



非典型腺苷酸激酶 AK6/hCINAP 的结构和功能*

诸葛瑞鹏 黄新平 郑晓峰**

(北京大学生命科学学院, 北京 100871)

摘要 腺苷酸激酶广泛存在于各种生物中, 在维持细胞中核苷酸的正常含量以及能量代谢活动中发挥重要作用。腺苷酸激酶 6 (AK6, 又称人 coilin 相互作用核 ATP 酶蛋白 hCINAP) 是一种非典型的腺苷酸激酶, 既具有腺苷酸激酶的活性, 又具有 ATP 酶的活性。本课题组对 AK6/hCINAP 的结构、酶学特征和生物学功能开展了长期的研究, 证明其在调控基因转录、核糖体质量、早期胚胎发育、细胞衰老、细胞代谢、细胞增殖和凋亡、DNA 损伤反应、炎症反应、肿瘤发展等诸多生物学过程中均发挥关键作用。本文对 AK6/hCINAP 的结构特征、生物学功能及上游调控因子进行了总结, 阐明该酶生物学作用和分子机制具有重要的生物学意义, 有助于开发 AK6/hCINAP 选择性抑制剂并应用于临床治疗。

关键词 腺苷酸激酶 AK6/hCINAP, 晶体结构, 酶学特征, 生物学功能, 细胞衰老, 胚胎发育, 肿瘤发展

中图分类号 Q555

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0143

腺苷酸激酶 (adenylate kinase, AK) 是 ATP: AMP 磷酸转移酶, 催化细胞生命中的一个关键反应, $ATP+AMP \leftrightarrow 2ADP$, 在古细菌、细菌和真核生物中存在^[1-2]。哺乳动物细胞中有 9 种具有不同底物特异性和组织分布的 AK 亚型 (AK1~9), 这 9 种 AK 分布在细胞内不同的区间, 它们通过磷酸转移酶网络在核苷酸代谢和能量代谢中发挥重要作用^[3]。AK1、5、7 和 8 位于细胞质中, AK6 和 AK9 定位于细胞质和细胞核。AK2、3 和 4 位于线粒体中, 其中 AK3 和 AK4 存在于线粒体基质中, AK2 位于线粒体膜间^[4]。虽然人类 AK 的结构和功能有许多共同之处, 但它们的细胞内定位表明它们具有独特的特性。已有的研究揭示了 AK 家族成员的生物学功能及其与疾病的关联^[5]。其中, 细胞质 AK1 和线粒体 AK2 调节多种细胞活性, AK1 基因敲除小鼠心脏的收缩能力快速丧失, 对缺血应激的耐受性降低^[6]。AK2 的异常表达导致网状发育不良、造血缺陷和线粒体功能障碍^[7-8], AK2 N 端区域的突变抑制 AK2 依赖的中性粒细胞分化, 使用果糖可部分恢复中性粒细胞的分化, 进而治疗 AK2 缺乏症^[9]。线粒体 AK2 和 AK4 的缺陷与神经母细胞瘤或胶质瘤有关, AK2 被确定为癌症预后和晚期正常组织放射毒性的候选生物标志物^[10]。

同样, 研究发现, AK5 在肿瘤组织中的表达量低于正常组织, AK5 低表达通过调节细胞周期途径促进结肠腺癌细胞的增殖和转移, AK5 高表达的患者比低表达的患者总生存期更长。AK5 低表达水平可作为一种独立的预后生物标志物, 为结肠腺癌的临床诊断和靶向治疗提供了新的视角^[11]。精子细胞中 AK7 的缺失导致原发性男性不育, 此外, 与正常卵巢组织相比, 卵巢癌组织中的 AK7 水平显著下调, AK7 低表达是卵巢癌生存率的预后指标^[12]。最近的一项研究发现, AK9 基因的突变与肢带型先天性肌无力综合征有关^[5]。

长期以来, 人们对 AK 结构和生化特性进行了深入研究。腺嘌呤核苷酸的相互转化是能量代谢的关键步骤, AK 与应激、昼夜节律和癌症的恶性转化等细胞内过程有关^[13]。AK 在催化过程中发生较大的构象变化^[14]。这些构象变化有助于揭示酶的作用机制^[15]。由于 AK 在细胞内 AMP 水平的调节对多个细胞生理过程中必不可少, AK 可能是疾病治疗和新抗生素的有效靶点。

* 国家自然科学基金 (32270756) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-62755712, E-mail: xiaofengz@pku.edu.cn

收稿日期: 2023-03-23, 接受日期: 2023-04-13

1 非典型腺苷酸激酶AK6/hCINAP

AK6 又名 coilin 相互作用核 ATP 酶蛋白 (human coilin-interacting nucleolar ATPase protein, hCINAP), 定位于 5q13.2 位置的 5 号染色体上 (NCBI 基因 ID: 102157402), 全长 1 119 bp, 由 4 个外显子和 3 个内含子组成, 编码 172 个氨基酸^[16-17]。在所有真核生物基因组中都发现了 AK6/hCINAP 同源物。其蛋白质序列特别是二级结构不同物种中的保守性都较高, 并且在人体各组织和细胞系中普遍表达。在染色体上, TAF9 基因座编码基础转录因子亚基 TAFIID32, 而 AK6/hCINAP mRNA 是 TAF9 基因座的剪接转录本, 它和 TAFIID32 mRNA 从不同的 ATG 密码子翻译而来, 并使用不同的阅读框, 导致它们在各自的蛋白质序列中没有同一性^[18]。

与其他 AK 相比, AK6 具有独特的序列、酶学

特性、定位和晶体结构 (图 1)。序列比对表明 AK6/hCINAP 与其他 AK (AK1~5) 的序列同源性仅为 18%, 提示 AK6/hCINAP 可能与其他 AK 具有不同的功能^[5]。与其他 AK 不同的是, AK6/hCINAP 同时具有 AK 和 ATP 酶的活性 (图 1a), 使其有别于其他 AK 家族成员。作为腺苷酸激酶, AK6/hCINAP 催化可逆反应: $Mg^{2+}ADP + ADP \rightleftharpoons Mg^{2+}ATP + AMP$ 。AK 在剧烈活动中迅速产生 ATP, 这种作用模式被认为是一种储备能量系统, 可以在能量应激条件下从 ADP 转化成 ATP。在 ATP 酶反应过程中, AK6/hCINAP His79 的咪唑氮 ND1 配位一个溶解水分子: $ATP + H_2O \rightleftharpoons ADP + Pi$ ^[19]。有趣的是, 野生型 AK6/hCINAP 的 ATPase 活性 ($1.45 L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$) 约为其 AK 活性 ($140 L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$) 的 1%, 但 H79G 突变使 AK 酶和 ATP 酶的效率分别降低了 72% 和 76%, 表明 His79 在催化中的作用对于 AK 和 ATP 酶反应同样重要^[20]。

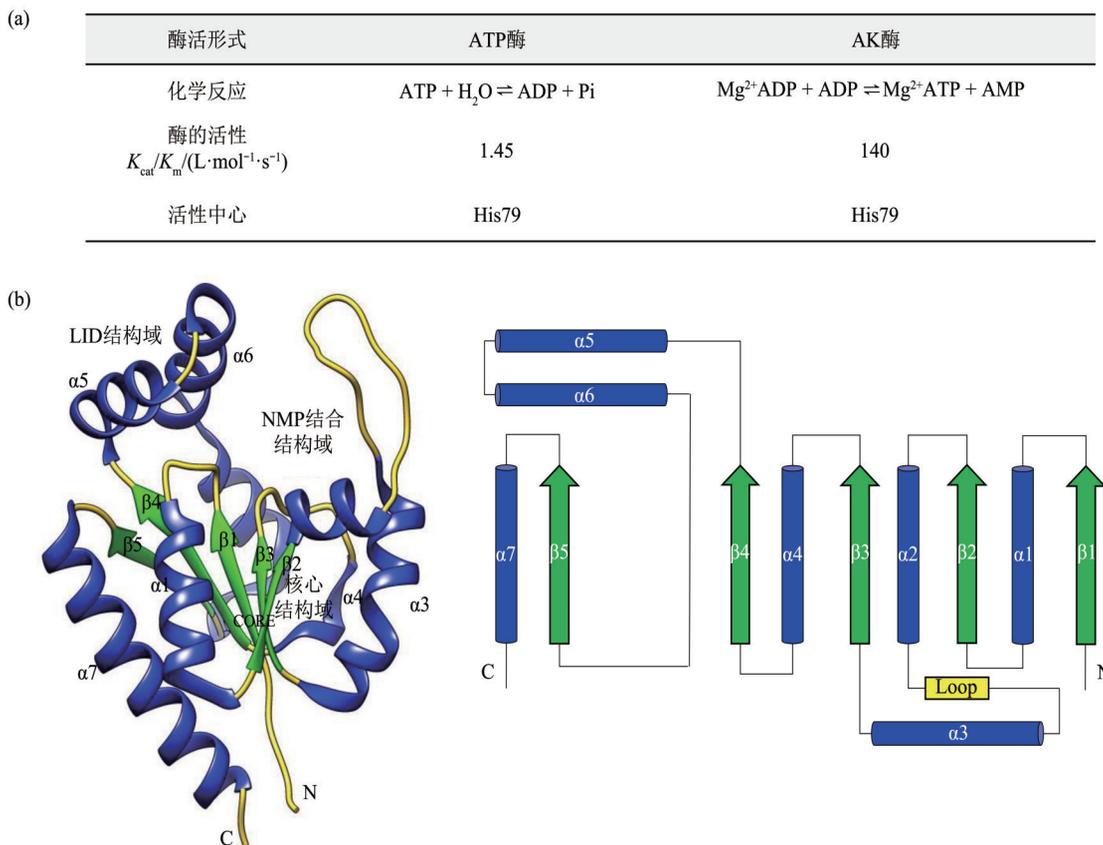


Fig. 1 The structure and enzymatic characteristics of AK6/hCINAP

图1 AK6/hCINAP的结构和酶学特征

(a) AK6/hCINAP具有腺苷酸激酶和ATP酶活性; (b) AK6/hCINAP的三维结构 (PDB ID: 1RKB), 含有CORE区域、LID区域以及NMP结合3个主要功能区域。

关于AK6/hCINAP的亚细胞定位研究，最初使用免疫荧光法检测过表达的GFP/YFP-hCINAP的亚细胞定位，发现其表现出明显的核定位^[17-18]，但该蛋白质没有明显的核定位信号序列，进一步利用免疫荧光和核质分离/免疫印迹对细胞内源表达的AK6/hCINAP进行分析发现，内源表达的AK6/hCINAP在细胞质和细胞核均有分布^[21-23]。这些研究表明AK6/hCINAP同时定位于细胞核和细胞质。并且其在细胞核和细胞质内分别发挥不同的调控作

用：在细胞核内，AK6/hCINAP在调控18S rRNA的剪切^[23]、典型Cajal体（Cajal bodies, CBs）形成^[24]、p53稳定性^[25]、DNA损伤修复^[21]，以及细胞衰老中发挥重要的作用^[26]；在细胞质中，AK6/hCINAP通过调控NF- κ B活性^[27]、有氧糖酵解关键酶LDHA活性^[22]、YAP1的活性^[28]，分别在炎症、肿瘤细胞代谢以及胚胎发育中发挥重要的作用。本综述对AK6/hCINAP的结构和生物学作用相关的研究进行概述（图2）。

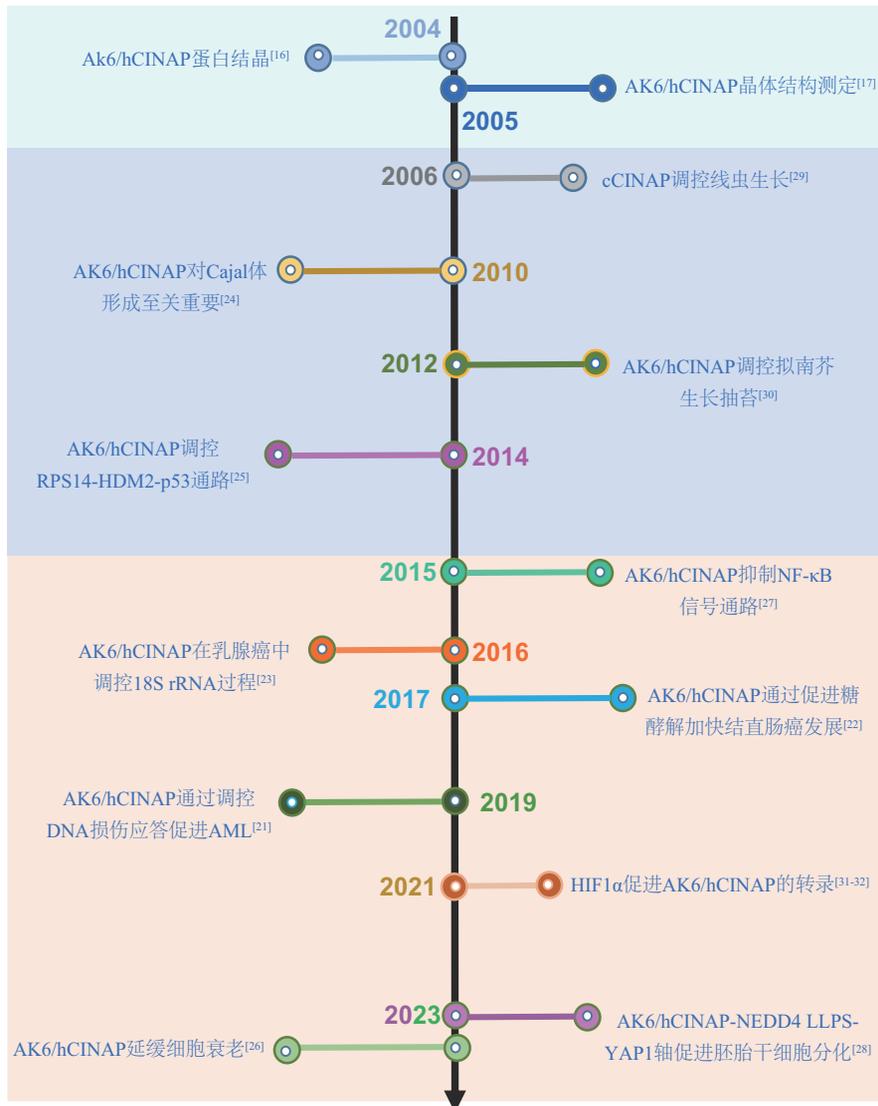


Fig. 2 Timeline of key events leading to characterization of AK6/hCINAP

图2 AK6/hCINAP研究的历程

对AK6/hCINAP蛋白结晶、三维结构测定、蛋白质功能探索及其上游调控因子鉴定。

2 AK6/hCINAP独特的结构特征

对AK6/hCINAP (PDB ID: 1RKB) 晶体结构的解析表明 (图1b), 该蛋白质含有3个功能性的结构域: 由两个 α 螺旋和一段不规则卷曲组成的NMP结合结构域, 由两个 α 螺旋组成的LID结构域以及5个 β 片层平行排列组成的含ATP结合位点的核心结构域^[16-17]。此外, AK6/hCINAP拥有一个Walker A基序 (GlyXXGlyXGlyLys), 还与其酵母同源物Fap7含有一个hhh (DE) XH型Walker B基序, 这是NTP酶的特征, 是AK6/hCINAP有别于其他AK的非典型结构特征^[33]。Asp77和His79是调控AK6/hCINAP酶活性的关键残基, 然而, hCINAP-D77G突变体的晶体结构 (PDB ID: 5JZV) 显示, 磷酸腺苷结合口袋的构象, 与野生型结构相比没有明显改变^[23]。表明虽然AK6/hCINAP催化活性位点的突变影响了其底物结合亲和力, 但对其构象没有明显影响。尽管动力学分析显示, 位于Walker B基序上的His79突变, 显著降低ATP酶和AK活性, 导致AK6/hCINAP同源二聚体形成, 进而调节AK6/hCINAP通过蛋白质-蛋白质相互作用的功能, Walker B基序也不直接参与ATP结合^[20]。对AK6/hCINAP及其在酵母中同源物的功能研究表明, 催化位点的突变对其生理作用有显著影响。例如, Walker B基序中酵母Fap7的双突变D82AH84A和AK6/hCINAP的双突变D77GH79G分别抑制20S和18 S-E前体rRNA加工, AK6/hCINAP H79G突变显著影响细胞核中CBs形成^[24]。此外, AK6/hCINAP H79G突变体不再促进乳酸脱氢酶A (lactate dehydrogenase A, LDHA) Y10磷酸化^[22]。由于His79在影响AK6/hCINAP活性和功能方面发挥了重要作用, 对H79G单位点突变体和D77G/H79G双位点突变体的结构分析将有助于揭示AK6/hCINAP生物学功能的分子机制。

虽然AK6/hCINAP具有与AK1~5亚型相似的保守局部区域, 但它具有一些明显的结构特征。例如, NMP结合域螺旋 α_2 在所有AK中都是保守的, AK6/hCINAP的短LID结构域与AK1和AK5亚型相似, 但与AK2、AK3和AK4不同。此外, AK6/hCINAP与AK1 (PDB ID: 3ADK)、AK2 (PDB ID: 1AK2)、AK3 (PDB ID: 1AK2)、AK4 (PDB ID: 2AR7) 和AK5 (PDB ID: 2BWJ) 的整体结构C α 原子之间的RMSD值分别为2.257、2.724、2.341、2.406和2.473 Å。虽然核心区域的

整体结构非常相似, 但AK6/hCINAP的LID和NMP结合域与其他AK有较大的不同。AK6/hCINAP的NMP结合域是一个环而不是 α 螺旋, 这表明其NMP结合域比其他AK更灵活。这些差异可能解释了AK6/hCINAP的特殊催化机制。在开放结构构象中, AK6/hCINAP的短LID结构域和NMP结合域通过盐桥相互作用, 这与其他AK结构的相互作用不同。其NMP结合域具有一个在其他AK中没有观察到的长环 (残基33~58), 而环 (残基40~59) 包含10个酸性残基和无碱性残基, 这在不同物种中是一个很保守的特征。最后, AK6/hCINAP与其他AK的不同之处在于, 它的His79插入到活性位点, 靠近Arg39, 而其他AK中相应的位点是一个芳香族氨基酸, 没有插入活性位点^[20]。综上所述, AK6/hCINAP独特的结构特征解释了其催化机制与其他人类AK不同的原因。

3 腺苷酸激酶AK6/hCINAP的上游调控因子

鉴于AK6/hCINAP在肿瘤细胞生长调节中的重要功能, 了解AK6/hCINAP表达的调控机制有助于确定在肿瘤发生过程中控制AK6/hCINAP表达的癌基因。

3.1 转录因子HIF-1 α 调控AK6/hCINAP的转录水平

最近的两项研究表明, HeLa细胞在缺氧条件下以缺氧诱导因子1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 依赖的方式促进AK6/hCINAP的积累。在缺氧条件下, HIF-1 α 的表达呈时间依赖性上调, HIF-1 α 结合至AK6/hCINAP的启动子区域并促进其转录, 导致AK6/hCINAP的表达亦呈现时间依赖的上调^[31-32]。AK6/hCINAP通过增强Akt/mTOR信号通路促进肿瘤细胞的上皮-间充质转化, 并抑制缺氧诱导的细胞凋亡^[31]。敲低AK6/hCINAP可以抑制LDHA活性, 并降低缺氧诱导的乳酸积累。此外, AK6/hCINAP参与线粒体介导的凋亡, 包括细胞色素c的释放和caspases的激活^[32]。

3.2 去泛素化酶OTUB1调控AK6/hCINAP的蛋白质水平

最新发表的研究表明, 在血清饥饿刺激条件下AK6/hCINAP蛋白水平显著上调, 去泛素化酶OTUB1 (OTU domain-containing ubiquitin aldehyde-binding protein 1) 被鉴定为调控AK6/hCINAP蛋白稳定性的重要调节因子^[28]。

AK6/hCINAP 在 K26/115/137 位发生 K48 连接的多聚泛素化修饰, 诱导其发生蛋白酶体途径依赖的降解。在血清饥饿刺激条件下, 去泛素化酶 OTUB1 与 AK6/hCINAP 的相互作用增强, 并以去泛素化酶活性依赖的形式去除 AK6/hCINAP K48 连接的多聚泛素化修饰, 提高 AK6/hCINAP 蛋白的稳定性, 延长 AK6/hCINAP 的半衰期, 提高 AK6/hCINAP 蛋白的丰度。

4 腺苷酸激酶AK6/hCINAP的生物学功能

AK6/hCINAP 广泛表达于多种组织, 如心脏、大脑、胎盘、肺、肝脏、骨骼肌、肾脏和胰腺等^[18], 并参与调节许多生理过程, 在细胞存活、基因组稳定性、肿瘤发生、炎症疾病、胚胎发育以及细胞衰老的调节有关 (图3)。本文总结了目前对 AK6/hCINAP 多种生物学功能的认识。

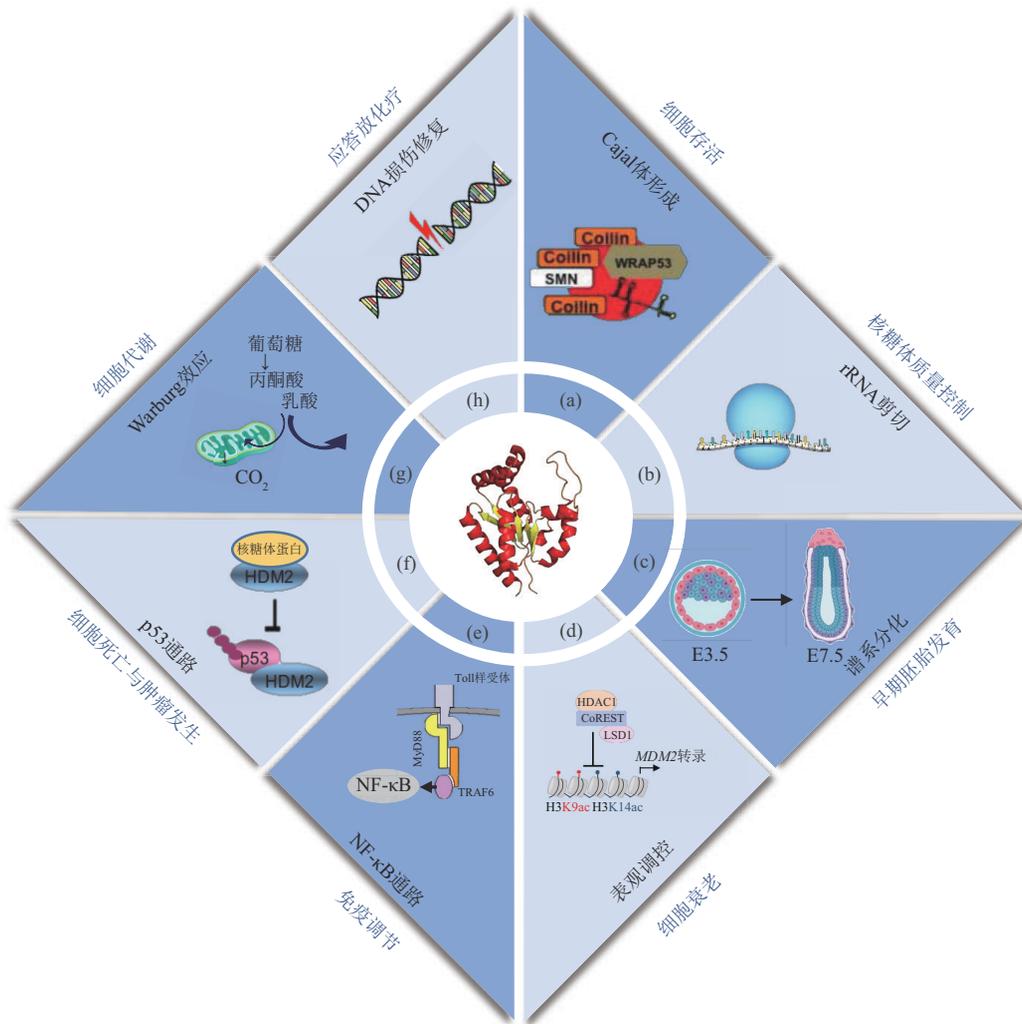


Fig. 3 Overview of the biological functions of AK6/hCINAP

图3 AK6/hCINAP的功能概述

AK6/hCINAP 分别通过调节Cajal体形成、rRNA剪切、原肠胚阶段谱系分化、表观遗传修饰、NF-κB通路、p53通路、Warburg效应和DNA损伤修复来调节细胞活力 (a)、核糖体质量控制 (b)、早期胚胎发育 (c)、细胞衰老 (d)、免疫 (e)、细胞死亡和肿瘤发生 (f)、细胞代谢 (g), 以及细胞对放疗的反应 (h) 等生物学功能。

4.1 AK6/hCINAP在不同生理过程中的生物学功能

4.1.1 AK6/hCINAP调控典型Cajal体的形成

CBs 是一类存在于哺乳动物细胞中可发生动态

变化的核细胞器^[34-35], 其参与调控组蛋白和核糖核蛋白基因的转录, 以及小核仁核糖核蛋白 (small nuclear ribonucleoproteins, snRNPs) 的成熟^[36]。最初, Santama等^[18]使用酵母双杂交系统

将AK6/hCINAP鉴定为柯浩体蛋白(coilin)的相互作用蛋白, 并发现AK6/hCINAP与coilin的羧基端存在相互作用。在HeLa细胞中过表达AK6/hCINAP导致每个细胞核中CBs的数量减少, 并影响CBs的稳定性和组装率^[18]。进一步利用RNAi技术干扰AK6/hCINAP的蛋白质表达水平, 结果显示敲低AK6/hCINAP导致典型CBs的形成存在缺陷, 并降低组蛋白转录和细胞存活率^[24]。这些研究结果表明, AK6/hCINAP是典型的CBs形成与组蛋白基因转录所必需的。

4.1.2 AK6/hCINAP参与核糖体的质量控制

核糖体作为蛋白质翻译的工厂, 在真核细胞的生命活动中发挥重要作用。最早Granneman等^[33]在酵母细胞中发现, AK6/hCINAP的同源蛋白Fap7对于核糖体20S pre-rRNA剪接成为成熟的18S rRNA是必需的。随后, Ghalei等^[37]发现Fap7与核糖体蛋白RPS14及甲基转移酶Dim1形成三元复合物, RPS14会激活Fap7的ATP酶活性, 这有助于在40S核糖体成熟过程中释放Dim1, 进一步规范核糖体小亚基的形成质量。在哺乳动物细胞中的研究结果表明AK6/hCINAP核糖体质量控制的功能是保守的^[23]。AK6/hCINAP结合18S-E前体rRNA, 并促进内切酶Nob1(NIN/RPN 12 binding protein 1)介导18S rRNA的成熟, 进而影响核糖体小亚基的生成和核糖体的质量。敲低AK6/hCINAP导致哺乳动物细胞中18S rRNA的加工缺陷, 抑制核糖体40S小亚基的组装过程, 从而阻碍细胞内蛋白质的合成^[23]。

4.1.3 AK6/hCINAP对于早期胚胎发育至关重要

小鼠早期胚胎发育受到精密的调控, 最近一系列研究显示Hippo信号通路与YES关联蛋白1(Yes-associated protein 1, YAP1)在调控小鼠早期胚胎发育过程具有重要作用^[38-40]。在小鼠中敲除hCINAP的同源基因mCINAP导致胚胎死亡^[23]。进一步的研究表明, mCINAP对于小鼠原肠胚阶段的谱系分化是关键^[28]。敲除AK6/hCINAP导致YAP1过度激活, 进一步通过相互作用实验筛选, 证明AK6/hCINAP与YAP1的重要调控因子E3连接酶NEDD4(neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4)相互作用。在小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cells, mESCs)中敲除mCINAP导致NEDD4在细胞质中发生液液相分离(liquid-liquid phase separation, LLPS), NEDD4募集丝/苏氨酸蛋白激酶NLK

(Nemo-like kinase)与YAP1于LLPS体系中, 促进了NLK介导的YAP1 Ser128位的磷酸化修饰, 提高了YAP1的稳定性和转录活性, 有助于mESCs向外胚层分化。在mESCs中敲除mCINAP导致YAP1过度激活, 从而促进mESCs向外胚层分化, 抑制mESCs向内胚层分化, 从而导致小鼠原肠胚阶段胚层谱系分化紊乱和死亡。

4.1.4 AK6/hCINAP延缓细胞衰老

细胞衰老是一个受多重因素影响, 并由多层次信号应答通路协调的重要生命过程。最初, 在秀丽线虫中利用RNAi敲低AK6/hCINAP的同源蛋白cCINAP, 可以抑制秀丽线虫的生长^[29]。在拟南芥中敲低AK6/hCINAP的同源蛋白aAK6, 抑制拟南芥抽苔, 导致植株矮小^[30]。进一步发现在秀丽线虫中敲低cCINAP可以显著抑制秀丽线虫的寿命; 与此相一致, 在小鼠骨骼肌和肝脏中特异性敲除mCINAP也能加速小鼠衰老进程^[26]。这些现象表明, AK6/hCINAP是细胞衰老过程中的一个负调控因子, 可以抑制细胞衰老。对其分子机制的探索发现: 一方面, AK6/hCINAP与MDM2/p53信号通路上游调控因子p14ARF相互作用, 拮抗p14ARF对E3连接酶MDM2(mouse double minute 2)的抑制作用, 最终促进MDM2介导的p53多聚泛素化降解; 另一方面, AK6/hCINAP通过与去乙酰化酶HDAC1相互作用, 抑制HDAC1-CoREST复合物形成, 进而抑制HDAC1/CoREST复合物对MDM2启动子区H3K9ac的去乙酰化修饰, 提高MDM2的转录水平, 最终促进p53的泛素化降解, 从而延缓衰老表型。

4.2 AK6/hCINAP与疾病的关联

4.2.1 AK6/hCINAP通过抑制NF- κ B信号通路参与调控自身免疫疾病

转录因子NF- κ B作为免疫系统的关键调控因子, 诱导多种免疫应答基因的表达^[41]。许多调控机制严格控制NF- κ B信号通路的稳态, NF- κ B的异常活化可直接引起自身免疫性疾病和炎症相关的癌变^[42]。AK6/hCINAP通过靶向IKK复合物负调控NF- κ B信号通路^[27]。在TNF- α 的刺激下, AK6/hCINAP招募PP1与IKK β (inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit beta)形成三元复合物, 促进PP1去除IKK β 的磷酸化, 抑制p65的核易位, 不利于NF- κ B信号通路的激活和下游基因的表达。低水平的AK6/hCINAP会导致IKK β 磷酸化增强, NF- κ B信号通路过度激活, 并与系统性红斑

狼疮等自身免疫病发生密切相关。

4.2.2 AK6/hCINAP通过抑制p53信号通路促进肿瘤发展

转录因子p53作为抑癌蛋白，发挥肿瘤抑制的作用，一些肿瘤细胞通过核糖体蛋白(RP)-HDM2-p53信号传导途径抑制p53的蛋白质水平，从而促进肿瘤的发展^[43]。AK6/hCINAP通过抑制核糖体小亚基蛋白RPS14负调控p53，促进肿瘤发展^[25]。AK6/hCINAP与RPS14存在相互作用，并进一步招募去NEDD化酶NEDP1去除RPS14的NEDD化修饰，削弱了RPS14与p53泛素E3连接酶HDM2的相互作用，导致游离的MDM2增多，增强了MDM2介导的p53多聚泛素化修饰和蛋白酶降解，从而抑制肿瘤细胞的凋亡。

4.2.3 AK6/hCINAP通过调控18S rRNA剪切促进乳腺癌的发生发展

肿瘤细胞的快速生长需要大量且高效的核糖体组装及蛋白质翻译。上文提到AK6/hCINAP参与核糖体质量控制，与其促进18S rRNA剪切的功能一致，研究发现AK6/hCINAP在人类多种癌症组织中的表达水平显著上调。在乳腺癌细胞中敲低AK6/hCINAP的表达将引发细胞周期阻滞，促进细胞凋亡，并最终抑制肿瘤细胞成瘤。AK6/hCINAP的高表达可促进肿瘤细胞增殖。对其分子机制的探索表明，高表达AK6/hCINAP促进核糖体组装并选择性地上调促癌相关蛋白mRNA的翻译效率，从而有利于肿瘤细胞生长。这些研究揭示了AK6/hCINAP通过上调核糖体组装选择性地提高癌症相关蛋白的翻译效率，从而促进肿瘤细胞生长^[23]。

4.2.4 hCINAP促进肿瘤细胞的糖酵解和结直肠癌干细胞的自我更新

肿瘤细胞代谢最主要的一个特征是Warburg效应(有氧糖酵解)，即即使在氧气充足的条件下，肿瘤细胞依旧通过糖酵解反应而非氧化磷酸化为细胞生长提供充足能量，其与肿瘤生长和细胞侵袭密切相关。本课题组研究发现，AK6/hCINAP在结直肠癌中明显高表达，能够促进结直肠癌干细胞的有氧糖酵解，进而促进表皮间充质转换、迁移、侵袭、重新成瘤、自我更新以及对化疗药物的不敏感性^[22]。对其分子机制的研究发现，AK6/hCINAP与有氧糖酵解通路中的重要代谢酶LDHA相互作用，并依赖自身的腺苷酸激酶活性催化ADP生成ATP，提高结直肠癌干细胞的细胞质中ATP的水平，进而促进纤维细胞生长因子受体1(fibroblast

growth factor receptor 1, FGFR1)催化的LDHA第10位酪氨酸的磷酸化和活性，增强了结直肠癌干细胞的Warburg效应。AK6/hCINAP的敲低能抑制细胞有氧糖酵解，促进线粒体呼吸和活性氧的产生，进而促进结直肠癌干细胞的凋亡。而在人正常结肠干细胞的类组织中，AK6/hCINAP的敲低对细胞凋亡的影响很小，而且不影响结肠干细胞的分化，表明AK6/hCINAP作为药物靶点在结直肠癌治疗中的副作用会很小。此外，葡萄糖水平低等代谢压力引起的细胞ATP水平的降低会抑制LDHA的磷酸化并促进AK6/hCINAP和LDHA的相互作用。而在结直肠癌中，AK6/hCINAP的异常高表达能通过促进LDHA磷酸化来促进糖酵解产生能量，从而提高结直肠癌干细胞对营养匮乏的抵抗性。综上所述，AK6/hCINAP可以调节结直肠癌干细胞的代谢重编程，是治疗结直肠癌转移的一个有前景的药物靶点。

4.2.5 hCINAP调控DNA损伤修复和急性髓系白血病细胞耐药性

DNA损伤反应(DNA damage response, DDR)是一种复杂的系统，能确保细胞在发生DNA损伤时维持基因组的完整性并顺利存活下来^[44]。泛素化、SUMO(small ubiquitin-like modifier)化等多种蛋白质翻译后修饰在DNA损伤反应中发挥重要作用^[45]。在DDR通路中，AK6/hCINAP与去SUMO化酶SEN3(Sentrin/SUMO-specific protease 3)协同调控核仁磷酸蛋白B23(nucleophosmin, NPM1)的SUMO化修饰^[21]。当双链DNA发生断裂时，NPM1发生SUMO化修饰，并进一步招募损伤修复相关蛋白至损伤位点。与此同时，AK6/hCINAP被募集到DNA损伤位点，促进SEN3去除NPM1的SUMO化修饰，导致修复蛋白从DNA损伤位点解离，增强DNA损伤的同源重组修复，促进急性髓系白血病细胞的存活。AK6/hCINAP敲除的细胞中基因组不稳定性增加，并出现更多的染色体断裂，表明AK6/hCINAP在DDR通路中的功能对于维持基因组的稳定性至关重要。进一步研究发现，AK6/hCINAP蛋白在急性髓系白血病(acute myelocytic leukemia, AML)病人白细胞中的含量比正常人白细胞中含量偏低，在人源肿瘤移植小鼠AML疾病模型中敲低AK6/hCINAP蛋白的表达，会导致AML疾病小鼠对化疗药物更加敏感，表现为小鼠外周血细胞凋亡比例增加，脾脏内细胞损伤比例增加，恶性增殖比例

降低, 脾脏恶性肿大现象得到抑制, 显示好的化疗治疗效果和更高的存活率。

5 展 望

在过去20年中, 对AK6/hCINAP的生理作用及其在癌症和免疫中的调控作用和机制进行了系列的研究。对AK6/hCINAP1生理作用及其分子机制的探索不仅会更深层次揭示其生理功能, 而且有助于为肿瘤等疾病的临床治疗提供理论基础。接下来, 我们将讨论AK6/hCINAP需要未来研究的关键方面。

5.1 AK6/hCINAP的双重酶活性在其生物学功能中的作用

由于AK6/hCINAP同时具有腺苷酸激酶和ATP酶活性, 因此了解AK6/hCINAP的双重酶活性是否在其生理功能中发挥作用很重要。本课题组前期研究证明, AK6/hCINAP的ATP酶活性对其调控18S rRNA加工至关重要^[23], 腺苷酸激酶活性对AK6/hCINAP促进LDHA磷酸化很重要^[22]。在其他关于AK6/hCINAP的研究中较少涉及到AK6/hCINAP酶的活性, 因此, 未来研究可以通过使用AK6/hCINAP ATP酶活性位点突变体D77G/H79G及腺苷酸激酶特异性抑制剂AP5, 阐明AK6/hCINAP的哪种酶活性在其生物学功能中发挥功能。

5.2 靶向AK6/hCINAP的小分子抑制剂和单克隆抗体

近期研究发现, 结肠肠癌干细胞的代谢重编程受到AK6/hCINAP的调控, AK6/hCINAP有助于满足侵袭性结肠肠癌干细胞的能量需求, 是结肠肠癌干细胞代谢重编程的有效调节剂, 亦是抑制结直肠癌侵袭转移的潜在药物靶点^[22]。值得注意的是, 抑制AK6/hCINAP可显著促进结直肠癌非干细胞和结肠肠癌干细胞的凋亡, 但对结肠类器官的凋亡无显著影响。因此, 拮抗AK6/hCINAP功能对于治疗结直肠癌是一种潜在的有效策略。此外, AK6/hCINAP低表达的急性髓系白血病细胞对化疗试剂更敏感^[21], 暗示AK6/hCINAP是一个潜在的治疗靶点。未来的研究可进行AK6/hCINAP小分子抑制剂和靶向癌细胞AK6/hCINAP的单克隆抗体的筛选, 并检测其对肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭的影响, 以及探讨其与不同药物和抗体联用是否能增强肿瘤细胞对放化疗的敏感性。

6 总 结

最近对AK6/hCINAP的结构、细胞功能的深入研究突出了其在正常生理条件及病理条件下的重要功能。到目前为止, 已有的研究有助于进一步理解AK6/hCINAP在肿瘤发生中的作用, 并为探索治疗由AK6/hCINAP功能障碍引起的恶性肿瘤提供新策略。进一步研究AK6/hCINAP的上游调控因子、结构和下游功能将有助于了解其活性和特异性提供重要的见解, 并有助于促进AK6/hCINAP选择性抑制剂的开发及其临床应用。

参 考 文 献

- [1] Lanning N J, Looyenga B D, Kauffman A L, *et al.* A mitochondrial RNAi screen defines cellular bioenergetic determinants and identifies an adenylate kinase as a key regulator of ATP levels. *Cell Rep*, 2014, **7**(3): 907-917
- [2] Rogne P, Rosselin M, Grundstrom C, *et al.* Molecular mechanism of ATP versus GTP selectivity of adenylate kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, **115**(12): 3012-3017
- [3] Ravera S, Calzia D, Panfoli I, *et al.* Simultaneous detection of molecular weight and activity of adenylate kinases after electrophoretic separation. *Electrophoresis*, 2007, **28**(3): 291-300
- [4] Panayiotou C, Solaroli N, Karlsson A. The many isoforms of human adenylate kinases. *Int J Biochem Cell B*, 2014, **49**: 75-83
- [5] Ionescu M I. Adenylate kinase: a ubiquitous enzyme correlated with medical conditions. *Protein J*, 2019, **38**(2): 120-133
- [6] Pucar D, Bast P, Gumina R J, *et al.* Adenylate kinase AK1 knockout heart: energetics and functional performance under ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart C*, 2002, **283**(2): H776-H782
- [7] Zhang J, Hu H H, Mu T, *et al.* Correlation analysis between AK1 mRNA expression and inosine monophosphate deposition in jingyuan chickens. *Animals (Basel)*, 2020, **10**(3): 439
- [8] Klepinin A, Ounpuu L, Guzun R, *et al.* Simple oxygraphic analysis for the presence of adenylate kinase 1 and 2 in normal and tumor cells. *J Bioenerg Biomembr*, 2016, **48**(5): 531-548
- [9] Horiguchi T, Tanimura A, Miyoshi K, *et al.* The effect of heterozygous mutation of adenylate kinase 2 gene on neutrophil differentiation. *Int J Mol Sci*, 2022, **23**(24): 16089
- [10] Ji E H, Cui L, Yuan X Q, *et al.* Metabolomic analysis of human oral cancer cells with adenylate kinase 2 or phosphorylate glycerol kinase 1 inhibition. *J Cancer*, 2017, **8**(2): 298-304
- [11] Zhang P F, Li Y, Liu Y K, *et al.* Low adenylate kinase 5 expression is predictive of poor prognosis and promotes tumour growth by regulating the cell-cycle pathway. *Clin Exp Pharmacol P*, 2022, **49**(9): 970-978
- [12] Zhang X Y, Zhou L L, Jiao Y, *et al.* Adenylate kinase 7 is a prognostic indicator of overall survival in ovarian cancer. *Medicine*, 2021, **100**(1): e24134
- [13] Dzeja P, Terzic A. Adenylate kinase and AMP signaling networks: metabolic monitoring, signal communication and body energy

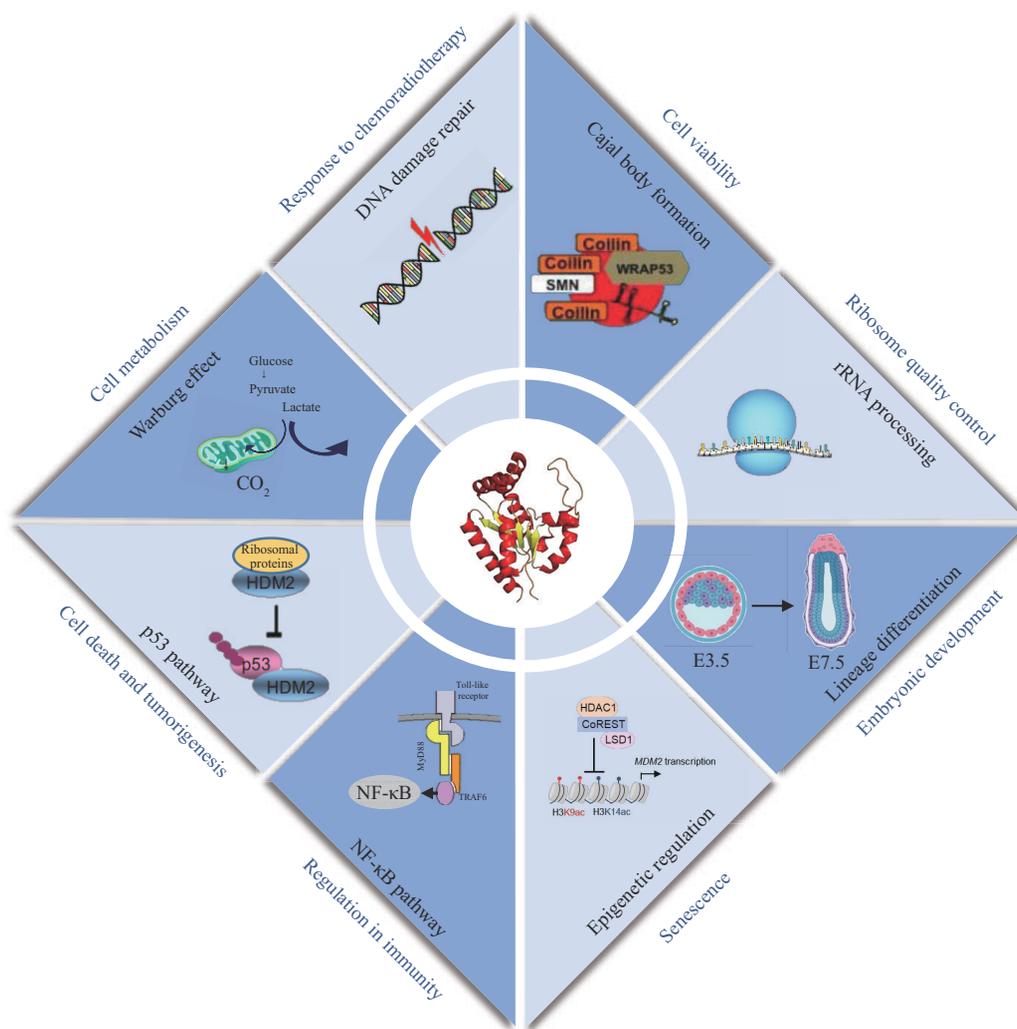
- sensing. *Int J Mol Sci*, 2009, **10**(4): 1729-1772
- [14] Formoso E, Limongelli V, Parrinello M. Energetics and structural characterization of the large-scale functional motion of adenylate kinase. *Sci Rep*, 2015, **5**: 8425
- [15] Lin C Y, Huang J Y, Lo L W. Deciphering the catalysis-associated conformational changes of human adenylate kinase 1 with single-molecule spectroscopy. *J Phys Chem B*, 2013, **117**(45): 13947-13955
- [16] Ren H, Liang Y H, Li R, *et al.* Protein preparation, crystallization and preliminary X-ray analysis of human adrenal gland protein AD-004. *Acta Crystallogr D*, 2004, **60**(7): 1292-1294
- [17] Ren H, Wang L, Bennett M, *et al.* The crystal structure of human adenylate kinase 6: an adenylate kinase localized to the cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(2): 303-308
- [18] Santama N, Ogg S C, Malekkou A, *et al.* Characterization of hCINAP, a novel coilin-interacting protein encoded by a transcript from the transcription factor TAF11D32 locus. *J Biol Chem*, 2005, **280**(43): 36429-36441
- [19] Camici M, Allegrini S, Tozzi M G. Interplay between adenylate metabolizing enzymes and AMP-activated protein kinase. *FEBS J*, 2018, **285**(18): 3337-3352
- [20] Drakou C E, Malekkou A, Hayes J M, *et al.* hCINAP is an atypical mammalian nuclear adenylate kinase with an ATPase motif: structural and functional studies. *Proteins*, 2012, **80**(1): 206-220
- [21] Xu R, Yu S, Zhu D, *et al.* hCINAP regulates the DNA-damage response and mediates the resistance of acute myelocytic leukemia cells to therapy. *Nat Commun*, 2019, **10**(1): 3812
- [22] Ji Y, Yang C, Tang Z, *et al.* Adenylate kinase hCINAP determines self-renewal of colorectal cancer stem cells by facilitating LDHA phosphorylation. *Nat Commun*, 2017, **8**: 16000
- [23] Bai D, Zhang J, Li T, *et al.* The ATPase hCINAP regulates 18S rRNA processing and is essential for embryogenesis and tumour growth. *Nat Commun*, 2016, **7**: 12310
- [24] Zhang J, Zhang F, Zheng X. Depletion of hCINAP by RNA interference causes defects in Cajal body formation, histone transcription, and cell viability. *Cell Mol Life Sci*, 2010, **67**(11): 1907-1918
- [25] Zhang J, Bai D, Ma X, *et al.* hCINAP is a novel regulator of ribosomal protein-HDM2-p53 pathway by controlling NEDDylation of ribosomal protein S14. *Oncogene*, 2014, **33**(2): 246-254
- [26] Huang X, Zhao Y, Wei M, *et al.* hCINAP alleviates senescence by regulating MDM2 *via* p14ARF and the HDAC1/CoREST complex. *J Mol Cell Biol*, 2023. doi: 10.1093/jmcb/mjad015
- [27] Qu L, Ji Y, Zhu X, *et al.* hCINAP negatively regulates NF-kappaB signaling by recruiting the phosphatase PP1 to deactivate IKK complex. *J Mol Cell Biol*, 2015, **7**(6): 529-542
- [28] Zhuge R P, Wang C, Wang J, *et al.* hCINAP regulates the differentiation of embryonic stem cells by regulating NEDD4 liquid-liquid phase-separation-mediated YAP1 activation. *Cell Rep*, 2023, **42**(1): 111935
- [29] Zhai R, Meng G, Zhao Y, *et al.* A novel nuclear-localized protein with special adenylate kinase properties from *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett*, 2006, **580**(16): 3811-3817
- [30] Feng X, Yang R, Zheng X, *et al.* Identification of a novel nuclear-localized adenylate kinase 6 from *Arabidopsis thaliana* as an essential stem growth factor. *Plant Physiol Biochem*, 2012, **61**: 180-186
- [31] Zhang Y, Jiang L, Qin N, *et al.* hCINAP is potentially a direct target gene of HIF-1 and is required for hypoxia-induced EMT and apoptosis in cervical cancer cells. *Biochem Cell Biol*, 2021, **99**(2): 203-213
- [32] Xie H, Xu G, Gao Y, *et al.* hCINAP serves a critical role in hypoxia induced cardiomyocyte apoptosis *via* modulating lactate production and mitochondrial mediated apoptosis signaling. *Mol Med Rep*, 2021, **23**(2): 109
- [33] Granneman S, Nandineni M R, Baserga S J. The putative NTPase Fap7 mediates cytoplasmic 20S pre-rRNA processing through a direct interaction with Rps14. *Mol Cell Biol*, 2005, **25**(23): 10352-10364
- [34] Gall J G. The centennial of the Cajal body. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, **4**(12): 975-980
- [35] Cioce M, Lamond A I. Cajal bodies: a long history of discovery. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005, **21**: 105-131
- [36] Kiss T. Biogenesis of small nuclear RNPs. *J Cell Sci*, 2004, **117**(25): 5949-5951
- [37] Ghalei H, Trepreau J, Collins J C, *et al.* The ATPase Fap7 tests the ability to carry out translocation-like conformational changes and releases Dim1 during 40S ribosome maturation. *Mol Cell*, 2017, **68**(6): 1155-1155
- [38] Sun X, Ren Z J, Cun Y X, *et al.* Hippo-YAP signaling controls lineage differentiation of mouse embryonic stem cells through modulating the formation of super-enhancers. *Nucleic Acids Res*, 2020, **48**(13): 7182-7196
- [39] Bae J S, Kim S M, Jeon Y, *et al.* Loss of Mob1a/b impairs the differentiation of mouse embryonic stem cells into the three germ layer lineages. *Exp Mol Med*, 2019, **51**(11): 1-12
- [40] Passaro F, Martino I D, Zambelli F, *et al.* YAP contributes to DNA methylation remodeling upon mouse embryonic stem cell differentiation. *J Biol Chem*, 2021, **296**: 100138
- [41] Hayden M S, Ghosh S. NF-kappaB in immunobiology. *Cell Res*, 2011, **21**(2): 223-244
- [42] Grivennikov S I, Karin M. Inflammation and oncogenesis: a vicious connection. *Curr Opin Genet Dev*, 2010, **20**(1): 65-71
- [43] Zhang Y, Wang J A, Yuan Y Z, *et al.* Negative regulation of HDM2 to attenuate p53 degradation by ribosomal protein L26. *Nucleic Acids Res*, 2010, **38**(19): 6544-6554
- [44] Pooley K A, Dunning A M. DNA damage and hormone-related cancer: a repair pathway view. *Hum Mol Genet*, 2019, **28**(R2): R180-R186
- [45] Liang L L, Zhang Z Z, Li J D, *et al.* Direct binding of RNF8 to SUMO2/3 promotes cell survival following DNA damage. *Mol Med Rep*, 2017, **16**(6): 8385-8391

Insight Into The Multi-faceted Roles of The Structure and Function of an Atypical Adenylate Kinase AK6/hCINAP*

ZHUGE Rui-Peng, HUANG Xin-Ping, ZHENG Xiao-Feng**

(School of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Graphical abstract



Abstract Adenylate kinases (AK) are widely existing in various organisms, which play critical roles in maintaining the normal content of nucleotides and regulation of energy metabolism in cells. Among AK family members, AK6, also known as human coilin-interacting nuclear ATPase protein (hCINAP), is an atypical adenylate kinase that possesses both activities of adenylate kinase and ATPase. We have been carried out long-term research on the structure, enzymatic activity and functions of this enzyme, and demonstrated that

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (32270756).

** Corresponding author.

Tel: 86-10-62755712, E-mail: xiaofengz@pku.edu.cn

Received: March 23, 2023 Accepted: April 13, 2023

AK6/hCINAP plays critical roles in many biological processes, including gene transcription, ribosome quality control, embryonic development, senescence, cell metabolism, cell proliferation and apoptosis, DNA damage responses, inflammatory response, and tumor development. In this review, we summarize the structural features, biological roles and transcriptional regulators of AK6/hCINAP, which provides important insights into its activity and functions, and contributes to the screening of specific inhibitors of AK6/hCINAP and its application in clinical therapy in the future.

Key words AK6/hCINAP, crystal structure, enzymatic characteristics, biological functions, senescence, embryonic development, tumor development

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0143