

DOI: 10.13376/j.cbls/2015048

文章编号: 1004-0374(2015)03-0363-11



鲍岚, 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所研究员、博士生导师, 细胞生物学国家重点实验室副主任, 国家杰出青年基金和中国科学院“百人计划”获得者。主要从事神经元内蛋白质运输机制及功能的研究。研究组近年来的主要研究工作包括: (1) 微管蛋白乙酰化修饰在神经系统发育中的功能和机制; (2) 电压门控的钠离子通道膜转运机制和在初级感觉神经元中的功能调控; (3) 离子型嘌呤受体 P2X3 膜转运机制和作用。研究结果发表在 *Neuron*、*PNAS*、*J Neurosci*、*J Biol Chem*、*Traffic* 和 *J Cell Sci* 等国际学术期刊上。

## 微管蛋白的翻译后修饰及功能研究

高囡囡, 鲍 岚\*

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 细胞生物学国家重点实验室, 上海 200031)

**摘 要:** 微管是由  $\alpha/\beta$  微管蛋白 ( $\alpha/\beta$ -tubulin) 聚合形成的管状细胞骨架, 在许多生物学过程中起着重要的作用。微管的结构与性质受到多种因素的调控, 其中微管蛋白的翻译后修饰是一类重要的调控方式。主要介绍目前已发现的微管蛋白翻译后修饰种类, 并讨论这些修饰的生物学功能与作用机制。

**关键词:** 微管蛋白; 翻译后修饰; 细胞骨架

**中图分类号:** Q245      **文献标志码:** A

## Post-translational modification of tubulin: classification, function and mechanism

GAO Nan-Nan, BAO Lan\*

(State Key Laboratory of Cell Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

**Abstract:** Microtubule is one of cytoskeletons which possesses a hollow cylindrical structure and polymerized from  $\alpha/\beta$ -tubulin heterodimer. It plays an important role during a diversity of biological processes. The structure and property of microtubule are regulated by various regulators, and the post-translational modification of tubulin is the important one. We herein summarize the classification of tubulin post-translational modification and discuss its functions and underlying mechanisms.

**Key words:** tubulin; post-translational modification; cytoskeleton

微管 (Microtubule) 是存在于所有真核生物中的细胞骨架成分, 它是由亚单位  $\alpha/\beta$  微管蛋白 ( $\alpha/\beta$ -tubulin) 异二聚体形成原丝, 然后装配成中空的管状结构。微管在细胞内呈网状或束状分布。微管的细胞学功能非常广泛, 它参与了细胞形态维持、细胞运动、细胞分裂、胞内运输和分泌等重要的生物

学过程。

虽然微管蛋白的氨基酸序列和微管的结构在进

收稿日期: 2015-01-12

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973项目”) (2014CB 942802); 国家自然科学基金项目(31330046)

\*通信作者: E-mail: baolan@sibcb.ac.cn

化上都高度保守,但微管的功能在不同的细胞和物种中却显现出极大的多样性。这种多样性目前并没有获得完全透彻的理解,有以下三种可能的解释。(1)微管蛋白 $\alpha/\beta$ -tubulin各自有不同的亚型存在,例如在人类中有8种 $\alpha$ -tubulin和7种 $\beta$ -tubulin亚型<sup>[1]</sup>。有的亚型呈现广泛分布的形式,且表达水平稳定。有些亚型在特定的细胞中选择性高表达,或在特定的环境中表达水平受到调控。(2)微管蛋白的翻译后修饰(post-translational modification)赋予了其在功能上的诸多变化,如乙酰化(acetylation)、酪氨酸化(tyrosination)、去酪氨酸化(detyrosination)、 $\Delta$ -2修饰( $\Delta$ 2-tubulin)、多聚谷氨酰化(polyglutamylolation)和多聚甘氨酰化(polyglycylation)等。(3)大量的微管结合蛋白对微管功能进行了多样的调控,其中包括帮助微管聚合、解聚和剪切等的蛋白。这些不同微管蛋白亚型、翻译后修饰和结合蛋白所形成的微管上的独特标记,被形象地称为“微管蛋白密码(tubulin code)”。

除了 $\Delta$ -2修饰外,大多数微管蛋白的翻译后修饰是可逆的。有些修饰专一地发生在 $\alpha$ -tubulin或 $\beta$ -tubulin上,有些则在 $\alpha/\beta$ -tubulin中都存在。此外,除了磷酸化修饰外,大多数翻译后修饰发生在微管蛋白异二聚体或聚合的微管上,且以后者为主<sup>[2]</sup>。近十几年来,随着研究手段的日臻成熟,在微管蛋白的翻译后修饰方面展开了大量重要的工作,陆续发现了负责调控不同修饰的酶,使人们对这些微管蛋白翻译后修饰的功能有了更深入的认识。下面就微管蛋白翻译后修饰的种类、生物学功能和作用机制的研究进展进行回顾。

## 1 微管蛋白翻译后修饰的种类

微管蛋白的翻译后修饰种类繁多,包括为人们所熟知且相对保守的乙酰化、酪氨酸化、去酪氨酸化、 $\Delta$ -2修饰或去谷氨酰化(deglutamylolation)、多聚谷氨酰化和多聚甘氨酰化,此外还有近几年发现的且研究处于起步阶段的修饰形式,如磷酸化(phosphorylation)、泛素化(ubiquitination)、聚胺化(polyamination)、棕榈酰化(palmitoylation)、精氨酰化(arginylation)以及糖基化(glycosylation)等。

### 1.1 乙酰化

1985年在衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)的鞭毛(flagellum)中发现了微管蛋白的乙酰化修饰<sup>[3]</sup>。在众多已知的微管蛋白修饰中,乙酰化是尤为独特的一种,这种高度保守的修饰主要发生在 $\alpha$ -tubulin

的第40位赖氨酸(K40位点)的 $\epsilon$ -氨基上,是唯一一种发生在微管管腔面的修饰形式<sup>[3-5]</sup>(图1)。近年来的一些研究也提示,微管蛋白可能存在多个乙酰化修饰位点,如Chu等<sup>[6]</sup>报道了 $\beta$ -tubulin的K252位点在乙酰基转移酶San作用下发生了乙酰化修饰。此外,蛋白质组学分析结果表明,微管蛋白可能有10个以上的乙酰化修饰位点<sup>[7]</sup>,但目前这些位点都还没有得到进一步的验证。因此,通常情况下 $\alpha$ -tubulin乙酰化指的是 $\alpha$ -tubulin第40位赖氨酸的乙酰化修饰。

近30年来,在脊椎动物、昆虫甚至植物细胞中都证实了存在 $\alpha$ -tubulin的乙酰化修饰<sup>[8]</sup>。微管的乙酰化水平主要由两类酶调控,一类是可以催化 $\alpha$ -tubulin乙酰化的乙酰基转移酶,另一类是去除 $\alpha$ -tubulin乙酰化的去乙酰化酶。去乙酰化酶的发现较早,主要有两个蛋白具有体内和体外微管蛋白去乙酰化的活性,2002年和2003年先后发现了组蛋白去乙酰化酶6(histone deacetylase 6, HDAC6)和Sirt 2(sirtuin type 2)。细胞内干扰HDAC6或者Sirt2均导致 $\alpha$ -tubulin乙酰化水平提高,提示这两种酶可独立发挥功能<sup>[9-11]</sup>。而对于微管蛋白乙酰基转移酶,虽然Greer等<sup>[12]</sup>早在1985年就从衣藻的鞭毛中分离得到具有 $\alpha$ -tubulin乙酰化活性的成分,但是一直没有找到真正的催化亚基。2009年,Creppe等<sup>[13]</sup>报道含有组蛋白乙酰基转移酶(histone acetyltransferase, HAT)结构域的延伸复合物3(elongator complex 3, ELP3)可能是 $\alpha$ -tubulin的乙酰化酶。用RNA干扰的方法降低ELP3的表达,细胞中 $\alpha$ -tubulin的乙酰化水平明显降低,然而体外实验表明ELP3并不能显著增加 $\alpha$ -tubulin的乙酰化水平,说明ELP3不是微管蛋白直接的乙酰基转移酶。2010年,Akella等<sup>[14]</sup>和Shida等<sup>[15]</sup>同时报道了MEC-17/ $\alpha$ -TAT1是 $\alpha$ -tubulin第40位赖氨酸的乙酰基转移酶,并且从四膜虫到哺乳动物高度保守,他们证明纯化的MEC-17蛋白具有体外催化 $\alpha$ -tubulin乙酰化的能力。后续研究表明,在小鼠中敲除MEC-17后体内 $\alpha$ -tubulin的乙酰化修饰几乎消失<sup>[14-16]</sup>,证实了在哺乳动物系统中MEC-17确实是体内主要的 $\alpha$ -tubulin乙酰基转移酶。

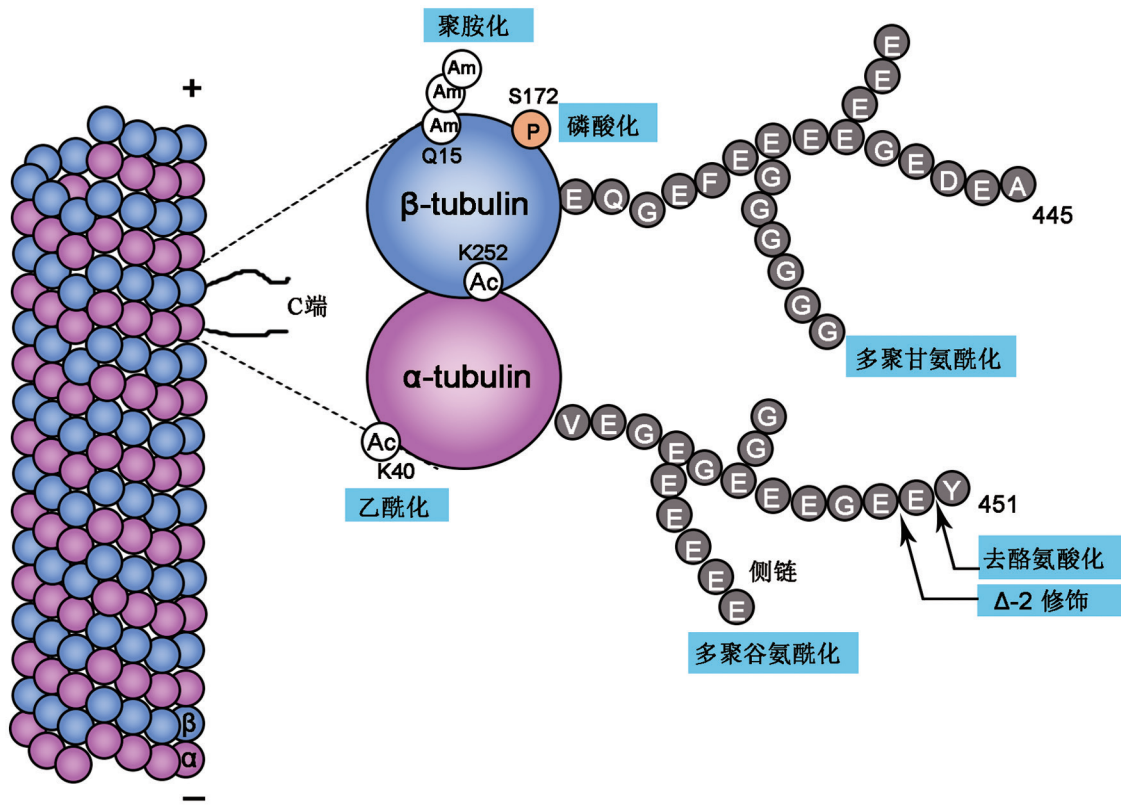
### 1.2 去酪氨酸化/酪氨酸化

1981年发现的微管蛋白的去酪氨酸/酪氨酸化修饰,是迄今研究得最多的微管蛋白翻译后修饰形式。多数 $\alpha$ -tubulin亚型的C端最后一个氨基酸都是酪氨酸<sup>[17]</sup>,这个酪氨酸残基可在酶的催化作用下

经历“去酪氨酸化/酪氨酸化”的循环。去酪氨酸化修饰是在  $\alpha$ -tubulin 蛋白刚被合成后就会发生的特异性修饰<sup>[18]</sup>, 发生修饰后的  $\alpha$ -tubulin 的最后一个氨基酸残基变成了谷氨酸 (glutamine, Glu)(图 1),

因此去酪氨酸化的 tubulin 也常常被称为“Glu-tubulin”, 而重新被酪氨酸化的 tubulin 则被称为“Tyr-tubulin”。

尽管去酪氨酸化的修饰形式很早就被发现, 催



$\alpha$ -tubulin和 $\beta$ -tubulin暴露在微管管腔外表面的C端是其翻译后修饰的主要区域, 这段序列在图中以TUB1A和TUB2B的一级结构为代表, 多聚谷氨酰化和多聚甘氨酰化修饰在 $\alpha/\beta$ -tubulin中都存在。E, 谷氨酸; G, 甘氨酸; K, 赖氨酸; S, 丝氨酸; Q, 谷氨酰胺; Y, 酪氨酸。

图1 微管蛋白翻译后修饰的主要类别与位点

化这一反应的酶却一直没有得到明确的阐释, 有一种观点认为胞质羧肽酶 1 (cytosolic carboxypeptidase 1, CCP1) 催化了去酪氨酸化反应, 证据是研究发现 *Ccp1* 突变小鼠中微管蛋白去酪氨酸化水平大幅降低<sup>[19]</sup>, 但是 CCP1 是否能在体外实现对于  $\alpha$ -tubulin 的去酪氨酸化还需要进一步证明。1993 年发现了微管蛋白酪氨酸连接酶 (tubulin tyrosin ligase, TTL)<sup>[20]</sup>, 该酶主要在微管蛋白异二聚体而非聚合的微管上重新连接酪氨酸残基, 这些二聚体通常是在去酪氨酸化修饰后从微管上解离下来的<sup>[21-22]</sup>。

### 1.3 $\Delta$ -2修饰

去酪氨酸化修饰的  $\alpha$ -tubulin 再脱去 C 端的一个谷氨酸残基, 就会形成一种新的翻译后修饰形式,

由于这种  $\alpha$ -tubulin 缺少了末端两个氨基酸, 因此称为  $\Delta$ -2 修饰 (图 1)。1989 年研究人员在牛脑中检测到约 35%  $\alpha$ -tubulin 无法重新发生酪氨酸化<sup>[23]</sup>, 从而发现了  $\Delta$ -2 修饰。发生  $\Delta$ -2 修饰的  $\alpha$ -tubulin 因为无法与 TTL 结合, 因此不能重新进行酪氨酸化。 $\Delta$ -2 修饰脱离了“去酪氨酸化/酪氨酸化”循环, 是微管蛋白众多翻译后修饰中少见的不可逆修饰形式<sup>[24]</sup>。

负责  $\Delta$ -2 修饰的酶是一类胞质羧肽酶 (cytosolic carboxypeptidases, CCPs)<sup>[19, 25]</sup>, 其中的大多数成员同时负责微管蛋白去多聚谷氨酸修饰<sup>[26]</sup>。这类酶还能够继续进行 C 端的蛋白质水解, 产生  $\Delta$ -3 tubulin<sup>[27]</sup>, 这种更进一步的 C 端修饰的功能和意义仍不为人们所知。

#### 1.4 多聚谷氨酰化

1991年在微管蛋白上发现了多聚谷氨酰化修饰,这是发生在 $\alpha$ -tubulin或 $\beta$ -tubulin的C端谷氨酸位点上的长链谷氨酸修饰(图1),形成的侧链最长可达30个谷氨酸,通过异肽键(isopeptide bond)与谷氨酸残基的 $\gamma$ -羧基相连。最初人们曾认为这种修饰仅发生在微管蛋白上,后被证实其他蛋白也存在此类修饰<sup>[28]</sup>。多聚谷氨酰化最初在哺乳动物脑中的微管蛋白上发现<sup>[29]</sup>,后来的研究表明其在分裂细胞的胞质微管以及纺锤体微管中也大量存在<sup>[30]</sup>,在细胞的中心粒、鞭毛和纤毛轴丝以及基体的微管中丰度也很高<sup>[31-33]</sup>。

负责微管蛋白多聚谷氨酰化修饰的酶是一类称为“类微管蛋白酪氨酸连接酶”(tubulin tyrosin ligase-like, TTLL)的蛋白<sup>[28, 34]</sup>。这种长侧链修饰的过程经历分支和延伸两步,通常这两步反应由不同的TTLL蛋白来催化。负责第一步的是具有侧链起始催化活性的TTLL,包括TTLL1、TTLL4和TTLL7<sup>[34-36]</sup>。催化第二步的是有延伸活性的TTLL,如TTLL6和TTLL9<sup>[37-38]</sup>。个别TTLL蛋白兼具两步反应的催化活性,如小鼠的TTLL7谷氨酸连接酶<sup>[35]</sup>。最近,Rogowski等<sup>[26]</sup>和Kimura等<sup>[39]</sup>发现一类胞质羧肽酶(CCPs)负责多聚谷氨酸长链的缩短和去除,包括CCP1、CCP4、CCP5和CCP6,其中CCP5能够水解去掉分支点处的第一个谷氨酸残基,从而实现整个长链的移除。此外,这些酶同样参与了 $\alpha$ -tubulin的去酪氨酸化修饰和 $\Delta$ -2修饰,提示微管蛋白不同的翻译后修饰之间存在交叉调节机制。

#### 1.5 多聚甘氨酰化

1994年在草履虫(*Paramecium tetraurelia*)的微管蛋白中发现了多聚甘氨酰化修饰<sup>[40]</sup>。与多聚谷氨酰化修饰类似,多聚甘氨酰化是发生在 $\alpha$ -tubulin或 $\beta$ -tubulin C端尾巴上单个或多个谷氨酸位点上的长链甘氨酸修饰,形成的甘氨酸长链通过异肽键与谷氨酸残基的 $\gamma$ -羧基相连。与多聚谷氨酰化不同的是,多聚甘氨酰化修饰分布较为局限,目前在哺乳动物中仅发现其在有纤毛细胞的轴丝和基体中分布<sup>[40-41]</sup>,因此多聚甘氨酰化通常可以作为有纤毛细胞的标志。

负责多聚甘氨酰化修饰的酶是与多聚谷氨酰化修饰酶同家族的TTLL<sup>[28, 34]</sup>。多聚甘氨酰化修饰也经历起始分支和延伸两步:第一步在甘氨酸连接酶(如TTLL3<sup>[42]</sup>)的作用下,一个甘氨酸通过异肽键

与tubulin C端的谷氨酸残基相连;第二步在另一种甘氨酸连接酶(如TTLL10<sup>[28, 43]</sup>)的作用下,后续的甘氨酸通过与上一个残基的 $\gamma$ -羧基形成肽键或异肽键逐个加入。在多聚谷氨酰化修饰酶中,个别TTLL蛋白也可兼具两步反应的催化活性,例如果蝇的TTLL3<sup>[28]</sup>。目前直接负责去甘氨酰化修饰的酶还没有被发现,有研究表明在与CCP5类似的胞质羧肽酶家族中有些成员没有去谷氨酰化活性<sup>[25]</sup>,而可能具有去甘氨酰修饰功能,但是需要进一步的实验来验证。

#### 1.6 其他类型的微管蛋白翻译后修饰

微管蛋白除了上面讨论的几种丰度较高且研究较为深入的翻译后修饰之外,还有一些尚未进行深入研究修饰,如:磷酸化、泛素化、聚胺化、棕榈酰化、精氨酰化和糖基化等。

早在1980年,研究人员就发现 $\alpha$ -tubulin和 $\beta$ -tubulin会发生磷酸化<sup>[44-46]</sup>,其中研究最多的是 $\beta$ -tubulin 172位丝氨酸(Ser172)位点上的磷酸化修饰<sup>[47]</sup>(图1),该修饰由细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶Cdk1催化。

错误折叠的微管蛋白单体对于细胞毒性很大,必须快速进行降解<sup>[48]</sup>。泛素化修饰通常用来标记准备送往蛋白酶体进行降解的蛋白质,微管蛋白也不例外。近年来,有报道 $\alpha$ -tubulin和 $\beta$ -tubulin都可能被泛素化修饰,以此调控它们的周转。Ren等<sup>[48]</sup>发现, $\alpha/\beta$ -tubulin异二聚体被E3泛素连接酶Parkin催化发生泛素化。

2013年报道了在脑组织的 $\alpha$ -tubulin和 $\beta$ -tubulin谷氨酸残基上可发生聚胺化修饰<sup>[49]</sup>,由于发生这种修饰的微管呈现不可溶的形式,因而一直以来不易被检测。在众多能够发生修饰的位点中, $\beta$ -tubulin第15位谷氨酰胺被认为是主要的修饰位点(图1)。聚胺化修饰是种不可逆的修饰方式,该反应在谷氨酰胺转移酶(transglutaminase)的催化下发生,可以发生在游离的微管蛋白或聚合的微管上。

此外,微管蛋白的翻译后修饰还有棕榈酰化<sup>[50]</sup>、糖基化<sup>[51-52]</sup>和精氨酰化<sup>[53]</sup>等,这些修饰形式被发现后很少有后续的研究,发生修饰的位点以及负责反应的酶也尚不明确。

## 2 微管蛋白翻译后修饰的功能

### 2.1 乙酰化

最初对于微管乙酰化修饰功能的研究是通过操控 $\alpha$ -tubulin的去乙酰化酶HDAC6实现的,分析由

这种方法得到的表型, 必须要注意 HDAC6 除了  $\alpha$ -tubulin 以外还有其他的底物。早期的研究显示, 缺失  $\alpha$ -tubulin 的乙酰化会引起胚胎发育过程中皮层神经元的迁移障碍<sup>[13]</sup>, 增加  $\alpha$ -tubulin 乙酰化可以修复由于亨廷顿蛋白突变所引起的神经元轴浆运输的异常<sup>[54]</sup>。另有报道表明, Charcot-Marie-Tooth (CMT) 小鼠疾病模型中神经元  $\alpha$ -tubulin 乙酰化显著下降, 使用 HDAC6 的抑制剂可增加  $\alpha$ -tubulin 的乙酰化, 改善了疾病模型小鼠神经元轴浆运输受损、轴突丢失和行为学异常<sup>[55]</sup>。

2010 年发现了  $\alpha$ -tubulin 的乙酰化酶 MEC-17, 为研究  $\alpha$ -tubulin 乙酰化提供了有效的工具。现有研究显示, MEC-17 特异性敲减会导致大鼠发育过程中皮层神经元的放射状迁移受损<sup>[56]</sup>, MEC-17 敲除会引起小鼠精子鞭毛结构的轻微异常以及体外培养细胞系在增殖过程中接触抑制减弱<sup>[16, 57]</sup>。在迁移的细胞中, MEC-17 可以在 clathrin 包被小泡的作用下富集于迁移前端的微管上, 实现该区域选择性的乙酰化修饰<sup>[58]</sup>。但是 MEC-17 敲除的小鼠虽然几乎完全失去了  $\alpha$ -tubulin 乙酰化, 却并没有表现出明显的发育障碍和智力异常<sup>[16]</sup>。由此可见,  $\alpha$ -tubulin 乙酰化的直接功能仍不清楚, 值得进一步探讨。

## 2.2 去酪氨酸化/酪氨酸化

针对去酪氨酸化  $\alpha$ -tubulin 的特异性抗体的免疫染色显示, 在间期和分裂期的细胞中存在去酪氨酸化微管<sup>[59]</sup>, 而且这种修饰的强度随着细胞的分化程度会逐渐升高<sup>[60-61]</sup>。研究表明,  $\alpha$ -tubulin 的去酪氨酸化修饰在染色体正确分离以及细胞周期正常进行的过程中起到关键作用<sup>[62]</sup>。在神经元中,  $\alpha$ -tubulin 的去酪氨酸化修饰在轴突和生长锥部位富集, 提示这种修饰有可能与神经元极性的建立或维持有关<sup>[63-64]</sup>。在  $\alpha$ -tubulin 特异性的酪氨酸连接酶基因 *Ttl* 敲除小鼠中, 由于没有重新酪氨酸化的发生, 去酪氨酸化和发生  $\Delta$ -2 修饰的微管大量积累, 神经元中几乎检测不到酪氨酸化的微管存在, 导致小鼠在出生后不久死亡。该敲除小鼠表现出严重的发育问题, 如大脑皮层结构紊乱和皮层神经元数量减少等, 离体培养的神经元也呈现出生长的异常加快和轴突的过早建立<sup>[65]</sup>。

## 2.3 $\Delta$ -2 修饰

通常  $\alpha$ -tubulin 要先进行去酪氨酸化, 然后再发生  $\Delta$ -2 修饰, 因而  $\alpha$ -tubulin 的  $\Delta$ -2 修饰会受到其去酪氨酸化 / 酪氨酸化水平的影响。这种调控在 *Ttl* 敲除小鼠中得到了很好的体现, 该小鼠的各个组织

中都出现了  $\alpha$ -tubulin 的  $\Delta$ -2 修饰明显增加<sup>[65]</sup>。另有研究表明, *TTL* 缺失所引起的  $\alpha$ -tubulin 的  $\Delta$ -2 修饰增高与肿瘤的生长和侵袭能力有关<sup>[66-67]</sup>。然而, 与微管蛋白的其他几种翻译后修饰相比, 人们对于  $\Delta$ -2 修饰的生物学意义还了解得比较肤浅, 需要进一步的研究。

## 2.4 多聚谷氨酰化

在多种模式生物中敲减或敲除负责微管蛋白的多聚谷氨酰修饰的 TTLLs, 发现谷氨酰化修饰可调控动纤毛内 dynein 动力蛋白的活性和纤毛摆动行为<sup>[37, 68-69]</sup>。在有纤毛细胞和组织中存在多种 TTLLs, 但是敲减或敲除单一种酶通常足以引起纤毛尤其是动纤毛的功能异常<sup>[70-71]</sup>, 提示每一种酶有其特异的功能, 它们之间并无很强的冗余性。虽然多聚谷氨酰化在神经系统的微管中表达水平高<sup>[72]</sup>, 然而脑中主要的谷氨酸连接酶——TTLL1 敲除的小鼠并没有表现出明显的神经系统缺陷<sup>[34, 68, 70]</sup>, 表明神经元中的微管对于多聚谷氨酰化修饰的缺失似乎并不敏感, 或者存在其他补偿机制。相反, 神经系统中多聚谷氨酰化水平的异常增高则会引起神经退行性改变, 在 *pcd* (*Purkinje cell degeneration*) 神经退行性疾病小鼠模型中, 脑组织中主要的去谷氨酰化酶 CCPI 发生了突变, 引起了嗅球和小脑等脑组织中谷氨酰修饰水平的异常增加和退行性变化<sup>[26, 73]</sup>。

## 2.5 多聚甘氨酸化

多聚甘氨酸修饰存在于聚合的微管中, 侧链的延伸是在微管组装后逐步发生的, 因此细胞中新形成的轴丝和基体等细胞器的微管上多聚甘氨酸化修饰侧链偏短, 而后会随着细胞器的成熟而加长<sup>[74-75]</sup>。因此, 微管蛋白多聚甘氨酸链的长度可以标记细胞中轴丝等细胞器的“年龄”, 也可表明这些细胞器中的微管是处于组装状态或是已经完成聚合。需要特别指出的是, 由于微管蛋白发生多聚甘氨酸化和多聚谷氨酰化修饰酶的氨基酸作用位点相同, 因此这两种多聚化修饰彼此存在竞争关系, 两者需要受到严格的调控。多聚甘氨酸化修饰可能抑制多聚谷氨酰化的发生, 这种调控在微管过度发生多聚谷氨酰化时无疑是一种保护机制。

微管蛋白的多聚甘氨酸修饰特异性地发生于纤毛细胞中。实验表明, 小鼠脑室室管膜细胞的动纤毛在成熟后会发生单甘氨酸化, 在几周后能检测到多聚甘氨酸化<sup>[76]</sup>。而精子细胞的鞭毛则很早就加上了长的多聚甘氨酸化侧链, 提示多聚甘氨酸修饰可能与轴丝的长度有关<sup>[28]</sup>。系列实验表明, 在小鼠、

斑马鱼、果蝇和四膜虫中敲除甘氨酸连接酶, 均可导致纤毛解聚或纤毛功能严重障碍<sup>[28, 42, 76-77]</sup>。

## 2.6 微管蛋白其他的翻译后修饰

在微管蛋白上很早就发现了磷酸化修饰, 但是并没有发现这类修饰具体的生物学功能。研究显示, 细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶 Cdk1 可催化  $\beta$ -tubulin 第 172 位丝氨酸 (Ser172) 磷酸化, 有可能在细胞分裂过程中参与调控微管的动态<sup>[2, 15, 47]</sup>。另有研究显示,  $\alpha$ -tubulin 能够被肾脏酪氨酸激酶 Sky 磷酸化, 并在 B 细胞活化过程中发挥作用<sup>[78-79]</sup>。此外, 在 parkin 作用下  $\alpha/\beta$ -tubulin 异二聚体可发生泛素化, parkin 蛋白与帕金森氏病 (Parkinson's disease, PD) 有着密切的联系, 提示微管蛋白泛素化修饰可能参与调控神经退行性疾病。初步研究显示, 微管蛋白的聚胺化参与微管稳定性的维持<sup>[49]</sup>, 与细胞功能的关系仍待进一步研究。

微管蛋白的其他翻译后修饰 (如棕榈酰化、糖基化和精氨酸化<sup>[53]</sup> 等) 研究目前还较少, 有些在特定的细胞或系统中存在, 有的仅发生于某些特殊的代谢情况下。因此, 对于这些修饰的功能和机制还需深入研究。

## 3 微管蛋白翻译后修饰的作用机制

### 3.1 调控微管动态和稳定性

微管在体内经历着聚合 (polymerization/growth)、解聚 (depolymerization/shrinkage)、挽救 (rescue, 指从解聚到聚合状态的转换) 和崩塌 (catastrophe, 指从聚合到解聚状态的转换) 这些过程, 呈现高度动态性, 这种现象被称为微管的“动态不稳定性 (dynamic instability)”。微管的动态性对于细胞行使功能极其重要, 包括细胞周期、细胞迁移、细胞形态发生和细胞内物质运输等过程。微管的翻译后修饰是微管动态性调控的一个普遍而重要的机制, 如乙酰化、去酪氨酸化和  $\Delta$ -2 修饰<sup>[80]</sup>。

一直以来, 乙酰化水平较高的微管被认为是较稳定的, 有证据显示乙酰化大都发生在聚合的和更为稳定的微管上<sup>[81]</sup>。但同时也有实验表明, 乙酰化本身似乎并不足以增加微管的稳定性<sup>[82]</sup>。2014 年结构生物学的工作显示,  $\alpha$ -tubulin K40 位乙酰化并不会导致微管高级结构发生明显改变<sup>[83]</sup>, 提示  $\alpha$ -tubulin 乙酰化可能并不直接增加微管的稳定性。2014 年 Szyk 等<sup>[84]</sup> 的研究结果也表明, 由于 MEC-17 催化  $\alpha$ -tubulin 乙酰化的速率相对缓慢, 加上需要进入微管腔内发挥作用, 使得乙酰化更多地发生

在稳定且寿命较长的微管上, 为乙酰化与微管稳定性的关系提供了最新的解释。

去酪氨酸化修饰通常在稳定且寿命较长的微管上出现, 在神经元中尤为如此<sup>[63, 85]</sup>, 因而去酪氨酸化也常常被作为稳定微管的一种分子标记。关于去酪氨酸化修饰与微管稳定性的联系, 虽然有证据表明去酪氨酸化修饰本身不会直接导致微管结构的稳定<sup>[86]</sup>, 但有证据提示, 去酪氨酸化修饰的微管与具有微管解聚作用的 kinesin-13 家族成员的相互作用大大减弱<sup>[87-88]</sup>, 进而保护了微管, 维持了微管较长的寿命。

如前所述,  $\Delta$ -2 修饰的结果是  $\alpha$ -tubulin 不可逆地失去 C 端最后的酪氨酸残基, 使得微管永久稳定下来。研究表明,  $\Delta$ -2 修饰在稳定的微管上容易发生聚集, 这种现象在终末分化的系统, 如神经元以及鞭毛和纤毛的轴丝中都有发现<sup>[89]</sup>, 而这些系统中的微管倾向于更稳定, 而不是经历频繁的聚合-解聚过程。

### 3.2 调控马达蛋白的功能和胞内运输

除了为细胞形态提供支撑, 微管另一种独特的功能是作为细胞内物质运输的轨道。微管的翻译后修饰可对马达蛋白活性进行调节, 从而在时间和空间上对胞内运输实现特异性调控。

有实验显示,  $\alpha$ -tubulin 的乙酰化可以增强 kinesin-1 和 dynein 与微管的结合, 参与胞内运输调控。提高  $\alpha$ -tubulin 的乙酰化水平能够增强神经元中 BDNF (brain-derived neurotrophic factor) 囊泡的正向和逆向运输<sup>[54, 90]</sup>, 但是该现象在体外实验中未能得到很好的重现<sup>[91-92]</sup>, 提示  $\alpha$ -tubulin 的乙酰化对依赖微管系统运输的调节可能也是一种间接的作用机制。目前, 也可用 MEC-17 在体外获得较纯的乙酰化 tubulin, 继而对上述体外实验进行更好的验证。

$\alpha$ -tubulin 去酪氨酸化修饰被证明参与调控 kinesin-1 的活性, 体内和体外的实验均表明 kinesin-1 与去酪氨酸化修饰微管的亲和力有约 2.8 倍的增强<sup>[92-94]</sup>, 这足以在长距离的运输中产生显著影响。在小鼠中微管蛋白多聚谷氨酰化修饰的缺失会引起 kinesin-3 家族成员 KIF3A 的异常定位与功能缺失, 对 kinesin-1 和 kinesin-2 则没有明显影响<sup>[95]</sup>。

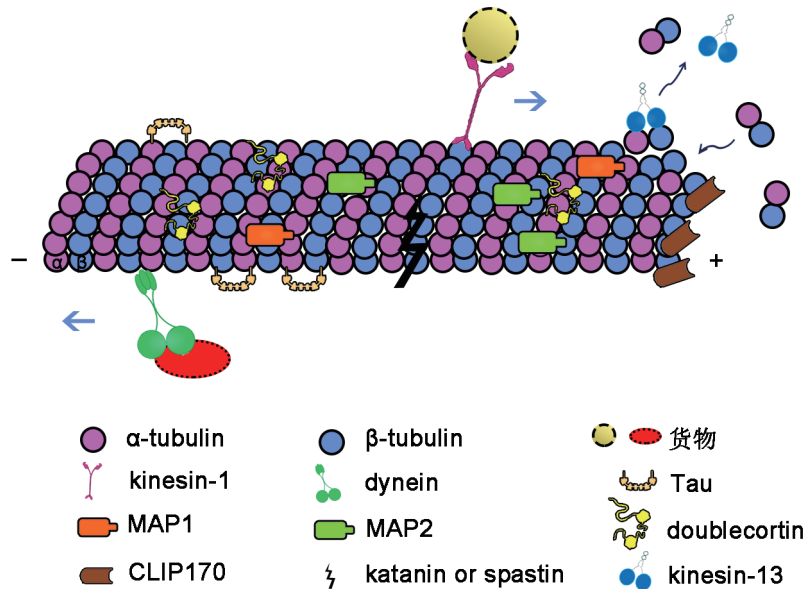
在衣藻和四膜虫中敲除多聚谷氨酰转移酶 TLL9 或 TLL6, 会影响纤毛中 dynein 与微管的结合, 导致纤毛摆动功能异常<sup>[37, 69]</sup>。目前, 微管的多聚甘氨酸化修饰在微管与马达蛋白相互作用的调节中还未被报道。

### 3.3 调控微管相关蛋白的功能

目前发现的大多数修饰(乙酰化除外)发生在 $\alpha/\beta$ -tubulin的C端,微管蛋白C端富含酸性氨基酸,携带大量负电荷。结构生物学研究表明,微管蛋白的C端指向微管表面的外侧,更容易与微管相关蛋白(microtubule-associated proteins, MAPs)及其他胞内蛋白发生相互作用(图2)<sup>[96]</sup>。由于微管相关的很多功能受众多微管相关蛋白调节,因此微管蛋白翻

译后修饰通过调节与微管相关蛋白的结合调控了微管的功能。

Sudo 和 Baas<sup>[97]</sup>发现,在成纤维细胞和海马神经元的树突中,提高 $\alpha$ -tubulin的乙酰化水平能够增强微管切割蛋白 katanin 与微管的结合,进而促进其对微管的剪切作用。前文提到 $\alpha$ -tubulin的去酪氨酸化水平对于微管与 kinesin-13 家族成员的结合起到重要的调节作用<sup>[87]</sup>,但是 MAP4、MAP2 和 Tau



Kinesin-1和dynein分别负责沿微管向正端和向负端的运输。微管相关蛋白1和2 (MAP1和MAP2)、Tau蛋白以及Doublecortin蛋白维持微管的稳定, CLIP170是典型的微管正端结合蛋白, katanin和spastin可切割聚合的微管, kinesin-13具有从正端解聚微管的作用。

图2 结合在微管上的马达蛋白和微管相关蛋白

则对去酪氨酸化修饰不敏感<sup>[98-99]</sup>。另有研究显示,富含甘氨酸结构域的 CLIP170 或 p150 能与重新酪氨酸化的微管结合<sup>[87, 100]</sup>,  $\alpha$ -tubulin 酪氨酸化的完全缺失严重影响了 CLIP170 的定位和功能,进而影响了神经元的形态发生和生长锥的路径寻找<sup>[101]</sup>。

由于谷氨酸携带负电荷,微管蛋白的多聚谷氨酰化修饰进一步增加了C端的负电性,很有可能增强了MAPs与微管蛋白C端的相互作用。研究表明,多聚谷氨酰侧链可以增加具有微管切割功能的 spastin 和 katanin 与微管的结合,进而导致微管被切割<sup>[102]</sup>。此外,有研究显示 Tau、MAP1B 和 MAP2 与侧链有3个谷氨酸的微管结合强度最大,随着侧链谷氨酸数量增至6个逐渐降低,而 MAP1A 与侧链有3~7个谷氨酸的微管均有较强的结合<sup>[103-105]</sup>。过度谷氨酰化引起神经元退行性变的机制尚未阐明,

推测很可能与轴浆运输受阻以及微管网络的动态性和稳定性失调有关<sup>[102, 106]</sup>。其他种类微管翻译后修饰在调控微管相关蛋白的功能方面还鲜有报道。

## 4 结语与展望

目前,对于微管蛋白的乙酰化、酪氨酸化、去酪氨酸化、 $\Delta$ -2 修饰或去谷氨酸化、多聚谷氨酰化和多聚甘氨酸化修饰的位点、功能和作用机制有了较多的了解,而对于微管蛋白的磷酸化、泛素化、聚胺化、棕榈酰化、精氨酸化以及糖基化修饰知之甚少。随着实验手段特别是蛋白质组学方法的不断完善与突破,人们还可能发现微管蛋白新的翻译后修饰。研究这些修饰最重要的是要明确其生物学功能。寻找微管蛋白各种修饰的位点和在体内的修饰/去修饰酶尤为重要,可为研究微管蛋白翻译后修饰

的功能和机制提供有力的工具,进而可鉴定微管蛋白翻译后修饰影响的相互作用蛋白、微管动态不稳定性、细胞功能乃至机体功能。

由于微管蛋白的大多数翻译后修饰在细胞内和组织中都有其特殊的时间和空间定位,负责相关修饰/去修饰的酶如何实现特定时空的调控,不同的修饰形式相互之间如何协同发挥功能,众多的微管蛋白翻译后修饰如何受到细胞内外环境、信号的影响和调节,这些都需要认真思考和仔细求证。

### [参 考 文 献]

- [1] Verdier-Pinard P, Pasquier E, Xiao H, et al. Tubulin proteomics: towards breaking the code. *Anal Biochem*, 2009, 384(2): 197-206
- [2] Fourest-Lieuvain A, Peris L, Gache V, et al. Microtubule regulation in mitosis: tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Mol Biol Cell*, 2006, 17(3): 1041-50
- [3] L'Hernault SW, Rosenbaum JL. *Chlamydomonas*  $\alpha$ -tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the  $\epsilon$ -amino group of a lysine. *Biochemistry*, 1985, 24(2): 473-8
- [4] LeDizet M, Piperno G. Identification of an acetylation site of *Chlamydomonas*  $\alpha$ -tubulin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(16): 5720-4
- [5] Nogales E, Wolf SG, Downing KH. Structure of the  $\alpha\beta$  tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*, 1998, 391(6663): 199-203
- [6] Chu CW, Hou F, Zhang J, et al. A novel acetylation of  $\beta$ -tubulin by San modulates microtubule polymerization via down-regulating tubulin incorporation. *Mol Biol Cell*, 2011, 22(4): 448-56
- [7] Choudhary C, Kumar C, Gnad F, et al. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*, 2009, 325(5942): 834-40
- [8] Polevoda B, Sherman F. The diversity of acetylated proteins. *Genome Biol*, 2002, 3(5): reviews0006
- [9] Hubbert C, Guardiola A, Shao R, et al. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*, 2002, 417(6887): 455-8
- [10] Matsuyama A, Shimazu T, Sumida Y, et al. *In vivo* destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J*, 2002, 21(24): 6820-31
- [11] North BJ, Marshall BL, Borra MT, et al. The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD<sup>+</sup>-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell*, 2003, 11(2): 437-44
- [12] Greer K, Maruta H, L'Hernault SW, et al.  $\alpha$ -tubulin acetylase activity in isolated *Chlamydomonas flagella*. *J Cell Biol*, 1985, 101(6): 2081-4
- [13] Creppe C, Malinouskaya L, Volvert ML, et al. Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of  $\alpha$ -tubulin. *Cell*, 2009, 136(3): 551-64
- [14] Akella JS, Wloga D, Kim J, et al. MEC-17 is an  $\alpha$ -tubulin acetyltransferase. *Nature*, 2010, 467(7312): 218-22
- [15] Shida T, Cueva JG, Xu Z, et al. The major  $\alpha$ -tubulin K40 acetyltransferase  $\alpha$ TAT1 promotes rapid ciliogenesis and efficient mechanosensation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(50): 21517-22
- [16] Kalebic N, Sorrentino S, Perlas E, et al.  $\alpha$ TAT1 is the major  $\alpha$ -tubulin acetyltransferase in mice. *Nat Commun*, 2013, 4: 1962
- [17] Valenzuela P, Quiroga M, Zaldivar J, et al. Nucleotide and corresponding amino acid sequences encoded by  $\alpha$  and  $\beta$  tubulin mRNAs. *Nature*, 1981, 289(5799): 650-5
- [18] Bulinski JC, Gundersen GG. Stabilization of post-translational modification of microtubules during cellular morphogenesis. *Bioessays*, 1991, 13(6): 285-93
- [19] Kalinina E, Biswas R, Berezniuk I, et al. A novel subfamily of mouse cytosolic carboxypeptidases. *FASEB J*, 2007, 21(3): 836-50
- [20] Ersfeld K, Wehland J, Plessmann U, et al. Characterization of the tubulin-tyrosine ligase. *J Cell Biol*, 1993, 120(3): 725-32
- [21] Szyk A, Deaconescu AM, Piszczek G, et al. Tubulin tyrosine ligase structure reveals adaptation of an ancient fold to bind and modify tubulin. *Nat Struct Mol Biol*, 2011, 18(11): 1250-8
- [22] Szyk A, Piszczek G, Roll-Mecak A. Tubulin tyrosine ligase and stathmin compete for tubulin binding *in vitro*. *J Mol Biol*, 2013, 425(14): 2412-4
- [23] Paturle L, Wehland J, Margolis RL, et al. Complete separation of tyrosinated, detyrosinated, and nontyrosinatable brain tubulin subpopulations using affinity chromatography. *Biochemistry*, 1989, 28(6): 2698-704
- [24] Lafanechere L, Job D. The third tubulin pool. *Neurochem Res*, 2000, 25(1): 11-8
- [25] Rodriguez de la Vega M, Sevilla RG, Hermoso A, et al. Nna1-like proteins are active metallo-carboxypeptidases of a new and diverse M14 subfamily. *FASEB J*, 2007, 21(3): 851-65
- [26] Rogowski K, van Dijk J, Magiera MM, et al. A family of protein-deglutamylating enzymes associated with neurodegeneration. *Cell*, 2010, 143(4): 564-78
- [27] Berezniuk I, Lyons PJ, Sironi JJ, et al. Cytosolic carboxypeptidase 5 removes  $\alpha$ - and  $\gamma$ -linked glutamates from tubulin. *J Biol Chem*, 2013, 288(42): 30445-53
- [28] Rogowski K, Juge F, van Dijk J, et al. Evolutionary divergence of enzymatic mechanisms for posttranslational polyglutamylation. *Cell*, 2009, 137(6): 1076-87
- [29] Alexander JE, Hunt DF, Lee MK, et al. Characterization of posttranslational modifications in neuron-specific class III  $\beta$ -tubulin by mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(11): 4685-9
- [30] Bobiniec Y, Moudjou M, Fouquet JP, et al. Glutamylolation of centriole and cytoplasmic tubulin in proliferating non-neuronal cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1998, 39(3): 223-32
- [31] Bre MH, de Nechaud B, Wolff A, et al. Glutamylated tubulin probed in ciliates with the monoclonal antibody



- GT335. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1994, 27(4): 337-49
- [32] Fouquet JP, Edde B, Kann ML, et al. Differential distribution of glutamylated tubulin during spermatogenesis in mammalian testis. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1994, 27(1): 49-58
- [33] Bobinac Y, Khodjakov A, Mir LM, et al. Centriole disassembly *in vivo* and its effect on centrosome structure and function in vertebrate cells. *J Cell Biol*, 1998, 143(6): 1575-89
- [34] Janke C, Rogowski K, Wloga D, et al. Tubulin polyglutamylase enzymes are members of the TTL domain protein family. *Science*, 2005, 308(5729): 1758-62
- [35] Mukai M, Ikegami K, Sugiura Y, et al. Recombinant mammalian tubulin polyglutamylase TTLL7 performs both initiation and elongation of polyglutamylation on  $\beta$ -tubulin through a random sequential pathway. *Biochemistry*, 2009, 48(5): 1084-93
- [36] Wolff A, de Nechaud B, Chillet D, et al. Distribution of glutamylated  $\alpha$  and  $\beta$ -tubulin in mouse tissues using a specific monoclonal antibody, GT335. *Eur J Cell Biol*, 1992, 59(2): 425-32
- [37] Suryavanshi S, Edde B, Fox LA, et al. Tubulin glutamylation regulates ciliary motility by altering inner dynein arm activity. *Curr Biol*, 2010, 20(5): 435-40
- [38] van Dijk J, Rogowski K, Miro J, et al. A targeted multienzyme mechanism for selective microtubule polyglutamylation. *Mol Cell*, 2007, 26(3): 437-48
- [39] Kimura Y, Kurabe N, Ikegami K, et al. Identification of tubulin deglutamylase among *Caenorhabditis elegans* and mammalian cytosolic carboxypeptidases (CCPs). *J Biol Chem*, 2010, 285(30): 22936-41
- [40] Redeker V, Levilliers N, Schmitter JM, et al. Polyglycylation of tubulin: a posttranslational modification in axonemal microtubules. *Science*, 1994, 266(5191): 1688-91
- [41] Bre MH, Redeker V, Vinh J, et al. Tubulin polyglycylation: differential posttranslational modification of dynamic cytoplasmic and stable axonemal microtubules in paramecium. *Mol Biol Cell*, 1998, 9(9): 2655-65
- [42] Wloga D, Webster DM, Rogowski K, et al. TTLL3 Is a tubulin glycine ligase that regulates the assembly of cilia. *Dev Cell*, 2009, 16(6): 867-76
- [43] Ikegami K, Setou M. TTLL10 can perform tubulin glycylation when co-expressed with TTLL8. *FEBS Lett*, 2009, 583(12): 1957-63
- [44] Eipper BA. Properties of rat brain tubulin. *J Biol Chem*, 1974, 249(5): 1407-16
- [45] Luduena RF, Zimmermann HP, Little M. Identification of the phosphorylated  $\beta$ -tubulin isotype in differentiated neuroblastoma cells. *FEBS Lett*, 1988, 230(1-2): 142-6
- [46] Gard DL, Kirschner MW. A polymer-dependent increase in phosphorylation of  $\beta$ -tubulin accompanies differentiation of a mouse neuroblastoma cell line. *J Cell Biol*, 1985, 100(3): 764-74
- [47] Caudron F, Denarier E, Thibout-Quintana JC, et al. Mutation of Ser172 in yeast  $\beta$  tubulin induces defects in microtubule dynamics and cell division. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13553
- [48] Ren Y, Zhao J, Feng J. Parkin binds to  $\alpha/\beta$  tubulin and increases their ubiquitination and degradation. *J Neurosci*, 2003, 23(8): 3316-24
- [49] Song Y, Kirkpatrick LL, Schilling AB, et al. Transglutaminase and polyamination of tubulin: posttranslational modification for stabilizing axonal microtubules. *Neuron*, 2013, 78(1): 109-23
- [50] Caron JM. Posttranslational modification of tubulin by palmitoylation: I. *In vivo* and cell-free studies. *Mol Biol Cell*, 1997, 8(4): 621-36
- [51] Walgren JL, Vincent TS, Schey KL, et al. High glucose and insulin promote O-GlcNAc modification of proteins, including  $\alpha$ -tubulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003, 284(2): E424-34
- [52] Ji S, Kang JG, Park SY, et al. O-GlcNAcylation of tubulin inhibits its polymerization. *Amino Acids*, 2011, 40(3): 809-18
- [53] Wong CC, Xu T, Rai R, et al. Global analysis of posttranslational protein arginylation. *PLoS Biol*, 2007, 5(10): e258
- [54] Dompierre JP, Godin JD, Charrin BC, et al. Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *J Neurosci*, 2007, 27(13): 3571-83
- [55] d'Ydewalle C, Krishnan J, Chiheb DM, et al. HDAC6 inhibitors reverse axonal loss in a mouse model of mutant HSPB1-induced Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Med*, 2011, 17(8): 968-74
- [56] Li L, Wei D, Wang Q, et al. MEC-17 deficiency leads to reduced  $\alpha$ -tubulin acetylation and impaired migration of cortical neurons. *J Neurosci*, 2012, 32(37): 12673-83
- [57] Aguilar A, Becker L, Tedeschi T, et al.  $\alpha$ -tubulin K40 acetylation is required for contact inhibition of proliferation and cell-substrate adhesion. *Mol Biol Cell*, 2014, 25(12): 1854-66
- [58] Montagnac G, Meas-Yedid V, Irondele M, et al.  $\alpha$ TAT1 catalyses microtubule acetylation at clathrin-coated pits. *Nature*, 2013, 502(7472): 567-70
- [59] Janke C. The tubulin code: molecular components, readout mechanisms, and functions. *J Cell Biol*, 2014, 206(4): 461-72
- [60] Gundersen GG, Kalnoski MH, Bulinski JC. Distinct populations of microtubules: tyrosinated and nontyrosinated  $\alpha$  tubulin are distributed differently *in vivo*. *Cell*, 1984, 38(3): 779-89
- [61] Webster DR, Gundersen GG, Bulinski JC, et al. Differential turnover of tyrosinated and detyrosinated microtubules. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(24): 9040-4
- [62] Maney T, Hunter AW, Wagenbach M, et al. Mitotic centromere-associated kinesin is important for anaphase chromosome segregation. *J Cell Biol*, 1998, 142(3): 787-801
- [63] Cambray-Deakin MA, Burgoyne RD. Posttranslational modifications of  $\alpha$ -tubulin: acetylated and detyrosinated forms in axons of rat cerebellum. *J Cell Biol*, 1987, 104(6): 1569-74

- [64] Robson SJ, Burgoyne RD. Differential localisation of tyrosinated, detyrosinated, and acetylated  $\alpha$ -tubulins in neurites and growth cones of dorsal root ganglion neurons. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1989, 12(4): 273-82
- [65] Ereck C, Peris L, Andrieux A, et al. A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(22): 7853-8
- [66] Lafanechere L, Courtay-Cahen C, Kawakami T, et al. Suppression of tubulin tyrosine ligase during tumor growth. *J Cell Sci*, 1998, 111 ( Pt 2): 171-81
- [67] Mialhe A, Lafanechere L, Treilleux I, et al. Tubulin detyrosination is a frequent occurrence in breast cancers of poor prognosis. *Cancer Res*, 2001, 61(13): 5024-7
- [68] Ikegami K, Sato S, Nakamura K, et al. Tubulin polyglutamylolation is essential for airway ciliary function through the regulation of beating asymmetry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(23): 10490-5
- [69] Kubo T, Yanagisawa HA, Yagi T, et al. Tubulin polyglutamylolation regulates axonemal motility by modulating activities of inner-arm dyneins. *Curr Biol*, 2010, 20(5): 441-5
- [70] Vogel P, Hansen G, Fontenot G, et al. Tubulin tyrosine ligase-like 1 deficiency results in chronic rhinosinusitis and abnormal development of spermatid flagella in mice. *Vet Pathol*, 2010, 47(4): 703-12
- [71] Lee GS, He Y, Dougherty EJ, et al. Disruption of *Tll5/stamp* gene (tubulin tyrosine ligase-like protein 5/SRC-1 and TIF2-associated modulatory protein gene) in male mice causes sperm malformation and infertility. *J Biol Chem*, 2013, 288(21): 15167-80
- [72] Audebert S, Koulakoff A, Berwald-Netter Y, et al. Developmental regulation of polyglutamylated  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin in mouse brain neurons. *J Cell Sci*, 1994, 107 ( Pt 8): 2313-22
- [73] Fernandez-Gonzalez A, La Spada AR, Treadaway J, et al. *Purkinje cell degeneration (pcd)* phenotypes caused by mutations in the axotomy-induced gene, *Nna1*. *Science*, 2002, 295(5561): 1904-6
- [74] Iftode F, Clerot JC, Levilliers N, et al. Tubulin polyglycylation: a morphogenetic marker in ciliates. *Biol Cell*, 2000, 92(8-9): 615-28
- [75] Sharma N, Bryant J, Wloga D, et al. Katanin regulates dynamics of microtubules and biogenesis of motile cilia. *J Cell Biol*, 2007, 178(6): 1065-79
- [76] Bosch Grau M, Gonzalez Curto G, Rocha C, et al. Tubulin glycylation and glutamylases have distinct functions in stabilization and motility of ependymal cilia. *J Cell Biol*, 2013, 202(3): 441-51
- [77] Pathak N, Austin CA, Drummond IA. Tubulin tyrosine ligase-like genes *tll3* and *tll6* maintain zebrafish cilia structure and motility. *J Biol Chem*, 2011, 286(13): 11685-95
- [78] Peters JD, Furlong MT, Asai DJ, et al. Syk, activated by cross-linking the B-cell antigen receptor, localizes to the cytosol where it interacts with and phosphorylates  $\alpha$ -tubulin on tyrosine. *J Biol Chem*, 1996, 271(9): 4755-62
- [79] Faruki S, Geahlen RL, Asai DJ. Syk-dependent phosphorylation of microtubules in activated B-lymphocytes. *J Cell Sci*, 2000, 113 ( Pt 14): 2557-65
- [80] Janke C, Kneussel M. Tubulin post-translational modifications: encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton. *Trends Neurosci*, 33(8): 362-72
- [81] Bulinski JC, Richards JE, Piperno G. Posttranslational modifications of  $\alpha$  tubulin: detyrosination and acetylation differentiate populations of interphase microtubules in cultured cells. *J Cell Biol*, 1988, 106(4): 1213-20
- [82] Maruta H, Greer K, Rosenbaum JL. The acetylation of  $\alpha$ -tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules. *J Cell Biol*, 1986, 103(2): 571-9
- [83] Howes SC, Alushin GM, Shida T, et al. Effects of tubulin acetylation and tubulin acetyltransferase binding on microtubule structure. *Mol Biol Cell*, 2014, 25(2): 257-66
- [84] Szyk A, Deaconescu AM, Spector J, et al. Molecular basis for age-dependent microtubule acetylation by tubulin acetyltransferase. *Cell*, 2014, 157(6): 1405-15
- [85] Brown A, Li Y, Slaughter T, et al. Composite microtubules of the axon: quantitative analysis of tyrosinated and acetylated tubulin along individual axonal microtubules. *J Cell Sci*, 1993, 104 ( Pt 2): 339-52
- [86] Khawaja S, Gundersen GG, Bulinski JC. Enhanced stability of microtubules enriched in detyrosinated tubulin is not a direct function of detyrosination level. *J Cell Biol*, 1988, 106(1): 141-9
- [87] Peris L, Wagenbach M, Lafanechere L, et al. Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. *J Cell Biol*, 2009, 185(7): 1159-66
- [88] Sirajuddin M, Rice LM, Vale RD. Regulation of microtubule motors by tubulin isotypes and post-translational modifications. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(4): 335-44
- [89] Paturle-Lafanechere L, Manier M, Trigault N, et al. Accumulation of  $\Delta 2$ -tubulin, a major tubulin variant that cannot be tyrosinated, in neuronal tissues and in stable microtubule assemblies. *J Cell Sci*, 1994, 107 ( Pt 6): 1529-43
- [90] Reed NA, Cai D, Blasius TL, et al. Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr Biol*, 2006, 16(21): 2166-72
- [91] Walter WJ, Beranek V, Fischermeier E, et al. Tubulin acetylation alone does not affect kinesin-1 velocity and run length *in vitro*. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42218
- [92] Kaul N, Soppina V, Verhey KJ. Effects of  $\alpha$ -tubulin K40 acetylation and detyrosination on kinesin-1 motility in a purified system. *Biophys J*, 2014, 106(12): 2636-43
- [93] Kreitzer G, Liao G, Gundersen GG. Detyrosination of tubulin regulates the interaction of intermediate filaments with microtubules *in vivo* via a kinesin-dependent mechanism. *Mol Biol Cell*, 1999, 10(4): 1105-18
- [94] Konishi Y, Setou M. Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons. *Nat Neurosci*, 2009, 12(5): 559-67
- [95] Ikegami K, Heier RL, Taruishi M, et al. Loss of  $\alpha$ -tubulin polyglutamylolation in ROSA22 mice is associated with

- abnormal targeting of KIF1A and modulated synaptic function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(9): 3213-8
- [96] Sullivan KF, Cleveland DW. Identification of conserved isotype-defining variable region sequences for four vertebrate  $\beta$  tubulin polypeptide classes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83(12): 4327-31
- [97] Sudo H, Baas PW. Acetylation of microtubules influences their sensitivity to severing by katanin in neurons and fibroblasts. *J Neurosci*, 2010, 30(21): 7215-26
- [98] Kumar N, Flavin M. Modulation of some parameters of assembly of microtubules *in vitro* by tyrosinolation of tubulin. *Eur J Biochem*, 1982, 128(1): 215-22
- [99] Chapin SJ, Lue CM, Yu MT, et al. Differential expression of alternatively spliced forms of MAP4: a repertoire of structurally different microtubule-binding domains. *Biochemistry*, 1995, 34(7): 2289-301
- [100] Bieling P, Kandels-Lewis S, Telley IA, et al. CLIP-170 tracks growing microtubule ends by dynamically recognizing composite EB1/tubulin-binding sites. *J Cell Biol*, 2008, 183(7): 1223-33
- [101] Marcos S, Moreau J, Backer S, et al. Tubulin tyrosination is required for the proper organization and pathfinding of the growth cone. *PLoS One*, 2009, 4(4): e5405
- [102] Lacroix B, van Dijk J, Gold ND, et al. Tubulin polyglutamylation stimulates spastin-mediated microtubule severing. *J Cell Biol*, 2010, 189(6): 945-54
- [103] Boucher D, Larcher JC, Gros F, et al. Polyglutamylation of tubulin as a progressive regulator of *in vitro* interactions between the microtubule-associated protein Tau and tubulin. *Biochemistry*, 1994, 33(41): 12471-7
- [104] Larcher JC, Boucher D, Lazereg S, et al. Interaction of kinesin motor domains with  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin subunits at a tau-independent binding site. Regulation by polyglutamylation. *J Biol Chem*, 1996, 271(36): 22117-24
- [105] Bonnet C, Boucher D, Lazereg S, et al. Differential binding regulation of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by tubulin polyglutamylation. *J Biol Chem*, 2001, 276(16): 12839-48
- [106] Maas C, Belgardt D, Lee HK, et al. Synaptic activation modifies microtubules underlying transport of postsynaptic cargo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(21): 8731-6