

· 基础研究 ·

Gef26对果蝇原代细胞F-actin的调控作用

张晨晨^{1*}, 刘力娟², 欧梦竹²

¹东南大学医学院, 江苏 南京 210009; ²东南大学生命科学与技术学院, 发育与疾病相关基因教育部重点实验室, 江苏 南京 210096

[摘要] 目的:探讨Gef26对果蝇原代细胞发育的影响。方法:培养野生型、gef26突变体(gef26^{6/+}和gef26^{3/+})以及gef26^{6/+};Abl^{4/+}双突变体果蝇胚胎的原代细胞,观察细胞形态。对细胞骨架F-actin进行荧光染色,观察细胞骨架的分布。结果:在果蝇胚胎的原代细胞中,野生型肌肉细胞形态正常,gef26突变体的肌肉细胞形态明显异常。gef26^{6/+};Abl^{4/+}双突变体肌肉细胞形态正常,即阿贝尔森酪氨酸激酶(Abelson tyrosine kinase, Abl)突变挽救gef26突变体肌肉细胞形态异常的表型。野生型肌肉细胞中的F-actin呈现规整的形态和连续排布,而两株gef26突变体肌肉细胞中的F-actin排布却呈现出不规整形态和不连续排布。gef26^{6/+};Abl^{4/+}双突变体细胞中的F-actin呈现出规整的形态和连续的排布,即Abl突变挽救gef26突变体F-actin组装紊乱的表型。结论:Gef26可能通过Abl信号通路调控肌动蛋白细胞骨架的组装。

[关键词] Gef26;酪氨酸激酶;细胞骨架

[中图分类号] Q245

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)10-1431-06

doi:10.7655/NYDXBNS20201006

Gef26 regulates F-actin organization in *Drosophila* primary culture

ZHANG Chenchen^{1*}, LIU Lijuan², OU Mengzhu²

¹Medical School of Southeast University, Nanjing 210009; ²School of Life Sciences and Technology, Southeast University, The Key Laboratory of Development Genes and Human Diseases, Ministry of Education, Nanjing 210096, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of Gef26 in *Drosophila* primary culture. **Methods:** Through primary culture of *Drosophila* wild type, gef26 mutants and gef26^{6/+}; Abl^{4/+} mutants, the cell shape is observed, and by fluorescent staining of F-actin the distribution of cytoskeleton can be observed. **Results:** In *Drosophila* primary culture, wild type muscle cells have normal morphology, and the morphology of muscle cells of the gef26 mutants is obviously abnormal. The gef26^{6/+};Abl^{4/+} mutants muscle cells have a normal morphology, namely the phenotype of gef26 mutant muscle cells with abnormal morphology rescued by Abelson tyrosine kinase (Abl) mutation. F-actin in wild type muscle cells showed a regular morphology and continuous arrangement, while that in the gef26 mutants muscle cells showed irregular morphology and discontinuous arrangement. Meanwhile, F-actin in gef26^{6/+}; Abl^{4/+} double mutant cells showed a regular morphology and continuous arrangement, that is, the phenotype of gef26 mutant with disordered F-actin arrangement rescued by Abl mutation. **Conclusion:** Gef26 regulates cell cytoskeleton organization through Abl signaling during muscle cells development.

[Key words] Gef26; tyrosine kinase; cytoskeleton

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(10):1431-1436]

Ras超家族中很多成员在细胞的骨架组装中起着至关重要的作用。Ras最早作为原癌基因被

发现^[1], Ras家族基因编码小G蛋白,在细胞的信号转导中被激活并启动下游的一系列信号途径,且参与细胞的增殖分化。小G蛋白发挥功能则必须由鸟苷酸交换因子(guanine nucleotide exchange factor, GEF)来活化,将小G蛋白由GDP结合的非活化状态激活为GTP结合的活化状态^[2-3],进而启动下游的一

[基金项目] 国家自然科学基金(30928014, 31600824)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: 103008814@seu.edu.cn

系列信号通路。Gef26属于鸟苷酸交换因子的一种,最初作为Rap1特异性激活因子而被发现。在果蝇成虫中,gef26突变体翅膀、眼睛等发育均出现明显异常,而Gef26在其发育中的具体作用未知。本研究利用果蝇胚胎原代细胞培养技术探索Gef26对果蝇原代细胞的影响,为Gef26的研究提供更多线索。

细胞骨架在细胞增殖、分化、迁移等基本生命活动中起着重要作用。除了保持细胞形态^[4]、承受外力、维持细胞内部结构的有序性外,也参与了细胞之间以及细胞与细胞外基质的交流。作为细胞骨架主要成分之一的纤维状肌动蛋白,在细胞形态、细胞迁移等方面作用重大。本研究通过果蝇胚胎原代细胞培养技术发现,gef26突变体细胞中纤维状肌动蛋白组装紊乱,这提示Gef26在细胞骨架组装中起着重要作用。

Gef26在进化上具有保守性,果蝇的Gef26与人类PDZ-GEF有着高度的同源性^[8]。本研究通过果蝇的原代细胞培养系统分析肌肉细胞发育过程中Gef26对细胞的影响,为Gef26及人类相关基因的研究提供更多线索。

1 材料和方法

1.1 材料

W1118、sb/TM6B、If/Cyo、If/Cyo; sb/TM6B等工具果蝇为东南大学谢维教授实验室保存。gef26品系(gef26⁶/cyo-twist-GFP、gef26³/SM5-TM6)从美国布卢明顿果蝇资源中心订购。Abl品系(Abl⁴ kar red e/TM6B, Tb)来自美国威斯康星大学麦迪逊分校Hoffmann教授实验室。

细胞培养基包括80% Drosophila Schneider medium、20%胎牛血清(Gibco公司,美国)、终浓度为200 ng/mL胰岛素、50 U/mL青霉素以及50 g/mL链霉素(Sigma公司,美国)。0.05 mg/mL罗丹明标记鬼笔环肽(TRITC-conjugated phalloidin)(Sigma公司,美国)。

显微针的制备:将直径0.75 mm的玻璃微细管(Victor公司,日本)经过拉针仪制备为尖端为0.15 mm的显微针。

1.2 方法

1.2.1 果蝇品系整合

gef26⁶/+; Abl⁴/+通过平衡子和遗传标记整合到同一株果蝇上;gef26³/+、gef26⁶/+、Abl⁴/+通过野生型转移突变体上的平衡子。因为纯合突变体的致死

效应,所以部分实验数据来自于杂合突变体。

1.2.2 细胞培养方法

单胚胎的细胞培养方法参考果蝇幼虫中枢神经系统的细胞培养方法^[9]、果蝇胚胎“巨大”神经培养系统^[10]以及果蝇的原代神经培养方法^[11-12]。

选择第7~8期的果蝇胚胎(产卵后3 h~3 h 40 min),胚胎在室温培养基中孵育2 h,可发育至第10期晚期;孵育4 h,可发育至第12期;孵育7 h,可发育至第13期。待胚胎发育到实验所需时期后,用制备好的显微针吸取出胚胎内部组织,并将胚胎组织种在细胞培养基中,将吸取的组织均匀分散在室温的细胞培养基中,放在密闭的保湿盒子内,置于室温22~25℃进行培养。果蝇胚胎中的肌细胞融合发生在胚胎发育后期(第12~15期;产卵后7.5~13.0 h),该实验原代培养的细胞提取自胚胎第12期,并在培养基上培养2~3 d。果蝇的肌肉纤维是1个多核细胞,可通过多核的形态特征进行区分。

1.2.3 细胞免疫荧光染色

用PBS(pH 7.2)洗3次;用3.7%多聚甲醛固定10 min;用PBS洗5次,每次5 min;0.01% Triton X-100孵育2 min, PBS洗3次;3%牛血清白蛋白(BSA)孵育10 min; PBS洗5次,每次5 min; TRITC-conjugated phalloidin室温孵育25 min; PBS洗5次,每次5 min,用封片剂封片;Zeiss LSM710共聚焦显微镜进行图像采集,LSM Image Browser作图。

1.2.4 蛋白质免疫印迹

每组取等量细胞,加入适量SDS裂解缓冲液,研磨充分,沸水煮10 min,离心(12 000 r/min, 4℃, 10 min)取上清;每组取等量进行聚丙烯酰胺凝胶电泳:先在80 V电压电泳,待样品从浓缩胶进入分离胶后将电压调至120 V,待溴酚蓝到达分离胶底部时停止电泳;转移至硝酸纤维素膜,用5%奶粉溶液封闭1 h;将膜置于一抗4℃孵育过夜;吸出一抗,用TBST洗4次,每次10 min;加二抗,反应60 min; TBST洗4次,每次10 min;暗室曝光。

1.3 统计学方法

利用统计软件SPSS 20.0进行数据分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较采用单因素方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Gef26影响肌肉细胞骨架组装

2.1.1 gef26突变体中肌肉细胞形态异常

本实验用Gef26的两种突变体:gef26³[在启动

子上插入P因子I(2)SH1450]以及 $gef26^6$ [缺失了I(2)SH1450插入位点附近约3 kb的片段^[7]] (图1)。

本研究发现,果蝇原代细胞中, $gef26$ 突变体的肌肉细胞形态与野生型肌肉细胞形态相比,形态明显异常,主要表现为突变体呈现出单核不连续的状态,而野生型肌肉细胞则是呈现多核连续状态(图2A)。将融合细胞进行统计学分析发现,野生型肌肉细胞的融合率与突变体肌肉细胞的融合率差异存在统计学意义(图2B)。这一结果提示Gef26可能参与了肌肉细胞的形态发生。

果蝇的肌肉细胞是多核细胞。这种多核细胞在果蝇的胚胎发育过程中由多个肌肉细胞融合而来。在 $gef26$ 突变体原代细胞中,我们发现突变体的肌肉细胞融合受到影响,这有可能是导致突变体成虫翅膀、眼睛等发育均出现明显异常的原因。

2.1.2 F-actin在 $gef26$ 突变体肌肉细胞中组装紊乱

为了探究F-actin组装是否确实受到影响,利用鬼笔环肽(phalloidin)染料标记细胞F-actin。观察发现,野生型肌肉细胞中的F-actin呈现出规整的形态和连续的排布,而两株 $gef26$ 突变体肌肉细胞中的F-actin排布却呈现出不规整的形态和不连续的排布(图3)。说明突变体中F-actin的组装确实发生了异常。

2.2 Gef26可以通过Abl信号通路影响F-actin组装

2.2.1 Abl突变挽救 $gef26$ 突变体肌肉细胞形态异常的表现

通过果蝇胚胎原代培养,我们发现与 $gef26^6$ 纯合突变体相比, $gef26^6/+$ 杂合突变体中也观察到类似的表型。为了研究Gef26与Abl之间的关系,我们通过遗传学方法得到双突变体 $gef26^6/+; Abl^4/+$ 。与单

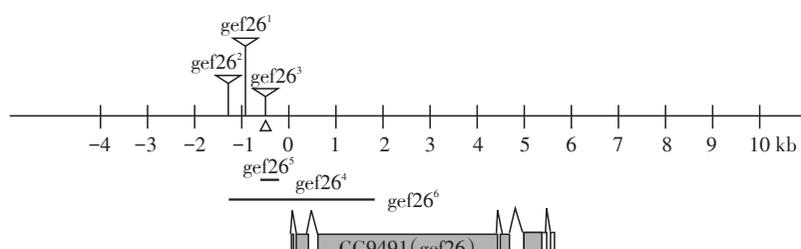
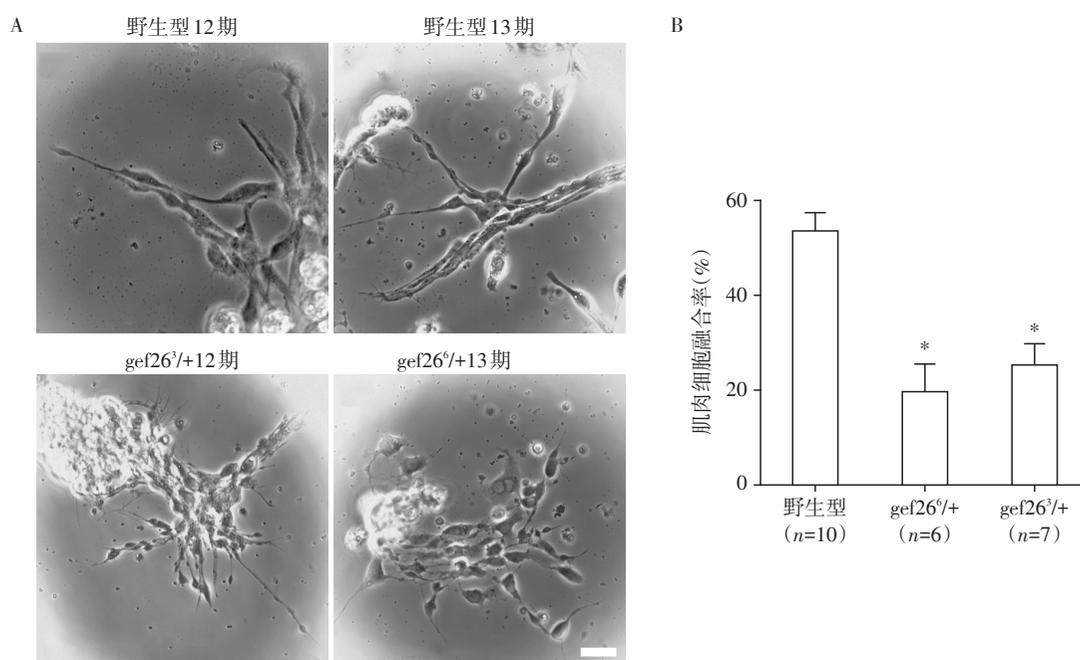


图1 $gef26$ 突变体分析

Figure 1 Analysis of the $gef26$ mutants



A:野生型、 $gef26$ 突变体的肌肉细胞形态($\times 630$);B:野生型、 $gef26$ 突变体细胞融合率统计图,与野生型比较,* $P < 0.01$ 。

图2 野生型、 $gef26$ 突变体的肌肉细胞形态及其细胞融合率

Figure 2 Morphology of muscle cells of wild type and $gef26$ mutants and cell fusion rate

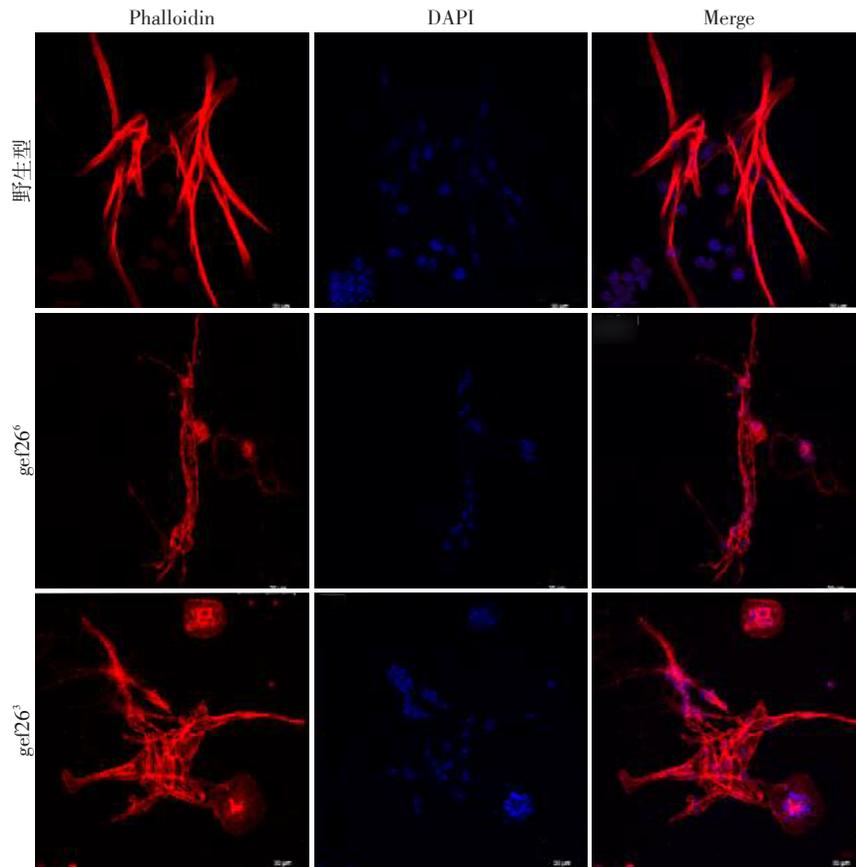
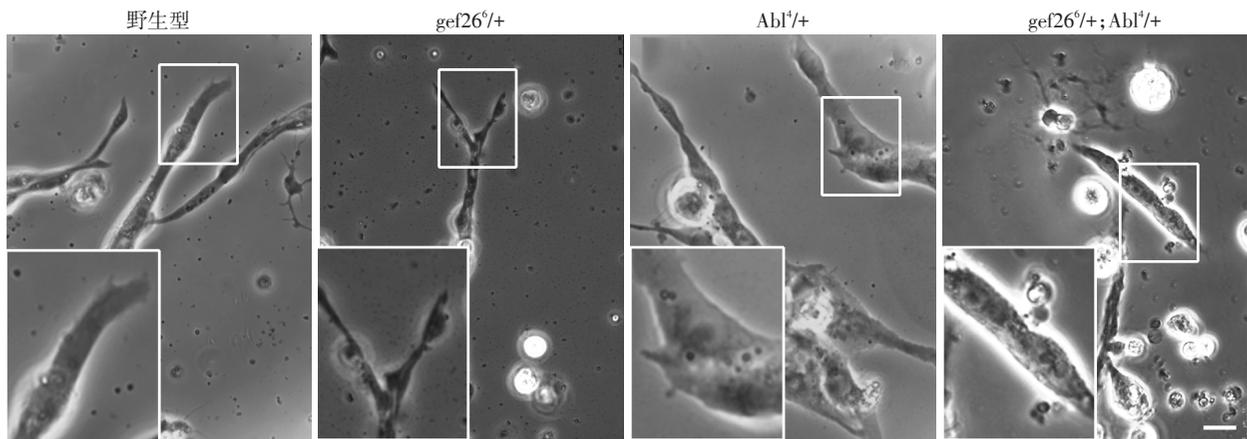


图3 F-actin在野生型以及gef26突变体中分布特征(免疫荧光,×630)

Figure 3 Distribution of F-actin in wild type and gef26 mutants(immunofluorescence,×630)



左下为框内部分同等扩大2倍。

图4 突变体以及双突变肌肉细胞的形态(×1 000)

Figure 4 Morphology of muscle cells of mutant and double mutant(×1 000)

突变体 $gef26^{6/+}$ 相比,前者肌肉细胞的形态更趋近于野生型(图4),可见 abl 突变可以挽救 $gef26^{6/+}$ 肌肉细胞萎缩的表型,因此 $gef26$ 突变引起的表型可能是 Abl 依赖的。

然后,我们对细胞进行免疫荧光染色,发现 $gef26$ 突变体的肌肉细胞中 Abl 蛋白量相对野生型有所增多。结合上面的遗传学分析结果,我们推测

$Gef26$ 有可能是通过影响 Abl 的蛋白水平来影响 F-actin 的组装。于是我们也用蛋白质免疫印迹对 Abl 的蛋白量进行了检测,不过很遗憾的是我们没有在蛋白量上发现明显差异。

2.2.2 Abl 突变挽救 $gef26$ 突变体 F-actin 组装紊乱的表型

利用果蝇原代培养技术,我们在 $gef26^{6/+}$ 中观察

到F-actin的排列表型与纯合突变体稍有差异,这可能是Gef26的作用存在剂量效应引起的。Abl^{4/+}突变体肌肉细胞中细胞骨架F-actin的组装未见显著异常。而我们在gef26^{6/+}; Abl^{4/+}中观察到F-actin的排列表型基本和野生型相似(图5)。这些结果与abl突变挽救gef26突变体肌肉形态异常的结果一致。以上这些结果说明,Gef26很可能通过Abl参与F-actin的组装来影响肌肉细胞的形态发生。

3 讨论

Gef26有多个结构域,主要包含环磷酸酰苷结合结构域(cNMP)、PSD-95/DlgA/ZO-1(PDZ)结构域、Ras交换基序(REM)、Ras/Rap1结合结构域(RA)及催化结构域(GEF)。Gef26是GEF-Ras信号的一种,其作为GTPase Rap1特异性激活因子而被发现,Gef26特异性激活GTPase Rap1并且在细胞信号转导中起着分子开关的作用。序列比对的结果显示果蝇的Gef26与人类的同源物PDE-GEF有着52%同源性,其与秀丽隐杆线虫有着45%的同源性^[8]。

果蝇胚胎的原代细胞培养技术是由Seecof等^[13]在1971年开创的。本课题利用该技术为基础研究Gef26对果蝇肌肉细胞骨架的影响。本研究主要从细胞形态学以及细胞骨架蛋白的免疫荧光染色两方面观察Gef26对肌肉细胞发育的影响。在果蝇原代细胞系统中,Gef26突变体的肌肉细胞未能进行完全融合,且细胞呈现萎缩状态,而正常肌肉细胞是融合后的多核细胞且形态伸展良好。

通过细胞免疫染色发现,Gef26突变体肌肉细胞的F-actin呈现不规则紊乱的不连续组装,而野生型肌肉细胞的F-actin是整齐规律有序的丝状结构组装。该实验结果表明Gef26调控肌肉细胞的细胞骨架F-actin的组装。Gef26突变体很可能通过影响F-actin的组装参与肌肉细胞的形态发生,进而导致果蝇成虫翅膀眼睛等发育异常的表型。

Huelsmann等^[19]研究发现,果蝇胚胎中Gef26通过整联蛋白和Rap1调控巨噬细胞的形态发生和迁移。谢维教授实验室近期通过果蝇研究发现,Gef26通过细胞黏附分子Fasciclin II影响果蝇神经

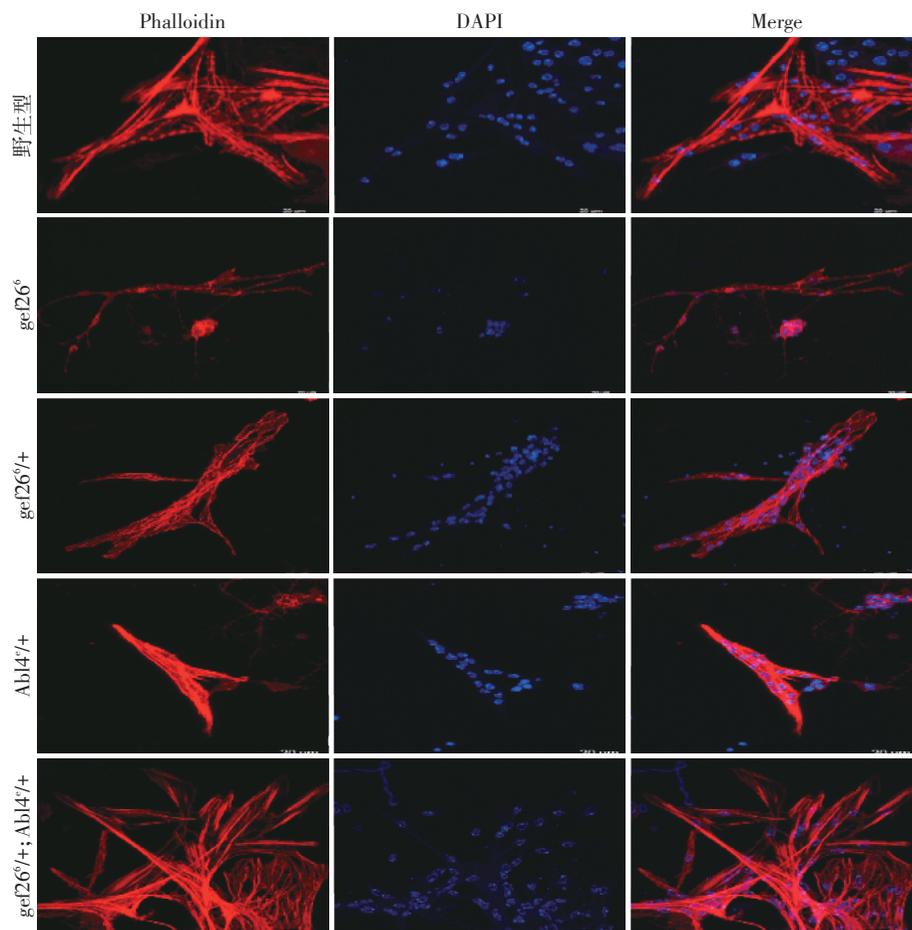


图5 F-actin在gef26突变体以及双突变体中分布特征(免疫荧光,×630)

Figure 5 Distribution of F-actin in mutant and double mutant (immunofluorescence, ×630)

肌肉接头发育^[5]。Liebl等^[6]研究发现鸟苷酸交换因子家族成员 Trio 可以通过 Abl 来影响细胞骨架的组装,进而影响神经元轴突的导向。Hou等^[7]发现 Gef26-Rap1 信号通路通过影响黏着连接的形成调控果蝇生殖干细胞在精巢中的锚定。这些实验结果提示 Gef26 可能通过 Abl 信号通路影响细胞骨架的组装。

Abl^{4/+}突变体肌肉细胞中细胞骨架 F-actin 的组装未见显著异常。而在 gef26^{6/+}; Abl^{4/+}双突变体中,肌肉细胞的 F-actin 的组装恢复到野生型水平,即 abl 的突变可以挽救 Gef26 突变体肌肉细胞中 F-actin 组装,这提示 Abl 与 Gef26 存在遗传学相互作用,且参与 Gef26 调控 F-actin 的功能。但 Gef26 是与 Abl 直接相互作用来影响 F-actin 的组装,还是存在其他分子的参与,仍有待更多的实验去探索和验证。

[参考文献]

- [1] ROSENBERG N E, CLARK D R, WITTE O N. Abelson murine leukemia virus mutants deficient in kinase activity and lymphoid cell transformation [J]. *J Virol*, 1980, 36 (3):766-774
- [2] LOWY D R, WILLUMSEN B M. Function and regulation of ras [J]. *Annu Rev Biochem*, 1993, 62:851-891
- [3] BOS J L. All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral [J]. *EMBO J*, 1998, 17(23):6776-6782
- [4] 张晓波. IQGAP1 在调节足细胞细胞骨架重组中的作用 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(8): 985-989
- [5] OU M, WANG S, SUN M, et al. The PDZ-GEF Gef26 regulates synapse development and function via Fas II and Rap1 at the *Drosophila* neuromuscular junction [J]. *Exp Cell Res*, 2019, 374(2):342-352
- [6] LIEBL E C, FORSTHOEFEL D J, FRANCO L S, et al. Dosage-sensitive, reciprocal genetic interactions between the Abl tyrosine kinase and the putative GEF trio reveal trio's role in axon pathfinding [J]. *Neuron*, 2000, 26(1): 107-118
- [7] WANG H, SINGH S R, ZHENG Z, et al. Rap-GEF signaling controls stem cell anchoring to their niche through regulating DE-cadherin-mediated cell adhesion in the *Drosophila* testis [J]. *Dev Cell*, 2006, 10(1): 117-126
- [8] LEE J H, CHO K S, LEE J, et al. *Drosophila* PDZ-GEF, a guanine nucleotide exchange factor for Rap1 GTPase, reveals a novel upstream regulatory mechanism in the mitogen-activated protein kinase signaling pathway [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(21):7658-7666
- [9] LESSING D, BONINI N M. Maintaining the brain: insight into human neurodegeneration from *Drosophila melanogaster* mutants [J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(6):359-370
- [10] BILEN J, BONINI N M. *Drosophila* as a model for human neurodegenerative disease [J]. *Annu Rev Genet*, 2005, 39:153-171
- [11] WU C F, SUZUKI N, POO M M. Dissociated neurons from normal and mutant *Drosophila* larval central nervous system in cell culture [J]. *J Neurosci*, 1983, 3(9): 1888-1899
- [12] BAI J, SEPP K J, PERRIMON N. Culture of *Drosophila* primary cells dissociated from gastrula embryos and their use in RNAi screening [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(10): 1502-1512
- [13] SEECOF R L, ALLEAUME N, TEPLITZ R L, et al. Differentiation of neurons and myocytes in cell cultures made from *Drosophila* gastrulae [J]. *Exp Cell Res*, 1971, 69 (1):161-173
- [14] BLANCHON L, BOUJEMAA-PATERSKI R, SYKES C, et al. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility [J]. *Physiol Rev*, 2014, 94(1):235-263
- [15] WANG P, HUSSEY P J. Interactions between plant endomembrane systems and the actin cytoskeleton [J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6:422
- [16] PERCIPALLE P. Co-transcriptional nuclear actin dynamics [J]. *Nucleus*, 2013, 4(1):43-52
- [17] LU L, WU G, XU X, et al. Soybean actin-depolymerizing factor 2 interacts with Soybean mosaic virus-encoded P3 protein [J]. *Virus Genes*, 2015, 50(2):333-339
- [18] BARRERO R A, UMEDA M, YAMAMURA S, et al. Arabidopsis CAP regulates the actin cytoskeleton necessary for plant cell elongation and division [J]. *Plant Cell*, 2002, 14(1):149-163
- [19] HUELSMANN S, HEPPEL C, MARCHESE D, et al. The PDZ-GEF dizzy regulates cell shape of migrating macrophages via Rap1 and integrins in the *Drosophila* embryo [J]. *Development*, 2006, 133(15):2915-2924
- [20] LIU L, WU C F. Distinct effects of Abelson kinase mutations on myocytes and neurons in dissociated *Drosophila* embryonic cultures: mimicking of high temperature [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1):e86438

[收稿日期] 2019-08-14