

科研报告书

姓名：熊妍

导师：蔡亮

手机：15221925597

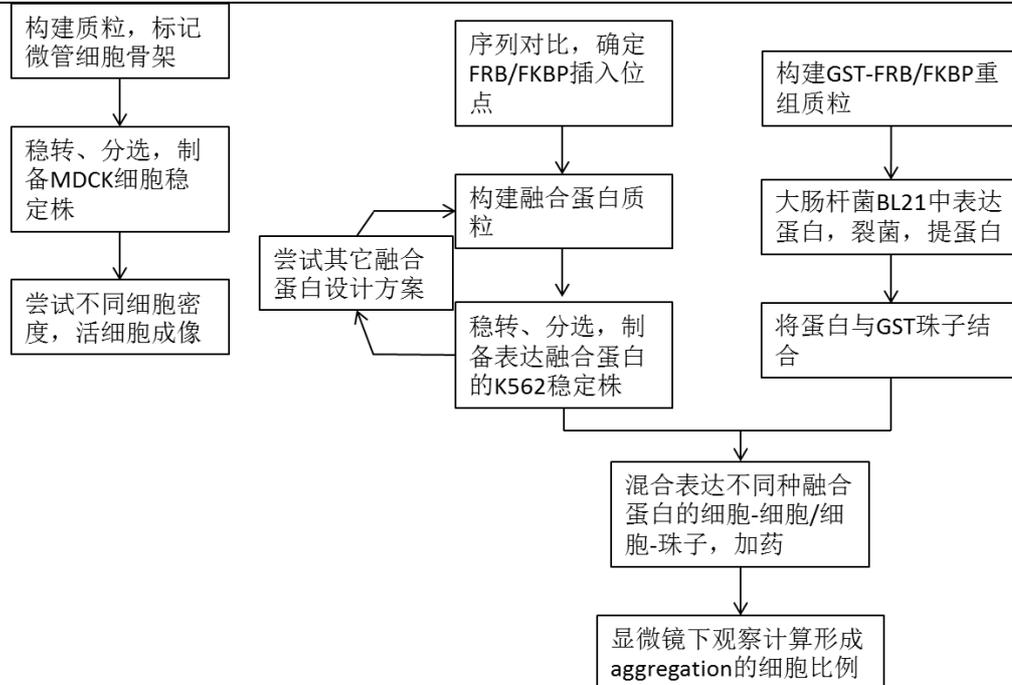
核心科学问题

微管细胞骨架在细胞连接发生和形成中的作用

与导师在研项目的关系

学生独立课题

技术路线图



当期科研进度

1. 我们首先进行的是在上皮细胞中的直接活细胞成像观察。并且寻找合适的标记微管的方法。用红色荧光蛋白 mCherry 标记微管末端结合蛋白 EB1 可以清楚地标记微管末端，而直接标记微丝蛋白则不行。相比之下，选用第一种标记方法。
2. 利用实验室已有的用绿色荧光蛋白 EGFP 标记了细胞黏附分子 Nectin/E-cadherin 的 MDCK 稳定株，开始 2min/张拍摄 12 个小时的活细胞成像。分别拍摄到 junction 形成的全过程和已经形成的 junction 的动态变化。但拍摄间隔过长，不能对同一根微管的末端进行持续追踪。
3. 短间隔，短时间的拍摄。在试拍的过程中分别进行了 30s, 10s, 5s, 3s, 2s/张的拍摄，并且分别进行了将额外红色细胞（mCherry-EB1）加入绿色细胞（EGFP）/额外绿色细胞加入红色细胞的拍摄。发现 2s/张 才可以对 EB1 进行连续跟踪，额外绿色细胞加入红色细胞更容易找到微管运动的焦平面。但 20min 之后通常会出现荧光淬灭的现象，不易拍 junction 形成的过程。
4. 在拍摄的过程中，找到了疑似的形成细胞间连接的过程。并且进行了作图。发现在有微管打到两细胞连接处 8s 之后，该处细胞膜的 E-cadherin 出现了聚集（荧光强度增强）。但是之后该处的荧光强度又开始消退，E-cadherin 的聚集不能持久，因此这些蛋白是否参与到了 junction 形成仍有疑问。

	<p>5. 因为内源性细胞间连接不容易控制其形成的时间，难以对其进行拍摄，因此我们同时开始利用 FRB-<i>rapamycin</i>-FKBP 进行人工可控的细胞间连接的构建。我首先选择了四次跨膜蛋白 CD9，进行不同物种 CD9 之间的序列比对，找到插入目的蛋白 FRB/FKBP 的合适不保守位点之后，构建重组质粒，并且将重组质粒瞬转 HeLa 细胞。确认融合蛋白的细胞膜定位。</p> <p>6. 由瞬转的结果，发现融合蛋白的膜定位良好。在检测融合蛋白效果的试验中，选择悬浮白血病细胞 K562 作为实验对象，得到其稳定株之后，首先进行了细胞-细胞实验：分别将表达 CD9-FRB，CD9-FKBP 的两种细胞混在一起。加入 500 nmol <i>rapamycin</i> 之后，在 20X 镜头下选取 30 个视野，计算形成细胞 cluster 的细胞数量与单独的细胞数量的比值。对照组则是加入同种细胞，按照同样的方法计算。根据统计结果可以看出，两组差异不显著。</p> <p>7. 为了排除细胞膜表面的其他蛋白的影响，我进行了质粒的构建，蛋白的纯化，并最终制备了表面连接有 FRB/FKBP 的 GST 珠子。分别将表达有同种蛋白或异种蛋白的细胞于珠子融合，在 20X 镜头下选取 30 个视野，分别计算与珠子靠近的细胞占视野中所有有荧光的细胞的比例。根据统计数据，差异不显著。</p> <p>8. 更换跨膜蛋白的设计，利用 CD86 的跨膜区将 FRB/FKBP 表达在细胞膜外，目前已完成稳定株的构建和上述的融合蛋白功能验证，但是实验组和对照组的差异仍不明显。</p>
<p>相关学科的最新进展</p>	<p>上皮细胞可以由于板状伪足的不断突出和收缩碰到一起。之后两相邻细胞逐渐形成细胞间粘着连接(adherens junctions, AJs)，组装细胞连接复合物。粘着连接非常动态，其内部结构不断地在进行重新分布。膜泡运输是一种很关键的负责其粘着连接组分改变的机制：Exocytic delivery 负责将参与组成粘着连接的蛋白从内质网运输到细胞膜上两细胞相互连接处。Endocytic delivery 则是负责将粘着连接的组分移出，从而导致其解体。除此之外，粘着连接的形成还与微丝细胞骨架紧密相关：其组装的每一步都伴随着皮层处微丝细胞骨架的急剧变化，它们会从短分支的微丝纤维变为长微丝纤维束(F-actin cable)。这些 F-actin 一开始会与粘着连接平面垂直，插入其中以支持其结构(1)。在上皮细胞粘着连接形成的过程中，原先彼此独立的粘着斑会逐渐融合，形成一个连续的粘着带，而这个过程也伴随着 F-actin 从原先的与粘着连接垂直，发展为平行于粘着连接并绕在其周围的微丝束，但是目前这种方向的改变机制有待研究(2)。</p> <p>1) 细胞粘着分子 E-cadherin 在 MDCK 上皮细胞连接中的调控方式</p> <p>Cadherins (calcium-dependent adhesion) 跨膜蛋白是粘着连接的重要组成部分，参与维持组织的完整及稳定性。此类蛋白依赖于钙离子行使功能，它们在胞内的部分联系着大量的信号蛋白，可引起下游的信号通路。上皮细胞粘着连接的组装最开始就是从两相邻细胞间形成最初的 E-cadherin clusters 开始的(3)。但是控制他们在粘着连接处的装配、维持和解聚的机制仍然有待研究。已有文章指出，E-cad 在成熟的细胞连接处的分布是十分动态的，以应对胞内胞外的刺激。目前关于 E-</p>

cad 在成熟细胞连接处的动态调控目前有几种假说, 其中一种认为细胞膜上有很多可以自由扩散的 cadherin, 可直接参与到细胞连接的形成。另一种则认为 E-cad 需要内吞或外排的膜泡运输来调控其在连接处的浓度。它们通过 apically directed intramembranous flow 到达粘着连接处, 有可能被运送到基底外侧细胞膜中的任何区域(4)。

最近几十年的生化实验和细胞实验表明, E-cad 在细胞连接处需要以 β -catenin (β -Cat) 和 α -catenin (α -Cat) 为核心形成 cluster, 并且需要一小部分非常稳定的 F-actin 定位在粘着连接处, 来稳定 cluster, 限制其扩散。而另一部分 F-actin 则形成非常动态的, 可收缩的网络环绕在粘着连接处用于维持其动态性。粘着连接的形成和解聚通常伴随着其周围 F-actin 的急剧变化。目前这种形态变化已经被很好的描述, 但是关于其机制仍有待研究。

2) 细胞粘着分子 Nectin 在 MDCK 细胞连接中的调控方式

Nectins 是另一种组成上皮细胞粘着连接的关键因子, 参与到不依赖钙离子的细胞连接。Nectin 在许多组织中表达, 比如上皮中的粘着连接, 神经组织的化学突触等。但相比于 Cadherin 则很少被研究。目前没有研究表明控制 nectin 膜泡运输至细胞膜的机制。相比于 Cadherin, 它更不易被胞吞。Nectin 和膜蛋白 membrane palmitoylated protein 3 的连接可以增加细胞膜上 Nectin-1 的表达水平 (5)。

3) 微管细胞骨架在 MDCK 细胞连接形成中的作用。

微丝微管是互相联系的。而蛋白位置的变化, 往往与细胞骨架的作用相关。细胞之间连接的形成, 以及上皮细胞极性的形成, 均需要微管细胞骨架的重新分布。荧光显微镜和电子显微镜的成像显示, 许多微管以与粘着连接垂直的方向排列并与之接触, 而这种接触对于上皮细胞粘着连接的形成很重要。在皮层处绑定的微管结合马达蛋白 dynein 也被证实参与到粘着连接形成的过程。E-cadherin 和 N-cadherin 在成纤维细胞中的表达促进粘着连接的形成, 同时也促进了微管负极的稳定, 促进微管细胞骨架的聚合(6)。另一方面, p120 catenin 可被微管正极定向的马达蛋白 kinesin 沿微管被运送到粘着连接处(7)。 β -catenin 则与微管负极定向的马达蛋白 dynein 相互联系(8)。失去微管结合蛋白 Nezna 和 centralspindlin 复合物的作用也会破坏粘着连接的完整性和稳定的状态(9)。

(1) Zhang, J., Betson, M., Erasmus, J., Zeikos, K., Bailly, M., Cramer, L.P., Braga, V.M., 2005. Actin at cell-cell junctions is composed of two dynamic and functional populations. *J. Cell Sci.* 118, 5549–5562.

(2) Ivanov, A.I., Hunt, D., Utech, M., Nusrat, A., Parkos, C.A., 2005a. Differential roles for actin polymerization and a myosin II motor in assembly of the epithelial apical junctional complex. *Mol. Biol. Cell* 16, 2636–2650.

(3) Gloushankova, N.A., Alieva, N.A., Krendel, M.F., Bonder, E.M., Feder, H.H., Vasiliev, J.M., Gelfand, I.M., 1997. Cell-cell contact changes the dynamics of lamellar activity in nontransformed epitheliocytes but not in their ras-transformed descendants. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 879–883.

(4) Kametani, Y., Takeichi, M., 2007. Basal-to-apical cadherin flow at cell junctions. *Nat. Cell Biol.* 9, 92–98.

(5) Dudak, A., Kim, J., Cheong, B., Federoff, H.J., Lim, S.T., 2011. Membrane palmitoylated proteins regulate trafficking and processing of nectins. *Eur. J. Cell Biol.* 90,

	<p>365–375</p> <p>(6) Stehbens, S.J., Paterson, A.D., Crampton, M.S., Shewan, A.M., Ferguson, C., Akhmanova, A., Parton, R.G., Yap, A.S., 2006. Dynamic microtubules regulate the local concentration of E-cadherin at cell–cell contacts. <i>J. Cell Sci.</i> 119, 1801–1811.</p> <p>(7) Chen, X., Kojima, S., Borisy, G.G., Green, K.J., 2003. p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin–catenin complexes to intercellular junctions. <i>J. Cell Biol.</i> 163, 547–557.</p> <p>(8) Ligon, L.A., Karki, S., Tokito, M., Holzbaur, E.L., 2001. Dynein binds to beta-catenin and may tether microtubules at adherens junctions. <i>Nat. Cell Biol.</i> 3, 913–917.</p> <p>(9) Ratheesh, A., Gomez, G.A., Priya, R., Verma, S., Kovacs, E.M., Jiang, K., Brown, N.H., Akhmanova, A., Stehbens, S.J., Yap, A.S., 2012. Centralspindlin and alpha-catenin regulate Rho signalling at the epithelial zonula adherens. <i>Nat. Cell Biol.</i> 14, 818–828.</p>
<p>下一步的研究计划</p>	<p>在时间允许的情况下，对于上皮细胞，尝试不同细胞浓度，寻找合适的浓度观察细胞间连接形成的过程。对于免疫细胞，试图通过增长融合蛋白的长度增加免疫细胞和靶细胞在体外作用的概率。</p>
<p>毕业班学生的夏季考核材料需总结整个培养经历。</p>	