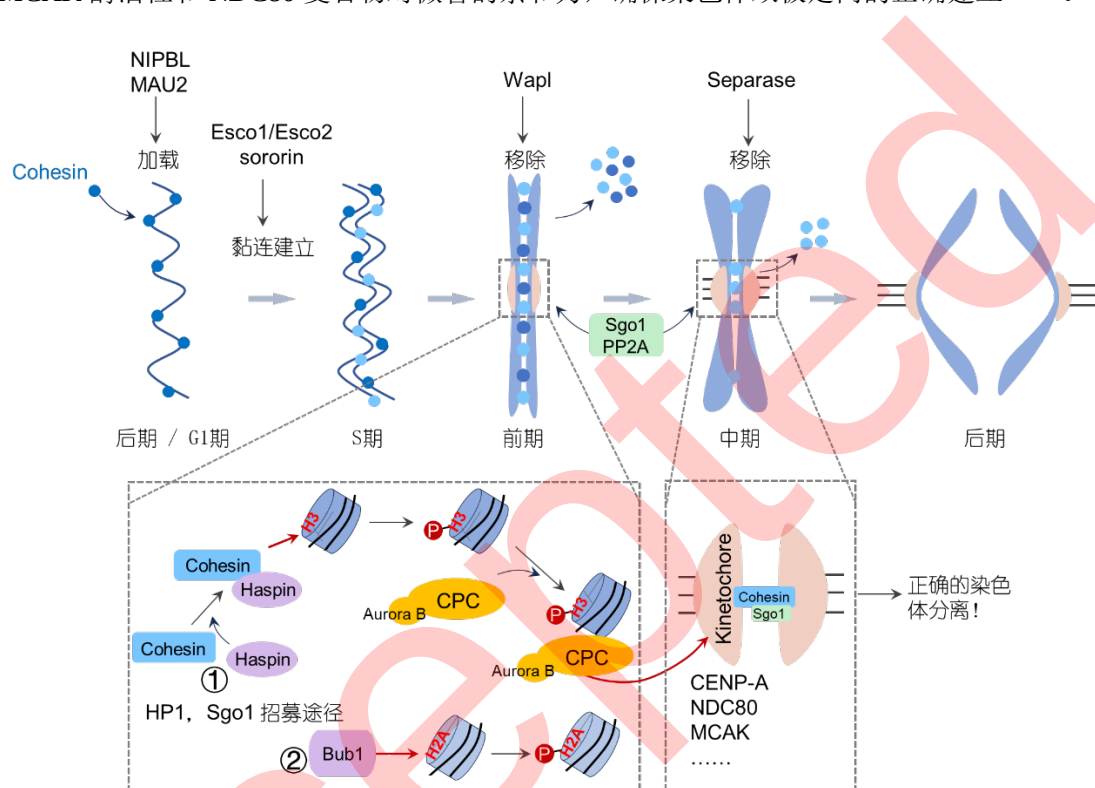


图 3：细胞周期中 Cohesin 的动态调控及相关蛋白的募集关系。新生的 Cohesin 在 G1 期负载到染色体上的 CTCF 区，S 期 DNA 复制后即起到黏连的作用。当细胞进入有丝分裂期，染色体臂上的 Cohesin 被 Wapl 移除，而位于着丝粒区域的 Cohesin 由于受到 Sgo1-PP2A 的保护而避免被移除，直到后期起始，Separase 切割着丝粒区的 Cohesin，姐妹染色单体才能分离。Sgo1 在着丝粒处的招募受两条途径调控：一是与 Cohesin 结合的 Haspin 激酶磷酸化 H3 组蛋白途径；二是 Bub1 激酶磷酸化 H2A 组蛋白途径。其中磷酸化的 H3 组蛋白也可进一步招募 CPC 复合物，其核心激酶 Aurora B 通过磷酸化多种着丝粒蛋白，精确调控着丝粒动态组装、微管附着和纺锤体检查点等有丝分裂关键事件。

Figure 3: The dynamic regulation of Cohesin during cell cycle and the recruitment of mitotic protein. New Cohesin is loaded onto chromosomal CTCF sites during G1 phase and establishes sister chromatid cohesion in S phase. Upon mitotic entry, Cohesin in chromosomal arm is removed by Wapl, while centromeric Cohesin is protected by Sgo1-PP2A until anaphase onset, when Separase-mediated cleavage triggers sister chromatid separation. The recruitment of Sgo1 to centromere is regulated through two distinct pathways: (1) Cohesin-associated Haspin kinase phosphorylates histone H3, and (2) Bub1 kinase phosphorylates histone H2A. These two phosphorylated histones recruit Sgo1. Besides, the phosphorylated H3 further recruits the Chromosomal Passenger Complex (CPC), whose core kinase Aurora B orchestrates critical mitotic events - including centromere dynamics assembly, microtubule attachment, and spindle checkpoint signaling - through precise phosphorylation of multiple centromeric substrates.

3、内层动粒 CCAN:

在人类中，动粒在每条染色体的着丝粒上组装，形成一个直径为 400 nm 左右的致密颗粒状结构^[57]。如图 4A 所示，根据定位模式，动粒可以划分为内层动粒和外层动粒。内层动

粒由 16 个蛋白质组成^[8, 58]，按照相互作用密切程度可划分为五种功能亚复合物，分别是 CENP-C、CENP-LN、CENP-HIKM、CENP-TWSX 和 CENP-OPQUR，其中 CENP-C 和 CENP-N 直接识别 CENP-A 核小体，并以其为平台组装 CCAN (Constitutive Centromere Associated Network)，该网络组成型定位于着丝粒，对下游外层动粒 KMN 网络的招募、染色体的正确分离起到了决定性的作用。

3.1 CENP-A:

CENP-A 是首个被鉴定的着丝粒蛋白^[5]，在 CCAN 的识别与组装过程中处于关键地位。作为染色质组分，CENP-A 与组蛋白 H3 同源^[6]，可与 H4、H2A 和 H2B 形成完整的核小体结构^[59, 60]。CENP-A 羧基端的组蛋白折叠结构域与 H3 高度相似，其中的着丝粒靶向结构域 (CENP-A-targeting domain, CATD) 是 CENP-A 靶向着丝粒及功能发挥的关键^[61]，CATD 介导 CENP-A 与 HJURP 相互作用，促进 CENP-A 在 G1 期装载至着丝粒^[62, 63]，同时又介导 CCAN 复合物中 CENP-N 与 CENP-A 核小体的直接结合，体内生化和体外电镜结构解析均表明 CATD 中的 RG-loop 可直接与 CENP-N 相互作用^[64, 65]。此外，CENP-A 最后六个保守的疏水氨基酸已被证明可以直接招募并结合 CENP-C^[66]，值得注意的是，由于 CENP-C 具有较长的氨基酸序列且富含无序结构域，其能与 CCAN 及 KMN 网络的多个组分发生相互作用^[67]。最新研究发现，有丝分裂期磷酸化的 CENP-C 会与 CENP-N 竞争结合 CENP-A 的 RG-loop^[68, 69]，这种动态竞争可能调控 CCAN 复合物的构象变化，但是目前仍不太清楚这种转变会对 CCAN 整个复合物的组装有何影响。CENP-A 的 N 端无序区与组蛋白类似，具有物种特异性，并且会发生多种翻译后修饰^[70]，有些修饰已被证明在有丝分裂期特异性上调，但其功能仍需进一步探究^[51, 70-73]。在细胞周期中，CCAN 针对沉积在染色质中的 CENP-A 核小体，与之结合建立并维持着丝粒染色质，以进一步组装成动粒结构^[74-76]，虽然已经提出了多种相关的组装模型，但是着丝粒染色质进入有丝分裂时期的机制和精确结构仍不完全清楚。CENP-A 和 CCAN 赋予的着丝粒染色质特性对其有丝分裂功能至关重要，CENP-A 的缺失会导致染色体结构缺陷，影响染色体凝聚动力学，引发染色体不稳定性并促进癌症发生发展^[77]。

3.2 CENP-C:

着丝粒上的 CENP-C 在细胞周期中的表达水平相对恒定，但其着丝粒定位的分子机制在间期和有丝分裂期存在差异。在间期，CENP-C 的定位依赖于其与 CENP-HIKM、CENP-LN 的相互作用，任一成分的缺失都会导致 CENP-C 着丝粒定位丢失。然而，在有丝分裂期，CENP-C 可以在缺乏 CENP-HIKM、CENP-LN 的情况下定位于动粒^[78]。鉴于 CENP-C 在 CCAN 组织中的重要作用^[67]，其定位机制的变化提示其功能具有细胞周期依赖性，但具体分子机

制尚不明确。先前的研究表明，CENP-C 对于 CENP-A 核小体的掺入和稳定是必需的，在鸡细胞中的最新研究发现，CENP-C 在有丝分裂期依赖 CDK 的磷酸化可增强其与 CENP-A 的相互作用^[68, 69]。此外，Navarro 和 Cheeseman 研究发现，CENP-C 的敲除会导致 CENP-A 水平显著降低及其他 CCAN 亚复合物的着丝粒定位严重缺陷，而敲除其他 CCAN 组分则不影响 CENP-C 在有丝分裂期的动粒定位，这提示 CENP-C 可能是 CCAN 复合物中第一个组装上去的，起到招募下游成员的作用^[79, 80]。由于 CENP-A 是 CCAN 组分着丝粒定位的必要条件，这种结果可能反映了 CENP-C 与 CENP-A 之间是通过蛋白质直接相互作用的方式来实现 CCAN 组分的募集。

3.3 CENP-LN:

CENP-LN 在 CCAN 复合物的组织中起着关键作用，并表现出明显的细胞周期依赖性行为。CENP-N 的 N 端可直接与 CENP-A 的 CATD 结构域相互作用，这对于 CENP-N 在间期定位到动粒上是必要和充分的；而其 C 端通过与 CENP-L 直接相互作用并间接与 CCAN 结合^[81]，这对于 CENP-N 的有丝分裂期定位至关重要。由此看出，CENP-N 的定位更依赖于其与 CCAN 的相互作用，这一行为与 CENP-C 相反。此外，CENP-N 在细胞周期中呈现动态定位：在 S 期会在动粒上富集，随后在 G2/M 转换期间脱离动粒，导致其有丝分裂期水平较低^[81]，但其动粒水平变化的基础及意义尚不明确。目前有体外分析表明，CENP-N 更易与 RG-loop 暴露的开放染色质中的 CENP-A 核小体结合^[82, 83]，提示细胞周期中染色质状态的潜在变化可能影响 CENP-N 在动粒上的稳定结合能力。CENP-N 和 CENP-C 作为 CENP-A 识别以及 CCAN 募集的必需组分^[84]，其不同的细胞周期依赖性行为表明 CCAN 复合物整体经历了实质性的变化。然而，目前尚不清楚这些行为和着丝粒关联的差异如何影响 CCAN 的组织和功能。导致 CCAN 内不同关联行为的潜在机制尚未阐明，但磷酸化等翻译后修饰可能在其中发挥作用^[81, 85]。

3.4 CENP-HIKM:

CENP-HIKM 位于 CCAN 复合物的核心，与 CENP-C、CENP-LN 和 CENP-TWSX 直接相互作用^[86, 87]。CENP-I 作为 CENP-HIKM 中的重要支架蛋白，与 CENP-H、CENP-K 及 CENP-M 相互作用，彼此依赖定位于动粒，参与调控染色体的正确运动和分离，任一组分缺失均会导致严重的有丝分裂缺陷^[88]。近期研究表明，CENP-I 具有 DNA 结合活性，对其自身着丝粒定位及 CENP-A 核小体的负载和稳定至关重要^[89]。值得注意的是，CENP-M 是后生动物特有的动粒蛋白^[74]，直接连接 CENP-HIK 和 CENP-LN，并且最新研究发现，CENP-M 在结构上与 GTP 酶类似，但缺乏 GTP 结合和构象转换能力，提示其可能以假 GTP 酶形

式参与 CENP-HIKM 四聚体及 CCAN 复合物的组装与稳定^[90]，解析其出现在生物体中的意义以及特有机制仍然是研究的难题^[91]。

3.5 CENP-TWSX:

与 CENP-C 类似，CENP-TWSX 可直接与外层动粒相互作用^[92-95]，调控有丝分裂地准确进行。CENP-T/W 缺失会导致外层动粒 KMN 网络无法被招募^[92]，动粒与微管结合异常，引发染色体分离错误。CENP-S/X 缺失则表现为细胞生长速率减缓、周期延长及染色体丢失，类似于 CENP-O 缺失的表型^[96]，这表明 CENP-TW、CENP-SX 在有丝分裂过程中可能发挥不同的功能。此外，CENP-TWSX 复合物包含组蛋白折叠结构域，能够形成类似核小体的结构^[97]，但尚未有数据直接证明。CENP-TWSX 不仅促进并稳定蛋白质相互作用^[96, 98]，还通过 DNA 结合能力招募着丝粒组分，对构建稳定的层级动粒结构至关重要^[99, 100]。

3.6 CENP-OPQUR:

CENP-OPQUR 复合物通过与 CENP-C/HIKM/LN 的相互作用被招募到动粒上^[78]，对于有丝分裂进程具有非常重要的功能^[101, 102]。现有研究表明，CENP-OPQUR 负责马达蛋白 CENP-E 和激酶 PLK1 的动粒募集^[103, 104]，并且作为内层动粒成员，其与外层动粒 NDC80 类似，可直接与微管相互作用^[78, 102]。相关实验表明，CENP-OPQUR 中的 CENP-OP 可以结合 CENP-HIKM/LN 动粒核心颗粒，CENP-QU 可直接结合微管^[102]，而 CENP-R 作为后生动物中特有的蛋白，最新数据表明其可以与微管正末端追踪蛋白 EB1 相互作用调控有丝分裂期染色体的周期振荡，对于准确的有丝分裂进程至关重要^[105]。细胞实验显示，CENP-OPQUR 复合物的耗尽不会影响其他 CCAN 成分的定位，推测其作为 CCAN 最外围成分^[78]，可能在最后组装到动粒上。

综上所述，人类内层动粒 CCAN 各亚复合物间高度相互依赖，这暗示了该复合物可能不会在细胞中预先组装好再统一靶向定位至着丝粒，而是可能依赖着丝粒 DNA 或 CENP-A 核小体等这些特异性决定 CCAN 精准识别的分子机制，在着丝粒处进行细胞周期性依赖的动态组装，相关的分子机制正是目前研究的热点！

4、外层动粒 KMN 网络:

当细胞进入有丝分裂期，随着核膜解体，内层动粒组装完成，即可特异性招募外层动粒的 KMN 网络蛋白复合体，进而介导染色体与纺锤体微管之间的稳定连接。如图 1 和图 4A 所示，人类外层动粒由 10 个蛋白质组装成三个亚复合物：KNL1、MIS12 和 NDC80^[106]。NDC80 复合物是微管结合的主要动粒受体，由 NDC80（在人类中也称为 HEC1）、NUF2、SPC24 和 SPC25 四个亚基组成。SPC24-SPC25 和 NDC80-NUF2 异二聚体通过卷曲螺旋结构

域相互作用,形成哑铃状结构,两端功能各异。NDC80-NUF2 异二聚体的球状结构域折叠成钙调蛋白同源结构域,介导与微管的直接结合;SPC24-SPC25 异二聚体球状结构域则通过与 MIS12 复合物或 CCAN 复合物结合,实现 NDC80 复合物的着丝粒靶向定位^[107]。MIS12 复合物作为支架,通过与 CENP-C、CENP-T 的结合将 KMN 网络连接至着丝粒,并桥接 KNL1 和 NDC80 复合物^[108]。KNL1 具有微管结合活性,在体外协同 NDC80 以增强 KMN 网络与微管的结合,同时作为纺锤体组装检验点激酶 MPS1 的底物,在 SAC 信号的募集和活化中起关键作用^[109]。

外层动粒 KMN 网络的组装是一个高度受控的过程,通过多个调节层级发生,内层动粒 CCAN 的高阶结构和磷酸化状态都为其创造了平台。如图 6 所示,有丝分裂期,CCAN 通过 CENP-C 和 CENP-T 介导的两条途径逐步引导 KMN 网络的募集^[79]。MIS12 和 KNL1 在 S 期晚期开始招募至动粒,这一过程由 MIS12 复合物与 CENP-C 的直接相互作用调控^[108, 110],其水平随细胞周期进展逐渐增加,中期达到峰值。另外,外层动粒的协调组装依赖于细胞周期相关激酶的活性和细胞周期特异事件^[111],MIS12 的募集会通过有丝分裂激酶 Aurora B 来进行调节,如在酵母中,MIS12 被磷酸化后会导致其构象发生变化,从而增强其与 CENP-C 之间的相互作用,稳定内外层动粒的组装模式^[112]。当核膜破裂后,NDC80 通过两种机制募集至动粒:一是 MIS12 复合物通过与 CENP-C 相互作用招募单个 NDC80 分子;二是 CENP-T 在 CDK1 作用下直接结合两个 NDC80 分子^[113]。此外,CENP-T 在被 CDK1 磷酸化后可独立招募 MIS12,从而间接招募额外的 NDC80 分子^[114]。尽管 CENP-C 和 CENP-T 均参与外层动粒蛋白的招募,但鸡细胞中的研究表明,CENP-T 在 KMN 网络的招募中起着更关键的作用^[115]。研究人员发现,表达缺乏 MIS12 结合域的 CENP-C 突变体不会影响鸡细胞的有丝分裂进程,而在内源性 CENP-T 敲低的情况下,表达缺乏结合 NDC80 或 MIS12 复合物能力的 CENP-T 突变体则会导致细胞死亡。但是这种差异在哺乳动物中的意义尚不明确。

在有丝分裂的不同阶段,着丝粒通过改变最外层结合蛋白的组成、添加或移除特定成分,在内外层动粒的组装架构基础上实现功能特性的动态调整,形成延伸的纤维状冠状结构。如图 6 所示,在动粒与微管未建立连接时,SAC 蛋白就会靶向着丝粒,激活纺锤体组装检验点,抑制后期起始,而一旦动粒与微管形成稳定连接,这些 SAC 蛋白如 Bub1、MAD2 就会从动粒上脱离。随后,KMN 网络通过与酵母中的 DASH/Dam1 复合物或脊椎动物中的 Astrin、SKA 复合物及 PP1/PP2A 磷酸酶等蛋白的募集,稳定动粒-微管相互作用并沉默纺锤体组装检验点,确保有丝分裂后期的正常起始。

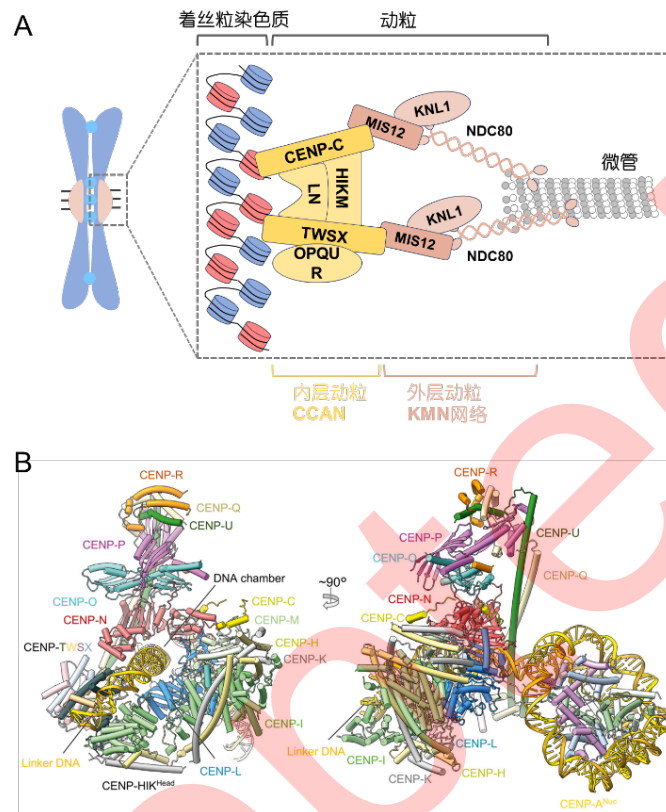


图 4: 人类动粒的组成模式图及 CCAN 复合物的结构^[11, 116]。A、动粒从空间结构上可分为内层动粒 CCAN (Constitutive Centromere Associated Network) 和外层动粒 KMN (KNL1 复合物, MIS12 复合物以及 NDC80 复合物) 网络, 以 CENP-A 核小体为基础, 内层动粒的 CENP-C 和 CENP-TWSX 直接结合 CENP-A, 并招募外层动粒的 MIS12 复合物, 进而结合 KNL1 和 NDC80, 最终稳定动粒-微管连接。B、CCAN 复合物的结构解析发现 CENP-LN 可以形成空腔供 DNA 双链穿过, 整个 CCAN 复合物呈现字母“b”的形态连接在 CENP-A 核小体的一侧。

Figure 4: The architectural organization of the human kinetochore and the structure of the CCAN (Constitutive Centromere Associated Network) complex^[11, 116]. The kinetochore can be divided into two layers: the inner kinetochore layer formed by the CCAN (Constitutive Centromere Associated Network), and the outer kinetochore layer comprising the KMN network (KNL1 complex, MIS12 complex, and NDC80 complex). The CENP-A nucleosome serves as the foundation, with inner kinetochore components CENP-C and CENP-TWSX directly binding both the CENP-A nucleosome and the outer kinetochore MIS12 complex. The MIS12 complex subsequently recruits and stabilizes connections with KNL1 and NDC80 complexes, ultimately mediating kinetochore-microtubule attachment. Structural analyses of the CCAN complex reveal that CENP-LN forms a cavity capable of double-stranded DNA. The entire CCAN complex adopts a distinct "b"-shaped conformation beside to the CENP-A nucleosome.

5、纺锤体组装检验点:

正确的细胞有丝分裂确保了遗传物质的稳定遗传, 细胞进化出一系列监控机制, 对关键节点进行检测以保证过程的准确性。在有丝分裂期, 纺锤体组装检验点蛋白 (SAC) 由 KMN 网络招募至着丝粒, 监测着外层染色体的正确双极定向以及内层 Cohesin 的切割, 确保后期染色体分离的正确起始。SAC 在真核生物中高度保守, 主要成员包括激酶组分 MPS1 和 Bub1、非激酶组分 MAD1、MAD2、Bub3 以及假激酶 BubR1 (酵母 MAD3 的人类同源物)^[117]。

如图 5 所示, APC/C 是细胞分裂的关键调节因子, 作为 E3 泛素连接酶, 通过泛素化 Cyclin B 和 Securin 促进其通过蛋白酶体途径降解^[118], 从而失活 CDK1 激酶和释放激活 Separase 切割酶, 进一步切割内着丝粒 Cohesin 触发姐妹染色单体分离, 启动后期并促使细胞退出有丝分裂。CDC20 是 APC/C 的激活辅助因子, SAC 通过催化 CDC20 结合 MAD2、BubR1/MAD3 和 Bub3 组成异源四聚体, 形成后期抑制复合物 MCC, 从而抑制 CDC20 解离出来去结合并激活 APC/C 活性, 防止染色体过早分离^[119]。

在有丝分裂过程中, 未被微管正确捕获的着丝粒在 CDC20 抑制和 SAC 信号传导中起核心作用, 持续未附着的着丝粒可延迟细胞有丝分裂数小时。大多数 SAC 蛋白靶向定位在未附着的着丝粒上, 一旦微管与动粒正确连接, SAC 蛋白就会脱离动粒^[120]。纺锤体组装检验点激酶 MPS1 在 SAC 信号传导过程中起到了类似分子开关的关键作用, 其可以“感知”未正确连接微管的动粒, 通过磷酸化底物蛋白以促进 SAC 蛋白靶向动粒^[121]。

KMN 网络是 SAC 蛋白组装和信号传导的平台, 破坏 KMN 网络会损害 SAC 蛋白靶向着丝粒和/或 SAC 的活性。细胞生化实验表明, MPS1 可以与 KMN 的多个位点相互作用, 从而介导以 MPS1 为中心的 SAC 信号检验点蛋白的动粒组装。此外, MPS1 的羧基端介导其二聚化, 对其定位和激酶活性至关重要^[122, 123]。与此同时, MPS1 的动粒定位也受其他激酶调控, 数据表明, Aurora B 通过磷酸化 NDC80 从而调控 MPS1 及下游 SAC 蛋白的定位^[124, 125], 但是有关这两个关键激酶如何实现信号动态交流, 以及在纺锤体组装和染色体排列中的具体功能尚不完全清楚。

由 KMN 招募到着丝粒处的 MPS1 可以进一步磷酸化关键底物 KNL1, 促进 SAC 信号的募集和激活。MPS1 在 KNL1 的保守 MELT (M[D/E][I/L/V/M][S/T], 即甲硫氨酸-酸性氨基酸-疏水氨基酸-羟基氨基酸) 重复序列中以 Thr 残基为激酶位点进行磷酸化^[126], 促进 Bub1 的动粒定位, 而 Bub1 的动粒定位对募集 SAC 蛋白 Bub3 和 BubR1/MAD3 又是必要且充分的, 这更加速了 SAC 蛋白在 KMN 网络上的组装^[109]。此外, KNL1 还与 RZZ 复合物 (Rod-Zwilch-ZW10) 相互作用, 并且这种相互作用高度依赖于 MPS1 的激酶活性^[127], 但其是否与 KNL1 自身的磷酸化状态有关尚未可知。这些数据暗示了 MPS1 在着丝粒处可能存在更多尚未鉴定的底物, 这些底物可能是 SAC 信号激活与维持所必需的。如何在不同的动粒微管连接处高效的区域化激活以及失活检验点信号, 并将信号传递至整个细胞网络将是未来研究的重点^[128]。

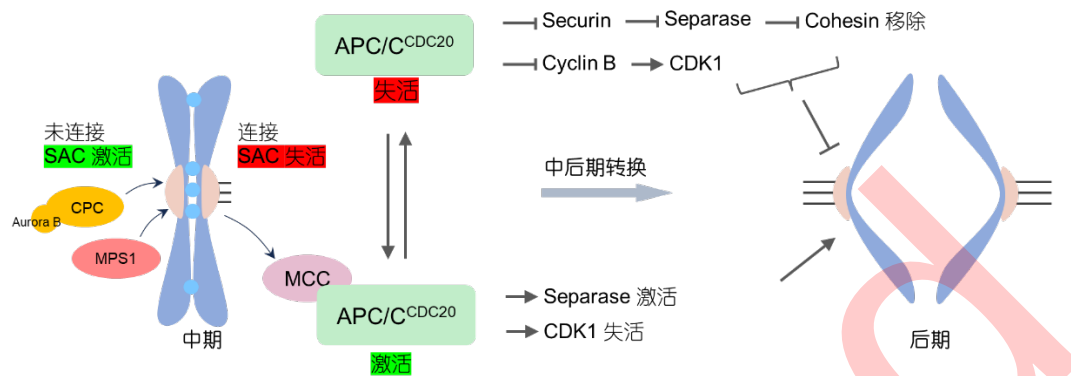


图 5: 纺锤体组装检验点的信号通路^[119], 当染色体尚未与微管建立稳定连接时, 纺锤体组装检验点激酶 MPS1 磷酸化底物蛋白以促进 SAC 蛋白靶向动粒, 染色体乘客复合物 (CPC) 中的核心激酶 Aurora B 可以纠正错误的染色体-微管连接。一旦染色体与微管建立稳定连接, 后期抑制复合物 MCC 中的 CDC20 会脱离着丝粒结合并激活后期起始复合物 APC/C, 从而激活 Separase 移除着丝粒处的 Cohesin, 并失活 CDK1 激酶, 使姐妹染色单体分离, 细胞退出有丝分裂。

Figure 5: The signal pathway of the spindle assembly checkpoint (SAC) ^[119]. When chromosomes have not establish stable microtubule attachment yet, the SAC kinase MPS1 phosphorylates substrate proteins to recruit SAC components to kinetochore. Concurrently, the Aurora B kinase in Chromosomal Passenger Complex (CPC) corrects erroneous kinetochore-microtubule connections. Upon establishment of proper microtubule-kinetochore attachment, CDC20 dissociates from the mitotic checkpoint complex (MCC) at kinetochores and bind with the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) leading to activation of APC/C. This activation triggers two critical events: (1) Separase-mediated cleavage of centromeric Cohesin, and (2) CDK1 kinase inactivation. These coordinated biochemical events promote sister chromatid separation and facilitate mitotic exit, ensuring faithful chromosome segregation.

6、微管马达蛋白在着丝粒处的定位:

正确的染色体分离不仅依赖于 KMN 网络和微管间的高亲和力相互作用, 还需维持微管生长与收缩过程中的持续接触。事实上, 一旦着丝粒与微管末端结合, 染色体运动就可以通过微管的动态聚合或解聚来驱动, 因此揭示着丝粒如何持续附着于动态微管末端也是我们理解染色体分离的核心。从两极中心体发出的微管, 其正端嵌入着丝粒中, 负端则位于或指向纺锤体极, 称为动粒微管 (Kinetochore Microtubule, kMT)。附着在同一动粒上的 kMT 以平行方式相互作用, 并与非 kMT 结合以形成 k 纤维(k Fiber)^[129], k 纤维通过拉力来移动染色体, 其正末端会在定向驱动蛋白 CENP-E 和微管解聚酶 MCAK 的作用下经历重新定向, 使微管正末端稳定地附着在外层动粒 NDC80 复合物上, 以满足纺锤体组装检查点, 允许后期进入^[130]。

CENP-E 作为重要的微管马达蛋白, 在有丝分裂中期向后期的转换过程中发挥着重要作用, 众多研究表明, 敲除或是抑制 CENP-E 会影响中期染色体排列, 导致部分染色体动粒未被微管正确捕获而聚集于纺锤体极附近^[131-137]。在细胞水平上, CENP-E 展现出剧烈的细胞周期依赖性动态定位, 免疫胶体金技术显示, CENP-E 分子在细胞核膜破裂后沿微管正末端

向正在组装中的动粒移动^[136]，在纺锤体组装检验点的调控下，参与染色体由单极定向到双极定向的转变^[137]，并介导染色体在微管上侧向滑行到端向附着的动态过程^[138]。如图 6 所示，当染色体满足双极定向的要求后，CENP-E 可进一步在微管正末端追踪蛋白 SKAP 的作用下稳定住微管-动粒连接^[139-141]，触发 SAC 信号检验点的沉默，相关蛋白开始从动粒上解离，从而阻断了 MCC 复合物的形成。目前普遍认为，动粒定位的马达蛋白 Dynein 通过其微管负向运动能力介导 MAD1、MAD2、MPS1 等 SAC 蛋白从动粒上解离。在这个过程中，Spindly 也发挥着重要作用，其负责 Dynein 的动粒定位，并且在 SAC 失活时，Spindly 本身也是通过 Dynein 的运输从动粒上解离^[142]。近年来，生化技术的进步极大地促进了新型动粒成分的鉴定，众多微管末端结合蛋白（如 TIP150、EB1）可以与着丝粒定位蛋白（如 MCAK、CENP-R）相互作用，并且磷酸化、乙酰化等众多翻译后修饰参与其中^[143-148]，调控了着丝粒处的微管动力学。另外，最新的微管正末端蛋白的液-液相分离（指多价蛋白质或蛋白质-RNA 复合物在特定条件下，如浓度、温度、离子强度，从均相溶液中分离，形成液滴状的致密相和稀薄相的现象，被认为是细胞内无膜细胞器形成的基础）特性研究为揭示着丝粒-染色体连接的分子机制提供了新的视角^[105, 140, 149-151]，这也暗示了在着丝粒最外层，仍有许多分子机制尚未被完全参透^[152]。

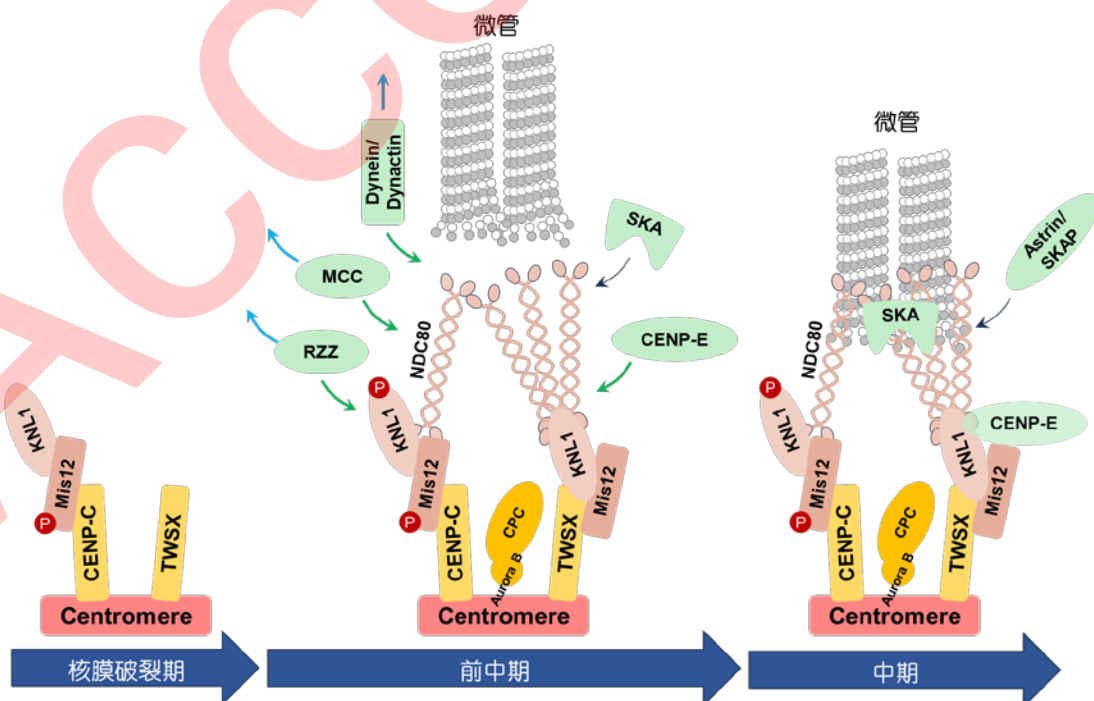


图 6: 着丝粒处各组分在有丝分裂过程中的动态募集过程，改编自参考文献^[79]，在人类细胞中，CCAN 募集外部组分主要有 CENP-C 和 CENP-TWSX 两条途径：一是核膜破裂时，Aurora B 激酶磷酸化的 MIS12 复合物会与 CENP-C 直接相互作用，与磷酸化的 KNL1 复合物一起招募单个 NDC80 分子；二是 CDK1 激酶磷酸化的 CENP-T 直接招募三个 NDC80 分子。在微管尚未与动粒建立连接的情况下，纺锤体组装检查点

组分 (MCC) 和纤维冠组分 (RZZ、CENP-E、Dynein/Dynactin) 会被募集到着丝粒 (绿色箭头所示)。一旦微管与动粒建立正确连接, 纺锤体组装检查点和纤维冠组分被移除 (蓝色箭头所示), 着丝粒进一步招募 SKA 复合物、Astrin/SKAP 等加强这种稳定连接 (黑色箭头所示), 促进 NDC80 复合物与微管的结合, 直至姐妹染色单体分离。

Figure 6: Dynamic recruitment of kinetochore components during mitosis, adapted from reference^[79]. In human cells, the CCAN complex recruit outer kinetochore components primarily through two pathways mediated by CENP-C and CENP-TWSX: (1) CENP-C-dependent pathway: Upon nuclear envelope breakdown, the MIS12 complex, phosphorylated by Aurora B kinase, directly interacts with CENP-C and collaborates with phosphorylated KNL1 to recruit a single NDC80 molecule. (2) CENP-T-dependent pathway: Phosphorylated by CDK1, CENP-T recruits three NDC80 molecules independently. In the absence of microtubule-kinetochore attachments, spindle assembly checkpoint (SAC) components (e.g., the MCC complex) and fibrous corona proteins (e.g., RZZ complex, CENP-E, and Dynein/Dynactin) accumulate at unattached kinetochores (indicated by green arrow). Once correct kinetochore-microtubule interactions are established, the SAC and fibrous corona removed (indicated by blue arrow), then kinetochore further recruits SKA complex and Astrin/SKAP to reinforce microtubule binding (indicated by black arrow), enhancing NDC80-microtubule engagement until sister chromatid separated.

7、未来展望:

7.1 高阶多聚化驱动着丝粒的形成: 经过几十年来对染色体着丝粒处的蛋白质成分鉴定工作, 研究者们建立了基于生化线性连接的着丝粒层级结构模型, 但着丝粒的高阶组装模式与动态规律尚不明确。研究工作发现, 作为着丝粒表观遗传分子, 整条染色体臂定位的较低浓度的 CENP-A 分子不足以招募下游的 CCAN 组分, 而当较高浓度的 CENP-A 沉积在特定基因组位点时, 就可形成局部高浓度区域化 CENP-A 核小体, 进而组装成完整的着丝粒, 与纺锤体微管相互作用^[153]。这种差异表明, CENP-A 分子的密度决定了着丝粒的聚集位置, 浓度依赖式的组装机制可能在着丝粒的形成方面发挥作用。近些年的研究进一步支持了这一假设: 单个 CCAN 复合物可能通过 CENP-C 和/或 CENP-N 的途径招募到着丝粒, 随后这些单个的 CCAN 可能依赖于 CENP-C 的高度无序区相互连接^[67]。研究证明, CENP-C 在连接两到三个 CENP-A 核小体中起到了不可或缺的作用^[113]。Fukagawa 课题组发现 CENP-C 的 Cupin 结构域的寡聚化对 CENP-C 功能、CCAN 的着丝粒定位和着丝粒染色质组织至关重要, 提示 CENP-C 通过寡聚化形成区域性高浓度蛋白, 促进着丝粒/动粒组装^[154]。此外, Cheeseman 课题组在人类细胞中使用两种不同的基因工程系统生成了内层动粒蛋白 CENP-T 的寡聚体, 发现无论是在细胞内还是体外实验中, 每个寡聚化的 CENP-T 分子可以比单体 CENP-T 分子招募到更高水平的外层动粒组分, 这为内层动粒蛋白通过高阶组装从而影响外层动粒蛋白募集提供了分子见解^[155, 156]。这些结果提示, CCAN 蛋白的高局部浓度可能在整个着丝粒的加载组装方面起关键作用, 促进在 CENP-A 核小体 DNA 上组装完整的人类区域性 CCAN。

蛋白质凝聚态构筑无膜细胞器与细胞核精细结构区室化的机制促进了人们对液-液相分离驱动着丝粒高阶蛋白质组装的思考^[1, 157]，作为局部浓缩相互作用蛋白的机制，这种相分离无膜区室被认为是通过蛋白质无序区域之间的相互作用形成的^[1, 105]。人类 CCAN 复合物蛋白大多具有多价性和无序性，基于其多聚化特性，科学家尝试用相分离机制解释内源性 CCAN 复合物的组装。已有研究从液-液相分离的角度解释着丝粒 CPC 的动态定位和组装^[158]，但这一模型最近遭遇挑战，例如：许多体外能形成相分离液滴的蛋白在全细胞裂解液中无法稳定存在^[159]，因此，在细胞内原位解析着丝粒组分是否通过相分离机制进行动态组装仍需更多的方法学、工具与证据支持。然而，越来越多的实验证据表明，着丝粒蛋白可以通过浓度依赖的高阶组装体的形成将其限制在着丝粒这一纳米级的区域范围内，从而调控功能性着丝粒的形成。

7.2 翻译后修饰对着丝粒的动态调控：细胞中大多数蛋白质在表达后都需要经过不同程度的修饰才能发挥相应的功能。这种翻译后修饰过程受到严格的调控，使蛋白质在特定时刻表现出稳定或动态的功能^[144, 146, 160]。在有丝分裂过程中，着丝粒蛋白普遍经历多种翻译后修饰^[112, 161, 162]，这些修饰具有时空特异性，被认为是快速调控动态过程的重要手段^[54, 163, 164]。着丝粒染色质成分的翻译后修饰已成为着丝粒整体结构和功能的重要调节因子^[165]，从内层 H3、H2B 组蛋白磷酸化招募 CPC 复合物和 Sgo1 以稳定姐妹染色单体连接^[42]，到外层 Aurora B 对 NDC80 复合物 N 端无序区的磷酸化调控以纠正错误的微管-动粒连接^[166]，翻译后修饰在整个着丝粒组装中发挥了关键作用。基于有丝分裂期各种磷酸激酶活性的上调，CDK1、PLK1、Aurora B、MPS1 等有丝分裂关键激酶在着丝粒的定位进一步凸显了着丝粒在有丝分裂中的重要性。随着质谱技术的发展，蛋白质组学分析为解析着丝粒翻译后修饰提供了强大技术支持^[167]。未来，设计光化学探针以实现在细胞内原位实时检测这些高速动态的翻译后修饰将是一项新的技术挑战^[98]。

7.3 原位 CCAN 复合物的解析：如图 4B 所示，近期冷冻电镜工作揭示了 CCAN 的结构保守性，从芽殖酵母的点状着丝粒到人类区域性着丝粒，CCAN 核心的 CENP-LN 通道通过与 CENP-A 核小体近端双链 DNA 的识别，结合其他 CCAN 组分形成额外的 DNA 相互作用，构成封闭的 DNA 结合室，将 DNA 双链包裹在腔内^[97, 168, 169]。这种构型解释了着丝粒如何维持对 DNA 的紧密连接以承受后期染色体分离的拉力。然而，该结构也引发了许多问题：首先，电镜仅能解析蛋白质的有序区域，而 CCAN 蛋白大多具有长无序区，且质谱数据表明这些无序区存在大量翻译后修饰（如磷酸化），如何解释这些无序区的功能及修饰的调控作用仍是一个重大挑战。其次，细胞内着丝粒为高度致密结构，体外研究表明 CCAN

复合物与 CENP-A 核小体以 1:1 比例结合,但在细胞内原位环境下,这些复合物的化学计量比如何?它们如何在不同有丝分裂时期通过翻译后修饰调控相互作用以形成高阶着丝粒结构?以及这些高阶结构如何最终招募 KMN 网络组装完整着丝粒?这些问题都是未来研究的重点。解答这些问题可能需要整合冷冻电子断层扫描(Cryo-ET)和超分辨光镜-电镜关联成像(CLEM)等先进技术手段^[170],值得注意的是,Ben Black 课题组的最新研究表明,冷冻电子断层扫描技术可用于人类有丝分裂不同染色体精细结构如核小体数目的定量研究^[171],该研究首次揭示了着丝粒区域存在 20-25 nm 的核小体相关复合物,这一特征性结构明显区别于周围染色质。通过蛋白质瞬时敲低实验,研究团队进一步证实了 CENP-C 和 CENP-N 等着丝粒成分对维持该复合物原位结构完整的必要性。相信在未来,在细胞与类器官原位环境下系统解析着丝粒的不同构象状态,阐明其在细胞周期进程中的动态结构变化,将为深入理解着丝粒的动态组装机制及其生物学功能提供重要的实验依据和理论支撑。

7.4 新型技术在着丝粒研究上的应用:高通量单细胞基因组测序、时空超高分辨率显微镜以及单分子技术的广泛应用,推动了着丝粒在生命活动中新功能的探索。最新测序工作已成功绘制人类着丝粒的完整基因组和表观遗传图谱,描绘了高分辨率的着丝粒区域结构^[172, 173]。研究发现,部分着丝粒 α -Sat 序列经历大规模染色体结构重排,且低 CpG 甲基化区域与 CENP-A 定位密切相关,为动粒组装提供了更细致的表观遗传机制。有趣的是,研究人员提出并验证了着丝粒 α -Sat 进化的“分层扩张”模型,从进化动力学角度解读了着丝粒的新功能。另有一项研究利用定量超高分辨率成像技术对染色体上 Cohesin 复合物进行化学计量测量,实现了细胞内蛋白质单体的可视化^[174],发现复制后姐妹染色单体的凝聚力是由单个 Cohesin 环赋予的。此外,最新研究表明可以实现向哺乳细胞内递送表达单拷贝的人工染色体(Human Artificial Chromosome, HAC),其可以携带大量工程基因,以预定的排列方式实现蛋白质复合物的精细组装^[175],这种人工设计的染色体着丝粒 CENP-A 核小体位点可在细胞内完成动粒组装及微管捕获,实现 HAC 的均等分离。这些新兴技术的发展将深化我们对着丝粒层级组装模式与相分离驱动区室化模式的比较^[134],未来,利用单细胞组学探究细胞类型或染色体类型之间的序列重排与表观遗传变异,辅以单分子可视化工程,将使得我们在细胞内组装人工染色体着丝粒成为可能!

8、结语

着丝粒作为确保有丝分裂过程中染色体精确分离的关键结构,其动态组装机制的研究一直是细胞生物学领域的核心科学问题之一。近年来,随着生物化学技术的革新和电子显微镜分辨率的显著提升,着丝粒形成过程的动态全景似乎正在慢慢的浮出水面。对于动粒复合物

体外重组实验体系的建立，科研人员在 CCAN、KMN 网络结构解析方面取得了突破性进展^[97, 168, 169, 176]，同时，动粒原位功能的研究^[171]，尤其是动粒-微管相互作用界面的新发现^[143, 147, 149]，为阐明微管正末端蛋白在着丝粒处的特异性功能提供了重要线索。然而，由于着丝粒结构的高度致密性及其复杂的蛋白质相互作用网络，该领域的研究仍面临诸多挑战，海量实验数据亟待标准化、深入分析和模型化。目前，该领域仍存在若干关键科学问题有待解决：首先，着丝粒特有的 DNA 高阶重复结构是否在着丝粒蛋白质组装过程中发挥关键作用？其次，着丝粒特异性表观遗传标记 CENP-A 核小体在着丝粒区域的扩散分布机制如何调控？再者，动粒在不同细胞周期阶段的动态组装模式及其调控网络是怎样的？最后，动粒如何通过组装形成成熟的高阶结构来精确调控其生物学功能？这些问题的解答将成为未来研究的重点方向。随着单分子技术的快速发展和超高分辨率显微成像技术的突破，我们期待能够在细胞内原位环境下全面解析着丝粒的动态组装过程及其分子调控机制。这些研究不仅将深化我们对有丝分裂分子机制的理解，更有望为攻克因有丝分裂异常导致的染色体不稳定性相关疾病提供新的理论依据和治疗策略。

参考文献:

- [1] LIU X, WANG H, DOU Z, et al. Phase separation drives decision making in cell division [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2020, 295(39): 13419-13431.
- [2] CLEVELAND D W, MAO Y, SULLIVAN K F. Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling [J]. *Cell*, 2003, 112(4): 407-21.
- [3] CHEESEMAN I M, DESAI A. Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface [J]. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2008, 9(1): 33-46.
- [4] MCKINLEY K L, CHEESEMAN I M. The molecular basis for centromere identity and function [J]. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2016, 17(1): 16-29.
- [5] EARNSHAW W C, ROTHFIELD N. Identification of a family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma [J]. *Chromosoma*, 1985, 91(3-4): 313-21.
- [6] PALMER D K, O'DAY K, TRONG H L, et al. Purification of the centromere-specific protein CENP-A and demonstration that it is a distinctive histone [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88(9): 3734-8.
- [7] BLACK B E, CLEVELAND D W. Epigenetic centromere propagation and the nature of CENP-a nucleosomes [J]. *Cell*, 2011, 144(4): 471-9.
- [8] WEIR J R, FAESEN A C, KLARE K, et al. Insights from biochemical reconstitution into the architecture of human kinetochores [J]. *Nature*, 2016, 537(7619): 249-53.
- [9] FUNK L, SU K C, LY J, et al. The phenotypic landscape of essential human genes [J]. *Cell*, 2022, 185(24): 4634-53.e22.
- [10] PLUTA A F, MACKAY A M, AINSZTEIN A M, et al. The centromere: hub of chromosomal activities [J]. *Science (New York, NY)*, 1995, 270(5242): 1591-4.
- [11] YATSKOVICH S, BARFORD D, MUIR K W. Conserved and divergent mechanisms of inner kinetochore assembly onto centromeric chromatin [J]. *Current opinion in structural biology*, 2023, 81: 102638.
- [12] GUERRA M, CABRAL G, CUACOS M, et al. Neocentrics and holokinetics (holocentrics): chromosomes out of the centromeric rules [J]. *Cytogenetic and genome research*, 2010, 129(1-3): 82-96.
- [13] NURK S, KOREN S, RHIE A, et al. The complete sequence of a human genome [J]. *Science (New York, NY)*, 2022, 376(6588): 44-53.
- [14] BLOWER M D, SULLIVAN B A, KARPEN G H. Conserved organization of centromeric chromatin in flies and humans [J]. *Developmental cell*, 2002, 2(3): 319-30.
- [15] DUNLEAVY E M, ALMOUZNI G, KARPEN G H. H3.3 is deposited at centromeres in S phase as a placeholder for newly assembled CENP-A in G₁ phase [J]. *Nucleus (Austin, Tex)*, 2011, 2(2): 146-57.
- [16] ALTEMOSE N, MASLAN A, SMITH O K, et al. DiMeLo-seq: a long-read, single-molecule method for mapping protein-DNA interactions genome wide [J]. *Nature methods*, 2022, 19(6): 711-23.
- [17] MASUMOTO H, MASUKATA H, MURO Y, et al. A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromeric satellite [J]. *The Journal of cell biology*, 1989, 109(5): 1963-73.
- [18] PEREZ-CASTRO A V, SHAMANSKI F L, MENESES J J, et al. Centromeric protein B null mice are viable with no apparent abnormalities [J]. *Developmental biology*, 1998, 201(2):

135-43.

- [19] MIGA K H, NEWTON Y, JAIN M, et al. Centromere reference models for human chromosomes X and Y satellite arrays [J]. *Genome research*, 2014, 24(4): 697-707.
- [20] OKAZAKI K, NAKANO M, OHZEKI J I, et al. Combination of CENP-B Box Positive and Negative Synthetic Alpha Satellite Repeats Improves De Novo Human Artificial Chromosome Formation [J]. *Cells*, 2022, 11(9).
- [21] OHZEKI J I, OTAKE K, MASUMOTO H. Human artificial chromosome: Chromatin assembly mechanisms and CENP-B [J]. *Experimental cell research*, 2020, 389(2): 111900.
- [22] CHARDON F, JAPARIDZE A, WITT H, et al. CENP-B-mediated DNA loops regulate activity and stability of human centromeres [J]. *Molecular cell*, 2022, 82(9): 1751-67.e8.
- [23] OTAKE K, OHZEKI J I, SHONO N, et al. CENP-B creates alternative epigenetic chromatin states permissive for CENP-A or heterochromatin assembly [J]. *Journal of cell science*, 2020, 133(15).
- [24] OHTA S, OHZEKI J I, SATO N, et al. Novel role of zinc-finger protein 518 in heterochromatin formation on α -satellite DNA [J]. *Nucleic acids research*, 2025, 53(2).
- [25] NAGPAL H, ALI-AHMAD A, HIRANO Y, et al. CENP-A and CENP-B collaborate to create an open centromeric chromatin state [J]. *Nature communications*, 2023, 14(1): 8227.
- [26] ISHIKURA S, YOSHIDA K, HASHIMOTO S, et al. CENP-B promotes the centromeric localization of ZFAT to control transcription of noncoding RNA [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2021, 297(4): 101213.
- [27] HOENCAMP C, ROWLAND B D. Genome control by SMC complexes [J]. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2023, 24(9): 633-50.
- [28] HIRANO T. At the heart of the chromosome: SMC proteins in action [J]. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2006, 7(5): 311-22.
- [29] DAVIDSON I F, PETERS J M. Genome folding through loop extrusion by SMC complexes [J]. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2021, 22(7): 445-64.
- [30] MICHAELIS C, CIOSK R, NASMYTH K. Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids [J]. *Cell*, 1997, 91(1): 35-45.
- [31] ZHANG H, EMERSON D J, GILGENAST T G, et al. Chromatin structure dynamics during the mitosis-to-G1 phase transition [J]. *Nature*, 2019, 576(7785): 158-62.
- [32] CIOSK R, SHIRAYAMA M, SHEVCHENKO A, et al. Cohesin's binding to chromosomes depends on a separate complex consisting of Scc2 and Scc4 proteins [J]. *Molecular cell*, 2000, 5(2): 243-54.
- [33] DAVIDSON I F, BARTH R, ZACZEK M, et al. CTCF is a DNA-tension-dependent barrier to cohesin-mediated loop extrusion [J]. *Nature*, 2023, 616(7958): 822-7.
- [34] RANKIN S, AYAD N G, KIRSCHNER M W. Sororin, a substrate of the anaphase-promoting complex, is required for sister chromatid cohesion in vertebrates [J]. *Molecular cell*, 2005, 18(2): 185-200.
- [35] PETERS J M, NISHIYAMA T. Sister chromatid cohesion [J]. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2012, 4(11).
- [36] WATANABE Y. Geometry and force behind kinetochore orientation: lessons from meiosis [J]. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2012, 13(6): 370-82.
- [37] ARCHAMBAULT V, GLOVER D M. Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation [J]. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2009, 10(4): 265-75.

- [38] TANG Z, SHU H, QI W, et al. PP2A is required for centromeric localization of Sgo1 and proper chromosome segregation [J]. *Developmental cell*, 2006, 10(5): 575-85.
- [39] UHLMANN F. Separase regulation during mitosis [J]. *Biochemical Society symposium*, 2003, (70): 243-51.
- [40] LIN Z, LUO X, YU H. Structural basis of cohesin cleavage by separase [J]. *Nature*, 2016, 532(7597): 131-4.
- [41] MUSACCHIO A. Molecular biology. Surfing chromosomes (and Survivin) [J]. *Science (New York, NY)*, 2010, 330(6001): 183-4.
- [42] YAMAGISHI Y, HONDA T, TANNO Y, et al. Two histone marks establish the inner centromere and chromosome bi-orientation [J]. *Science (New York, NY)*, 2010, 330(6001): 239-43.
- [43] KELLY A E, GHENOIU C, XUE J Z, et al. Survivin reads phosphorylated histone H3 threonine 3 to activate the mitotic kinase Aurora B [J]. *Science (New York, NY)*, 2010, 330(6001): 235-9.
- [44] KAWASHIMA S A, YAMAGISHI Y, HONDA T, et al. Phosphorylation of H2A by Bub1 prevents chromosomal instability through localizing shugoshin [J]. *Science (New York, NY)*, 2010, 327(5962): 172-7.
- [45] RUCHAUD S, CARMENA M, EARNSHAW W C. Chromosomal passengers: conducting cell division [J]. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2007, 8(10): 798-812.
- [46] CHU Y, YAO P Y, WANG W, et al. Aurora B kinase activation requires survivin priming phosphorylation by PLK1 [J]. *Journal of molecular cell biology*, 2011, 3(4): 260-7.
- [47] DEWAR H, TANAKA K, NASMYTH K, et al. Tension between two kinetochores suffices for their bi-orientation on the mitotic spindle [J]. *Nature*, 2004, 428(6978): 93-7.
- [48] LIU D, VADER G, VROMANS M J, et al. Sensing chromosome bi-orientation by spatial separation of aurora B kinase from kinetochore substrates [J]. *Science (New York, NY)*, 2009, 323(5919): 1350-3.
- [49] LIU D, LAMPSON M A. Regulation of kinetochore-microtubule attachments by Aurora B kinase [J]. *Biochemical Society transactions*, 2009, 37(Pt 5): 976-80.
- [50] WELBURN J P, VLEUGEL M, LIU D, et al. Aurora B phosphorylates spatially distinct targets to differentially regulate the kinetochore-microtubule interface [J]. *Molecular cell*, 2010, 38(3): 383-92.
- [51] LIU X, SONG Z, HUO Y, et al. Chromatin protein HP1 interacts with the mitotic regulator borealin protein and specifies the centromere localization of the chromosomal passenger complex [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2014, 289(30): 20638-49.
- [52] CHU L, HUO Y, LIU X, et al. The spatiotemporal dynamics of chromatin protein HP1 α is essential for accurate chromosome segregation during cell division [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2014, 289(38): 26249-62.
- [53] FU G, DING X, YUAN K, et al. Phosphorylation of human Sgo1 by NEK2A is essential for chromosome congression in mitosis [J]. *Cell research*, 2007, 17(7): 608-18.
- [54] SHAO H, HUANG Y, ZHANG L, et al. Spatiotemporal dynamics of Aurora B-PLK1-MCAK signaling axis orchestrates kinetochore bi-orientation and faithful chromosome segregation [J]. *Scientific reports*, 2015, 5: 12204.
- [55] CARMENA M, WHEELLOCK M, FUNABIKI H, et al. The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis [J]. *Nature reviews Molecular cell biology*,

- 2012, 13(12): 789-803.
- [56] ZHANG L, SHAO H, HUANG Y, et al. PLK1 phosphorylates mitotic centromere-associated kinesin and promotes its depolymerase activity [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2011, 286(4): 3033-46.
 - [57] PRZEWLOKA M R, GLOVER D M. The kinetochore and the centromere: a working long distance relationship [J]. *Annual review of genetics*, 2009, 43: 439-65.
 - [58] PERPELESCU M, FUKAGAWA T. The ABCs of CENPs [J]. *Chromosoma*, 2011, 120(5): 425-46.
 - [59] KALE S, BOOPATHI R, BELOTTI E, et al. The CENP-A nucleosome: where and when it happens during the inner kinetochore's assembly [J]. *Trends in biochemical sciences*, 2023, 48(10): 849-59.
 - [60] HU H, LIU Y, WANG M, et al. Structure of a CENP-A-histone H4 heterodimer in complex with chaperone HJURP [J]. *Genes & development*, 2011, 25(9): 901-6.
 - [61] STELLFOX M E, BAILEY A O, FOLTZ D R. Putting CENP-A in its place [J]. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 2013, 70(3): 387-406.
 - [62] MÜLLER S, MONTES DE OCA R, LACOSTE N, et al. Phosphorylation and DNA binding of HJURP determine its centromeric recruitment and function in CenH3(CENP-A) loading [J]. *Cell reports*, 2014, 8(1): 190-203.
 - [63] JANSEN L E, BLACK B E, FOLTZ D R, et al. Propagation of centromeric chromatin requires exit from mitosis [J]. *The Journal of cell biology*, 2007, 176(6): 795-805.
 - [64] CHITTORI S, HONG J, SAUNDERS H, et al. Structural mechanisms of centromeric nucleosome recognition by the kinetochore protein CENP-N [J]. *Science (New York, NY)*, 2018, 359(6373): 339-43.
 - [65] TIAN T, LI X, LIU Y, et al. Molecular basis for CENP-N recognition of CENP-A nucleosome on the human kinetochore [J]. *Cell research*, 2018, 28(3): 374-8.
 - [66] CARROLL C W, MILKS K J, STRAIGHT A F. Dual recognition of CENP-A nucleosomes is required for centromere assembly [J]. *The Journal of cell biology*, 2010, 189(7): 1143-55.
 - [67] KLARE K, WEIR J R, BASILICO F, et al. CENP-C is a blueprint for constitutive centromere-associated network assembly within human kinetochores [J]. *The Journal of cell biology*, 2015, 210(1): 11-22.
 - [68] ARIYOSHI M, MAKINO F, WATANABE R, et al. Cryo-EM structure of the CENP-A nucleosome in complex with phosphorylated CENP-C [J]. *The EMBO journal*, 2021, 40(5): e105671.
 - [69] WATANABE R, HARA M, OKUMURA E I, et al. CDK1-mediated CENP-C phosphorylation modulates CENP-A binding and mitotic kinetochore localization [J]. *The Journal of cell biology*, 2019, 218(12): 4042-62.
 - [70] SRIVASTAVA S, FOLTZ D R. Posttranslational modifications of CENP-A: marks of distinction [J]. *Chromosoma*, 2018, 127(3): 279-90.
 - [71] KUNITOKU N, SASAYAMA T, MARUMOTO T, et al. CENP-A phosphorylation by Aurora-A in prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function [J]. *Developmental cell*, 2003, 5(6): 853-64.
 - [72] BARRA V, LOGSDON G A, SCELFO A, et al. Phosphorylation of CENP-A on serine 7 does not control centromere function [J]. *Nature communications*, 2019, 10(1): 175.
 - [73] FACHINETTI D, LOGSDON G A, ABDULLAH A, et al. CENP-A Modifications on Ser68

- and Lys124 Are Dispensable for Establishment, Maintenance, and Long-Term Function of Human Centromeres [J]. *Developmental cell*, 2017, 40(1): 104-13.
- [74] FOLTZ D R, JANSEN L E, BLACK B E, et al. The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex [J]. *Nature cell biology*, 2006, 8(5): 458-69.
- [75] OKADA M, CHEESEMAN I M, HORI T, et al. The CENP-H-I complex is required for the efficient incorporation of newly synthesized CENP-A into centromeres [J]. *Nature cell biology*, 2006, 8(5): 446-57.
- [76] WU F, AKBAR H, WANG C, et al. Sgo1 interacts with CENP-A to guide accurate chromosome segregation in mitosis [J]. *Journal of molecular cell biology*, 2024, 15(10).
- [77] STIRPE A, HEUN P. The ins and outs of CENP-A: Chromatin dynamics of the centromere-specific histone [J]. *Seminars in cell & developmental biology*, 2023, 135: 24-34.
- [78] PESENTI M E, PRUMBAUM D, AUCKLAND P, et al. Reconstitution of a 26-Subunit Human Kinetochore Reveals Cooperative Microtubule Binding by CENP-OPQUR and NDC80 [J]. *Molecular cell*, 2018, 71(6): 923-39.e10.
- [79] NAVARRO A P, CHEESEMAN I M. Kinetochore assembly throughout the cell cycle [J]. *Seminars in cell & developmental biology*, 2021, 117: 62-74.
- [80] HE S, WANG C, SHAO H, et al. Phosphorylation of CENP-C by PLK1 ensures accurate chromosome congression during mitosis [J]. *Journal of molecular cell biology*, 2025.
- [81] NAVARRO A P, CHEESEMAN I M. Dynamic cell cycle-dependent phosphorylation modulates CENP-L-CENP-N centromere recruitment [J]. *Molecular biology of the cell*, 2022, 33(10): ar87.
- [82] ZHOU K, GEBALA M, WOODS D, et al. CENP-N promotes the compaction of centromeric chromatin [J]. *Nature structural & molecular biology*, 2022, 29(4): 403-13.
- [83] FANG J, LIU Y, WEI Y, et al. Structural transitions of centromeric chromatin regulate the cell cycle-dependent recruitment of CENP-N [J]. *Genes & development*, 2015, 29(10): 1058-73.
- [84] GUO L Y, ALLU P K, ZANDARASHVILI L, et al. Centromeres are maintained by fastening CENP-A to DNA and directing an arginine anchor-dependent nucleosome transition [J]. *Nature communications*, 2017, 8: 15775.
- [85] LIU R, DOU Z, TIAN T, et al. Dynamic phosphorylation of CENP-N by CDK1 guides accurate chromosome segregation in mitosis [J]. *Journal of molecular cell biology*, 2023, 15(6).
- [86] MCKINLEY K L, SEKULIC N, GUO L Y, et al. The CENP-L-N Complex Forms a Critical Node in an Integrated Meshwork of Interactions at the Centromere-Kinetochore Interface [J]. *Molecular cell*, 2015, 60(6): 886-98.
- [87] HU L, HUANG H, HEI M, et al. Structural analysis of fungal CENP-H/I/K homologs reveals a conserved assembly mechanism underlying proper chromosome alignment [J]. *Nucleic acids research*, 2019, 47(1): 468-79.
- [88] NISHIHASHI A, HARAGUCHI T, HIRAOKA Y, et al. CENP-I is essential for centromere function in vertebrate cells [J]. *Developmental cell*, 2002, 2(4): 463-76.
- [89] HU L, ZHAO C, LIU M, et al. CENP-I directly targets centromeric DNA to support CENP-A deposition and centromere maintenance [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120(11): e2219170120.
- [90] BASILICO F, MAFFINI S, WEIR J R, et al. The pseudo GTPase CENP-M drives human kinetochore assembly [J]. *eLife*, 2014, 3: e02978.

- [91] DUROJAYE O A, YANG F, GAO X, et al. Probing centromere-kinetochore core complex CENP-L/M assembly using cenpeclin [J]. *Journal of molecular cell biology*, 2024.
- [92] SRIDHAR S, FUKAGAWA T. Kinetochore Architecture Employs Diverse Linker Strategies Across Evolution [J]. *Frontiers in cell and developmental biology*, 2022, 10: 862637.
- [93] HARA M, FUKAGAWA T. Where is the right path heading from the centromere to spindle microtubules? [J]. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*, 2019, 18(11): 1199-211.
- [94] HORI T, AMANO M, SUZUKI A, et al. CCAN makes multiple contacts with centromeric DNA to provide distinct pathways to the outer kinetochore [J]. *Cell*, 2008, 135(6): 1039-52.
- [95] DING M, JIANG J, YANG F, et al. Holliday junction recognition protein interacts with and specifies the centromeric assembly of CENP-T [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2019, 294(3): 968-80.
- [96] JIAN Y, NIE L, LIU S, et al. The fission yeast kinetochore complex Mhf1-Mhf2 regulates the spindle assembly checkpoint and faithful chromosome segregation [J]. *Journal of cell science*, 2023, 136(2).
- [97] YATSKEVICH S, MUIR K W, BELLINI D, et al. Structure of the human inner kinetochore bound to a centromeric CENP-A nucleosome [J]. *Science (New York, NY)*, 2022, 376(6595): 844-52.
- [98] DOU Z, LIU R, GUI P, et al. Fluorescence complementation-based FRET imaging reveals centromere assembly dynamics [J]. *Molecular biology of the cell*, 2024, 35(4): ar51.
- [99] TAKEUCHI K, NISHINO T, MAYANAGI K, et al. The centromeric nucleosome-like CENP-T-W-S-X complex induces positive supercoils into DNA [J]. *Nucleic acids research*, 2014, 42(3): 1644-55.
- [100] TAO Y, JIN C, LI X, et al. The structure of the FANCM-MHF complex reveals physical features for functional assembly [J]. *Nature communications*, 2012, 3: 782.
- [101] SEDZRO D M, YUAN X, MULLEN M, et al. Phosphorylation of CENP-R by Aurora B regulates kinetochore-microtubule attachment for accurate chromosome segregation [J]. *Journal of molecular cell biology*, 2022, 14(7).
- [102] HUA S, WANG Z, JIANG K, et al. CENP-U cooperates with Hec1 to orchestrate kinetochore-microtubule attachment [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2011, 286(2): 1627-38.
- [103] BANCROFT J, AUCLAND P, SAMORA C P, et al. Chromosome congression is promoted by CENP-Q- and CENP-E-dependent pathways [J]. *Journal of cell science*, 2015, 128(1): 171-84.
- [104] SINGH P, PESENTI M E, MAFFINI S, et al. BUB1 and CENP-U, Primed by CDK1, Are the Main PLK1 Kinetochore Receptors in Mitosis [J]. *Molecular cell*, 2021, 81(1): 67-87.e9.
- [105] HU C, HU Q, YANG T, et al. Condensation-dependent multivalent interactions of EB1 and CENP-R regulate chromosome oscillations in mitosis [J]. *Cell reports*, 2025, 44(5): 115560.
- [106] CHEESEMAN I M, CHAPPIE J S, WILSON-KUBALEK E M, et al. The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore [J]. *Cell*, 2006, 127(5): 983-97.
- [107] CIFERRI C, PASQUALATO S, SCREPANTI E, et al. Implications for kinetochore-microtubule attachment from the structure of an engineered Ndc80 complex [J]. *Cell*, 2008, 133(3): 427-39.
- [108] SCREPANTI E, DE ANTONI A, ALUSHIN G M, et al. Direct binding of Cenp-C to the

- Mis12 complex joins the inner and outer kinetochore [J]. *Current biology : CB*, 2011, 21(5): 391-8.
- [109] YAMAGISHI Y, YANG C H, TANNO Y, et al. MPS1/Mph1 phosphorylates the kinetochore protein KNL1/Spc7 to recruit SAC components [J]. *Nature cell biology*, 2012, 14(7): 746-52.
 - [110] PETROVIC A, KELLER J, LIU Y, et al. Structure of the MIS12 Complex and Molecular Basis of Its Interaction with CENP-C at Human Kinetochores [J]. *Cell*, 2016, 167(4): 1028-40.e15.
 - [111] GASCOIGNE K E, CHEESEMAN I M. Kinetochore assembly: if you build it, they will come [J]. *Current opinion in cell biology*, 2011, 23(1): 102-8.
 - [112] ZHOU X, ZHENG F, WANG C, et al. Phosphorylation of CENP-C by Aurora B facilitates kinetochore attachment error correction in mitosis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(50): E10667-e76.
 - [113] WALSTEIN K, PETROVIC A, PAN D, et al. Assembly principles and stoichiometry of a complete human kinetochore module [J]. *Science advances*, 2021, 7(27).
 - [114] HUIS IN 'T VELD P J, JEGANATHAN S, PETROVIC A, et al. Molecular basis of outer kinetochore assembly on CENP-T [J]. *eLife*, 2016, 5.
 - [115] TAKENOSHITA Y, HARA M, FUKAGAWA T. Recruitment of two Ndc80 complexes via the CENP-T pathway is sufficient for kinetochore functions [J]. *Nature communications*, 2022, 13(1): 851.
 - [116] HARA M, FUKAGAWA T. Kinetochore assembly and disassembly during mitotic entry and exit [J]. *Current opinion in cell biology*, 2018, 52: 73-81.
 - [117] HWANG L H, LAU L F, SMITH D L, et al. Budding yeast Cdc20: a target of the spindle checkpoint [J]. *Science (New York, NY)*, 1998, 279(5353): 1041-4.
 - [118] PETERS J M. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy [J]. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2006, 7(9): 644-56.
 - [119] MCAINSH A D, KOPS G. Principles and dynamics of spindle assembly checkpoint signalling [J]. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2023, 24(8): 543-59.
 - [120] MUSACCHIO A, SALMON E D. The spindle-assembly checkpoint in space and time [J]. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2007, 8(5): 379-93.
 - [121] MACIEJOWSKI J, GEORGE K A, TERRET M E, et al. Mps1 directs the assembly of Cdc20 inhibitory complexes during interphase and mitosis to control M phase timing and spindle checkpoint signaling [J]. *The Journal of cell biology*, 2010, 190(1): 89-100.
 - [122] DOU Z, LIU X, WANG W, et al. Dynamic localization of Mps1 kinase to kinetochores is essential for accurate spindle microtubule attachment [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(33): E4546-55.
 - [123] GUI P, SEDZRO D M, YUAN X, et al. Mps1 dimerization and multisite interactions with Ndc80 complex enable responsive spindle assembly checkpoint signaling [J]. *Journal of molecular cell biology*, 2020, 12(7): 486-98.
 - [124] ZHU T, DOU Z, QIN B, et al. Phosphorylation of microtubule-binding protein Hec1 by mitotic kinase Aurora B specifies spindle checkpoint kinase Mps1 signaling at the kinetochore [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2013, 288(50): 36149-59.
 - [125] KEMMLER S, STACH M, KNAPP M, et al. Mimicking Ndc80 phosphorylation triggers spindle assembly checkpoint signalling [J]. *The EMBO journal*, 2009, 28(8): 1099-110.
 - [126] CHEESEMAN I M, NIESSEN S, ANDERSON S, et al. A conserved protein network controls

- assembly of the outer kinetochore and its ability to sustain tension [J]. *Genes & development*, 2004, 18(18): 2255-68.
- [127] KOPS G J, KIM Y, WEAVER B A, et al. ZW10 links mitotic checkpoint signaling to the structural kinetochore [J]. *The Journal of cell biology*, 2005, 169(1): 49-60.
 - [128] LIU S, YUAN X, GUI P, et al. Mad2 promotes Cyclin B2 recruitment to the kinetochore for guiding accurate mitotic checkpoint [J]. *EMBO reports*, 2022, 23(6): e54171.
 - [129] MCDONALD K L, O'TOOLE E T, MASTRONARDE D N, et al. Kinetochore microtubules in PTK cells [J]. *The Journal of cell biology*, 1992, 118(2): 369-83.
 - [130] LONG A F, KUHN J, DUMONT S. The mammalian kinetochore-microtubule interface: robust mechanics and computation with many microtubules [J]. *Current opinion in cell biology*, 2019, 60: 60-7.
 - [131] YEN T J, COMPTON D A, WISE D, et al. CENP-E, a novel human centromere-associated protein required for progression from metaphase to anaphase [J]. *The EMBO journal*, 1991, 10(5): 1245-54.
 - [132] LIU X, XU L, LI J, et al. Mitotic motor CENP-E cooperates with PRC1 in temporal control of central spindle assembly [J]. *Journal of molecular cell biology*, 2020, 12(8): 654-65.
 - [133] DING X, YAN F, YAO P, et al. Probing CENP-E function in chromosome dynamics using small molecule inhibitor syntelin [J]. *Cell research*, 2010, 20(12): 1386-9.
 - [134] YAO X, FANG G. Visualization and orchestration of the dynamic molecular society in cells [J]. *Cell research*, 2009, 19(2): 152-5.
 - [135] LIU D, DING X, DU J, et al. Human NUF2 interacts with centromere-associated protein E and is essential for a stable spindle microtubule-kinetochore attachment [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2007, 282(29): 21415-24.
 - [136] YAO X, ANDERSON K L, CLEVELAND D W. The microtubule-dependent motor centromere-associated protein E (CENP-E) is an integral component of kinetochore corona fibers that link centromeres to spindle microtubules [J]. *The Journal of cell biology*, 1997, 139(2): 435-47.
 - [137] YAO X, ABRIEU A, ZHENG Y, et al. CENP-E forms a link between attachment of spindle microtubules to kinetochores and the mitotic checkpoint [J]. *Nature cell biology*, 2000, 2(8): 484-91.
 - [138] HUANG Y, LIN L, LIU X, et al. BubR1 phosphorylates CENP-E as a switch enabling the transition from lateral association to end-on capture of spindle microtubules [J]. *Cell research*, 2019, 29(7): 562-78.
 - [139] HUANG Y, WANG W, YAO P, et al. CENP-E kinesin interacts with SKAP protein to orchestrate accurate chromosome segregation in mitosis [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2012, 287(2): 1500-9.
 - [140] ZHANG M, YANG F, WANG W, et al. SKAP interacts with Aurora B to guide end-on capture of spindle microtubules via phase separation [J]. *Journal of molecular cell biology*, 2022, 13(12): 841-52.
 - [141] WANG X, ZHUANG X, CAO D, et al. Mitotic regulator SKAP forms a link between kinetochore core complex KMN and dynamic spindle microtubules [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2012, 287(47): 39380-90.
 - [142] GASSMANN R, HOLLAND A J, VARMA D, et al. Removal of Spindly from microtubule-attached kinetochores controls spindle checkpoint silencing in human cells [J].

- Genes & development, 2010, 24(9): 957-71.
- [143] JIANG K, WANG J, LIU J, et al. TIP150 interacts with and targets MCAK at the microtubule plus ends [J]. EMBO reports, 2009, 10(8): 857-65.
 - [144] WARD T, WANG M, LIU X, 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]. The Journal of biological chemistry, 2013, 288(22): 15771-85.
 - [145] XIA P, ZHOU J, SONG X, et al. Aurora A orchestrates entosis by regulating a dynamic MCAK-TIP150 interaction [J]. Journal of molecular cell biology, 2014, 6(3): 240-54.
 - [146] SONG X, YANG F, LIU X, et al. Dynamic crotonylation of EB1 by TIP60 ensures accurate spindle positioning in mitosis [J]. Nature chemical biology, 2021, 17(12): 1314-23.
 - [147] ZHU L, WANG Z, WANG W, et al. Mitotic Protein CSPP1 Interacts with CENP-H Protein to Coordinate Accurate Chromosome Oscillation in Mitosis [J]. The Journal of biological chemistry, 2015, 290(45): 27053-66.
 - [148] LIU J, WANG Z, JIANG K, et al. PRC1 cooperates with CLASP1 to organize central spindle plasticity in mitosis [J]. The Journal of biological chemistry, 2009, 284(34): 23059-71.
 - [149] SONG X, YANG F, YANG T, et al. Phase separation of EB1 guides microtubule plus-end dynamics [J]. Nature cell biology, 2023, 25(1): 79-91.
 - [150] MEIER S M, FARCAS A M, KUMAR A, et al. Multivalency ensures persistence of a +TIP body at specialized microtubule ends [J]. Nature cell biology, 2023, 25(1): 56-67.
 - [151] MAAN R, REESE L, VOLKOV V A, et al. Multivalent interactions facilitate motor-dependent protein accumulation at growing microtubule plus-ends [J]. Nature cell biology, 2023, 25(1): 68-78.
 - [152] YANG F, DING M, SONG X, et al. Organization of microtubule plus-end dynamics by phase separation in mitosis [J]. Journal of molecular cell biology, 2024, 16(2).
 - [153] BARNHART M C, KUICH P H, STELLFOX M E, et al. HJURP is a CENP-A chromatin assembly factor sufficient to form a functional de novo kinetochore [J]. The Journal of cell biology, 2011, 194(2): 229-43.
 - [154] HARA M, ARIYOSHI M, SANO T, et al. Centromere/kinetochore is assembled through CENP-C oligomerization [J]. Molecular cell, 2023, 83(13): 2188-205.e13.
 - [155] SISSOKO G B, TARASOVETC E V, MARESCAL O, et al. Higher-order protein assembly controls kinetochore formation [J]. Nature cell biology, 2024, 26(1): 45-56.
 - [156] TARASOVETC E V, SISSOKO G B, MAIOROV A, et al. Binding site maturation modulated by molecular density underlies Ndc80 binding to kinetochore receptor CENP-T [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2024, 121(52): e2401344121.
 - [157] BANANI S F, LEE H O, HYMAN A A, et al. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry [J]. Nature reviews Molecular cell biology, 2017, 18(5): 285-98.
 - [158] TRIVEDI P, PALOMBA F, NIEDZIALKOWSKA E, et al. The inner centromere is a biomolecular condensate scaffolded by the chromosomal passenger complex [J]. Nature cell biology, 2019, 21(9): 1127-37.
 - [159] HEDTFELD M, DAMMERS A, KOERNER C, et al. A validation strategy to assess the role of phase separation as a determinant of macromolecular localization [J]. Molecular cell, 2024, 84(9): 1783-801.e7.

- [160] YU R, WU H, ISMAIL H, et al. Methylation of PLK1 by SET7/9 ensures accurate kinetochore-microtubule dynamics [J]. *Journal of molecular cell biology*, 2020, 12(6): 462-76.
- [161] ZHAO G, CHENG Y, GUI P, et al. Dynamic acetylation of the kinetochore-associated protein HEC1 ensures accurate microtubule-kinetochore attachment [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2019, 294(2): 576-92.
- [162] LOU Y, YAO J, ZERESHKI A, et al. NEK2A interacts with MAD1 and possibly functions as a novel integrator of the spindle checkpoint signaling [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2004, 279(19): 20049-57.
- [163] MO F, ZHUANG X, LIU X, et al. Acetylation of Aurora B by TIP60 ensures accurate chromosomal segregation [J]. *Nature chemical biology*, 2016, 12(4): 226-32.
- [164] FU C, YAN F, WU F, et al. Mitotic phosphorylation of PRC1 at Thr470 is required for PRC1 oligomerization and proper central spindle organization [J]. *Cell research*, 2007, 17(5): 449-57.
- [165] XU L, ALI M, DUAN W, et al. Feedback control of PLK1 by Apo1 ensures accurate chromosome segregation [J]. *Cell reports*, 2021, 36(2): 109343.
- [166] WIMBISH R T, DELUCA J G. Hec1/Ndc80 Tail Domain Function at the Kinetochore-Microtubule Interface [J]. *Frontiers in cell and developmental biology*, 2020, 8: 43.
- [167] BRADLEY D. The evolution of post-translational modifications [J]. *Current opinion in genetics & development*, 2022, 76: 101956.
- [168] TIAN T, CHEN L, DOU Z, et al. Structural insights into human CCAN complex assembled onto DNA [J]. *Cell discovery*, 2022, 8(1): 90.
- [169] PESENTI M E, RAISCH T, CONTI D, et al. Structure of the human inner kinetochore CCAN complex and its significance for human centromere organization [J]. *Molecular cell*, 2022, 82(11): 2113-31.e8.
- [170] BAUMEISTER W. Cryo-electron tomography: A long journey to the inner space of cells [J]. *Cell*, 2022, 185(15): 2649-52.
- [171] KIXMOELLER K, TARASOVETC E V, MER E, et al. Centromeric chromatin clearings demarcate the site of kinetochore formation [J]. *Cell*, 2025, 188(5): 1280-96.e19.
- [172] ALTEMOSE N, LOGSDON G A, BZIKADZE A V, et al. Complete genomic and epigenetic maps of human centromeres [J]. *Science (New York, NY)*, 2022, 376(6588): eabl4178.
- [173] GERSHMAN A, SAURIA M E G, GUITART X, et al. Epigenetic patterns in a complete human genome [J]. *Science (New York, NY)*, 2022, 376(6588): eabj5089.
- [174] OCHS F, GREEN C, SZCZUREK A T, et al. Sister chromatid cohesion is mediated by individual cohesin complexes [J]. *Science (New York, NY)*, 2024, 383(6687): 1122-30.
- [175] GAMBOGI C W, BIRCHAK G J, MER E, et al. Efficient formation of single-copy human artificial chromosomes [J]. *Science (New York, NY)*, 2024, 383(6689): 1344-9.
- [176] POLLEY S, RAISCH T, GHETTI S, et al. Structure of the human KMN complex and implications for regulation of its assembly [J]. *Nature structural & molecular biology*, 2024, 31(6): 861-73.



刘行，中国科学技术大学特任教授，博士生导师，细胞动力学教育部重点实验室副主任。2019 年获得国家自然科学基金委“优秀青年科学基金”项目资助。本课题组关注上皮细胞更新的分子调控机制研究，重点剖析细胞有丝分裂纺锤体可塑性及着丝粒组装动力学特征的物理化学基础，并发掘干预相关疾病的化学探针，在细胞周期调控领域取得了一系列突破性进展。在 *Nat Cell Biol*, *Nat Chem Biol* 等高水平期刊上发表论文三十余篇。2021 年荣获国际期刊 *J Mol Cell Biol* “Best Editor Award”，2022 年获中科大校友基金会“青年教师事业奖”。担任中国科协“中学生英才计划”生物学科导师团队成员，中国细胞生物学学会对外交流工作委员会副主任，国际细胞生物学联盟期刊 *Cell Biol Int*、美国细胞生物学学会会刊 *Mol Biol Cell* 副主编。