

研究论文

去泛素化酶nonstop调控果蝇眼睛锥细胞发育的研究

石伟杰 沈成豪 林 益 湛玉婷 叶晓蕾 冯 颖* 林鑫华*

(温州医科大学眼视光学院, 温州 325027)

摘要 去泛素化酶是一类参与蛋白质稳定性调控的酶, 广泛存在于真核生物细胞中, 主要功能是水解脱底物蛋白质上的泛素链。去泛素化酶参与多种重要的生命活动, 包括细胞周期调控、细胞信号转导、蛋白质降解、DNA修复及基因表达等, 其异常表达与多种疾病的发生密切相关。该文以果蝇为研究对象, 探讨去泛素化酶nonstop(not)对果蝇眼睛锥细胞发育分化的调控作用。结果表明, 在not功能缺失的果蝇三龄幼虫眼睛成虫盘中, Cut蛋白质水平发生了显著下调; 同时, 在果蝇蛹期眼睛的分析结果显示, not功能缺失可导致锥细胞和初级色素细胞的分化异常。进一步研究发现, not功能缺失还可导致R1/R6光感受器细胞分化异常及转录因子D-Pax2表达水平异常。然而, not功能缺失并不影响转录因子Lozenge(Lz)的蛋白质水平及EGFR(epidermal growth factor receptor)和Notch信号通路的活性。综上所述, 该文结果表明, not可能通过调控D-Pax2的表达水平与R1/R6光感受器细胞的分化影响锥细胞和初级色素细胞的分化。

关键词 去泛素化酶; nonstop; 锥细胞; 果蝇眼睛发育

Deubiquitinating Enzyme nonstop Regulates Cone Cells Development in *Drosophila* Eye

Shi Weijie, Shen Chenghao, Lin Yi, Chen Yuting, Ye Xiaolei, Feng Ying*, Lin Xinhua*

(School of Optometry, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China)

Abstract Deubiquitinating enzymes (DUBs) are kinds of protein involved in the regulation of protein stability in eukaryotic cells, and play important roles in cell processes including the regulation of cell cycle, cell signal transduction, protein degradation, DNA repair and gene expression. The function of DUBs is to cleave ubiquitin (Ub) from Ub-conjugated protein substrates, and dysfunction of DUBs causes many diseases. In the current study, we used *Drosophila* as a model to explore the function of deubiquitinating enzyme nonstop (not) in cone cells development. Our results showed that the protein level of Cut was reduced in not mutant cells in eye imaginal disc. In the pupal eye, knockout not affected the differentiation of cone cells and primary pigment cells. The further study showed that the expression level of D-Pax2 was changed and the differentiation of R1/R6 photoreceptor was abnormal in not mutant cells. However, the protein level of Lozenge (Lz) and the activity of epidermal growth factor receptor (EGFR) and Notch signaling were not affected in not mutant cells.

收稿日期: 2016-06-04 接受日期: 2016-07-29

温州医科大学人才启动项目(批准号: QTJ08012)和温州医科大学附属眼视光医院人才启动项目(批准号: KYQD141103)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0577-88067914, E-mail: yingf1229@aliyun.com; Tel: 0577-88067914, E-mail: Xinhua.Lin@ioz.ac.cn

Received: June 4, 2016 Accepted: July 29, 2016

This work was supported by the Research Foundation for Advanced Talents of Wenzhou Medical University (Grant No.QTJ08012) and Research Foundation for Talents of Wenzhou Medical University of Ophthalmology and Optometry and Eye Hospital (Grant No.KYQD141103)

*Corresponding authors. Tel: +86-577-88067814, E-mail: yingf1229@aliyun.com; Tel: +86-577-88067914, E-mail: Xinhua.Lin@ioz.ac.cn

网络出版时间: 2016-08-29 16:30:04

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160829.1630.002.html>

Taken together, our result indicated that *not* may affect the differentiation of cone cells and primary pigment cells by regulating the expression level of D-Pax2 and the differentiation of R1/R6 photoreceptor.

Keywords deubiquitinating enzyme; nonstop; cone cells; *Drosophila* eye development

去泛素化酶(deubiquitinating enzymes, DUBs)是一类参与蛋白质稳定性调控的酶,广泛存在于真核生物细胞中,主要功能是将底物蛋白质上的泛素链水解,使其重新进入细胞内蛋白质循环。去泛素化酶参与多种重要生命活动,包括细胞周期调控、细胞信号转导、蛋白质降解、DNA修复及基因表达等,其异常表达可导致包括肿瘤及神经退行性疾病在内的多种疾病^[1]。果蝇nonstop(not)蛋白质在N-端含有一个锌指结构的UBP(ubiquitin specific protease domain)结构域,在C-端含有一个C19D肽酶结构域,是一种泛素特异性修饰酶,属于去泛素化酶家族的一员,与人源泛素特异性修饰酶USP22高度同源^[2-3]。据文献报道,人源USP22是hSAGA(human Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase)染色质修饰复合物的亚单位之一,参与组蛋白H2A、H2B的去泛素化^[4-5]。研究表明,人源USP22的异常表达与直肠癌^[6-8]、肝癌^[9-10]、胃癌^[11]、非小细胞肺癌^[12-13]以及乳腺癌^[14]等癌症的发生密切相关。在果蝇中,not蛋白质属于SAGA染色质修饰复合物的亚单位之一。据文献报道,not与Invadolysin相互作用调控果蝇染色体结构^[2]。在果蝇眼睛光感受器神经细胞发育过程中,not基因因为神经胶质细胞发育所必需,not基因突变可影响R1~R6光感受器神经细胞在果蝇大脑叶片层的正确投射^[3]。此外,在果蝇蛹期翅膀刚毛发育过程中,not基因突变能引起刚毛细胞(bristles)发育延迟或者刚毛细胞数量减少^[15]。

果蝇眼睛是由750~800个小眼单位整齐排列组成的复眼结构,其发育起始于三龄幼虫的成虫盘,经历2次有丝分裂和多种细胞的分化,直到蛹期的中后期形成成熟的眼睛^[16]。果蝇成蝇的每个小眼单位含有8个光感受器细胞(R1~R8)、4个锥细胞(cone cells)、2个初级色素细胞(primary pigment cells)、6个二级色素细胞(secondary pigment cells)、3个三级色素细胞(tertiary pigment cells)和3个刚毛细胞。果蝇眼睛锥细胞相当于人眼视网膜米勒细胞(Muller glial cell),属于无神经细胞小眼细胞,位于光感受器细胞之上,可分泌包裹单眼的“角膜状晶状”物质。锥细胞的分化起始于三龄幼虫晚期,至蛹前中期形

成一个由前部(anterior)、后部(posterior)和2个极细胞(equatorial polar)共4个细胞组成的锥细胞结构^[17]。锥细胞由R1/R6/R7光感受器前体细胞及锥细胞前体细胞组成的R7等值细胞团(R7 equivalence group cells)分化发育而来^[18-19],受多种转录因子及信号通路的调控。据文献报道,在锥细胞的分化过程中,EGFR(epidermal growth factor receptor)和Notch信号通路发挥了重要的调控作用^[20-21]。此外,D-Pax2、Lozenge(Lz)及Prospero(Pros)等转录因子也参与了锥细胞的分化过程^[17,22-25]。

本文以果蝇为模型,探讨去泛素化酶not在果蝇眼睛锥细胞发育分化过程的作用。该研究首次揭示了not可能通过调控D-Pax2及R1/R6光感受器细胞的分化参与锥细胞发育分化的过程,为进一步研究not基因的功能及锥细胞发育的调控过程提供了一定的依据。

1 材料与方法

1.1 果蝇品系

$y^1w^{67c23};P\{wHy\}not^{DG24306}/TM3,Sb^1Ser^1,yw,hsflp;FRT2AM(3)65F-GFP/TM6B,yw,hsflp122Tub-Gal4UAS-GFP;Tub-Gal80FRT2A/TM6B,E(spl)m8-lacZ$ 购自美国印第安纳大学Bloomington果蝇中心;not基因突变果蝇FRT2A nonstop-d/TM6B由P因子(P-element)介导的敲除技术获得;UAS-V5-nonstop通过果蝇胚胎显微注射获得。

1.2 设备仪器

PBS溶液、0.1% PBST溶液(PBS+0.1% Triton X-100)按《精编分子生物学实验指南》配制;Triton X-100购自美国Amersco公司;普通马血清(normal horse serum, NHS)、37%甲醛购自美国Sigma公司。所用仪器包括:激光共聚焦扫描显微镜(Carl Zeiss公司)、25 °C培养箱(宁波江南仪器厂)、水浴锅(江苏荣华仪器制造有限公司)和RT-qPCR仪(Applied Biosystems公司)。

1.3 突变体果蝇及转基因果蝇的获得

为了获得not基因的突变体果蝇,我们采用P因子敲除的方法对not基因进行敲除。我们实验中采用的P因子为 $y^1w^{67c23};P\{wHy\}not^{DG24306}/TM3,Sb^1Ser^1,$

最后对敲除的果蝇提取基因组进行PCR鉴定, PCR鉴定所用引物如下所示, not-KO-F: 5'-GCG AAA CGG GCG AAA ACA AAA G-3'; not-KO-R: 5'-CAG TAG CCG GTG CAG CGA CAG-3'。

为了构建*not*基因过表达的转基因果蝇, 我们通过PCR方法扩增全长*not*基因序列, 构建表达*not*蛋白质的pUAST-V5-*not*质粒, 通过胚胎显微注射的方法, 获得*UAS-V5-nonstop*转基因果蝇, 扩增所用PCR引物如下所示, not-F: 5'-CGG GGT ACC ATG TCC GAG ACG GGT TGT CG-3'; not-R: 5'-TGC TCT AGA TTA CTC GTA TTC CAG CAC-3'。

1.4 果蝇三龄幼虫眼睛成虫盘及蛹期眼睛免疫荧光染色及抗体

将解剖后的组织(三龄幼虫眼睛成虫盘和蛹期眼睛)在3.7%的甲醛中固定20 min, 之后用PBST清洗。样品再经过5%的马血清封闭处理15 min后加一抗, 于4 °C孵育过夜。加二抗后, 室温孵育2 h。最后样品经过洗涤后, 制片镜检观察。

实验中所用的免疫荧光染色的一抗分别为: Mouse anti-Cut(1:100)、Mouse anti-Delta(1:50)、Mouse anti-Notch(1:100)、Mouse anti-pERK(1:30)、Mouse anti-Discs-large(1:100)、Rat anti-Spitz(1:30)均购自美国DSHB公司, Chicken anti- β -galactosidase(β -GAL, 1:1 000)购自英国Abcam公司, Mouse anti-V5购自美国Sigma公司, Mouse anti-GFP(1:100)、Rabbit anti-V5(1:50)购自美国Invitrogen公司, Rat anti-BarH1(1:100)、Rabbit anti-D-Pax2(1:30)由美国辛辛那提儿童医院医学中心发育系Tiffany Cook教授赠送。实验中所用的二抗(1:400)购自美国Invitrogen公司。

1.5 突变体克隆分析

为了分析*not*基因突变在果蝇眼睛成虫盘和蛹期眼睛中的功能, 我们采用MARCM和Minute克隆技术。MARCM克隆技术如下: 将与FRT重组好的*not*突变体果蝇*FRT2A nonstop-d/TM6B*与工具蝇*yw,hsflp122 Tub-Gal4 UAS-GFP;Tub-Gal80 FRT2A/TM6B*杂交并置于25 °C培养箱饲养, 然后在培养48 h和72 h时, 将F1代于37 °C水浴锅中热休克处理1 h, 继续在25 °C培养箱饲养到三龄幼虫或蛹期果蝇进行解剖。Minute克隆技术如下: 将与FRT重组好的*not*突变体果蝇*FRT2A nonstop-d/TM6B*与工具蝇*yw,hsfly;FRT2A M(3)65F-GFP/TM6B*杂交并置于25 °C培养箱, 分别在培养48 h和72 h时, 将F1代

于37 °C水浴锅中热休克处理1 h, 继续在25 °C培养箱饲养到三龄幼虫或蛹期果蝇进行解剖。

为了解剖蛹期眼睛, 我们挑选三龄晚期幼虫让其继续生长48 h至蛹期, 挑选正确基因型的蛹期果蝇进行解剖染色。

1.6 RT-qPCR检测

为了检测*not*突变体中*D-Pax2*的mRNA水平, 我们根据TM3,GFP[*In(3LR)TM3,y⁺rip^osepbx^{34e},GFP*]平衡染色体挑取纯合突变*not*突变体果蝇, 以*w1118*果蝇作为对照组。利用Trizol法提取总RNA, ABI公司提供的逆转录试剂盒反转录成cDNA, 使用TaKaRa公司提供的SYBR Premix Ex Taq进行RT-qPCR扩增检测。扩增所用引物如下所示, not-F1: 5'-GCT TGC GTC AAC AGA GAT GC-3', not-R1: 5'-CCC GAC ATC CGA AGT AGA TGC-3'; not-F2: 5'-CCC ACA TCA CGA GTC ACC TG-3', not-R2: 5'-GCG TAG CAG TAG AGC GTT CC-3'。以上引物用于检测*w1118*和*not*突变体中*not*的mRNA水平。D-Pax2-F1: 5'-GTC AAT TAC GTG TTA GTC ACG GT-3', D-Pax2-R1: 5'-GGC CAC TTT AGG TTT GGA CCC-3'; D-Pax2-F2: 5'-CAT GGA GGC GTT AAT CAA CTT GG-3', D-Pax2-R2: 5'-GAC GTG ATA TGT CAC ATG GGC-3'。以上引物用于检测*w1118*和*not*突变体果蝇中*D-Pax2*基因的mRNA水平。

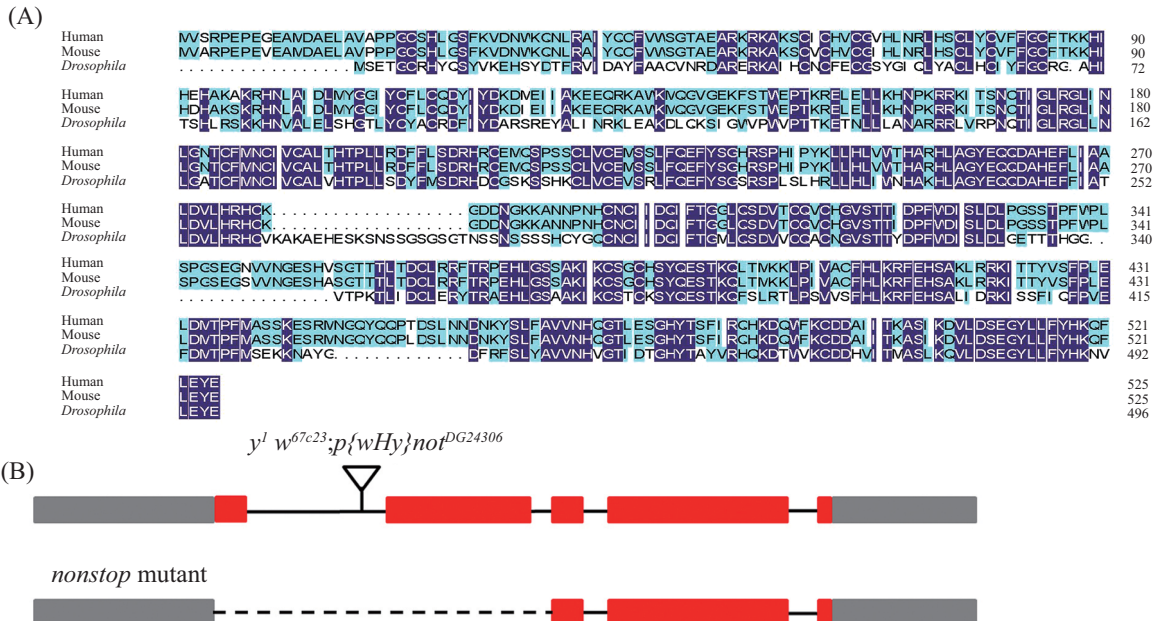
2 结果

2.1 *not*突变体果蝇的获得

*nonstop(not)*基因位于果蝇3号染色体左臂, 编码含496个氨基酸的蛋白质, 该蛋白质含有一个UBP结构域及一个C19D肽酶结构域, 属于去泛素化酶家族的一员^[2]。通过与人和小鼠同源比对发现, 果蝇*not*蛋白质与人和小鼠的USP22高度相似, 存在51%的同源性(图1A)。为了研究*not*在果蝇发育中的作用, 我们通过P因子敲除的方法得到*not*基因的突变体果蝇, 该突变体果蝇共敲除了2 203 bp的碱基序列(图1B虚线表示), 突变体果蝇纯合致死(图1B)。

2.2 *not*基因突变对果蝇眼睛锥细胞及初级色素细胞分化的影响

为了研究*not*基因在果蝇眼睛发育过程中作用, 我们利用Minute克隆技术在果蝇眼睛成虫盘构建*not*基因突变体克隆。结果显示, 在三龄幼虫眼睛成虫盘敲除*not*基因可导致转录因子Cut蛋白质水平下



A: not蛋白质同源性比对, 果蝇not与人和小鼠USP22高度同源; B: P因子敲除方法获得not突变体果蝇的示意图。

A: *Drosophila* not protein was highly conserved with human and mouse USP22; B: schematic diagram of the not mutant by P element-mediated knockout technique.

图1 not蛋白质同源性比对及not突变的建立
Fig.1 Homology of not protein and generation of not mutant

调(图2A~图2A'')。在果蝇眼睛发育过程中, Cut是锥细胞的标志蛋白质, 在其细胞核表达代表锥细胞分化情况^[26]。三龄幼虫成虫盘中, Cut蛋白质的异常表达提示锥细胞的分化可能出现异常, 因此, 我们进一步在蛹期检测, 锥细胞的发育分化情况。Discs-large(Dlg)主要在细胞膜和细胞胶质中表达, 可以标识细胞的轮廓。因此, 我们利用Cut来标记锥细胞的位置, 利用Dlg来标记锥细胞的轮廓。结果显示, 在蛹期眼睛中, 野生型小眼单位含有4个锥细胞(图2B~图2C'', 蓝色圆圈标记), 而在not突变体中锥细胞数量由正常的4个变成3个或5个(图2B~图2C'', 白色圆圈标记)。综上所述, 可知not基因突变可导致果蝇眼睛锥细胞分化异常。

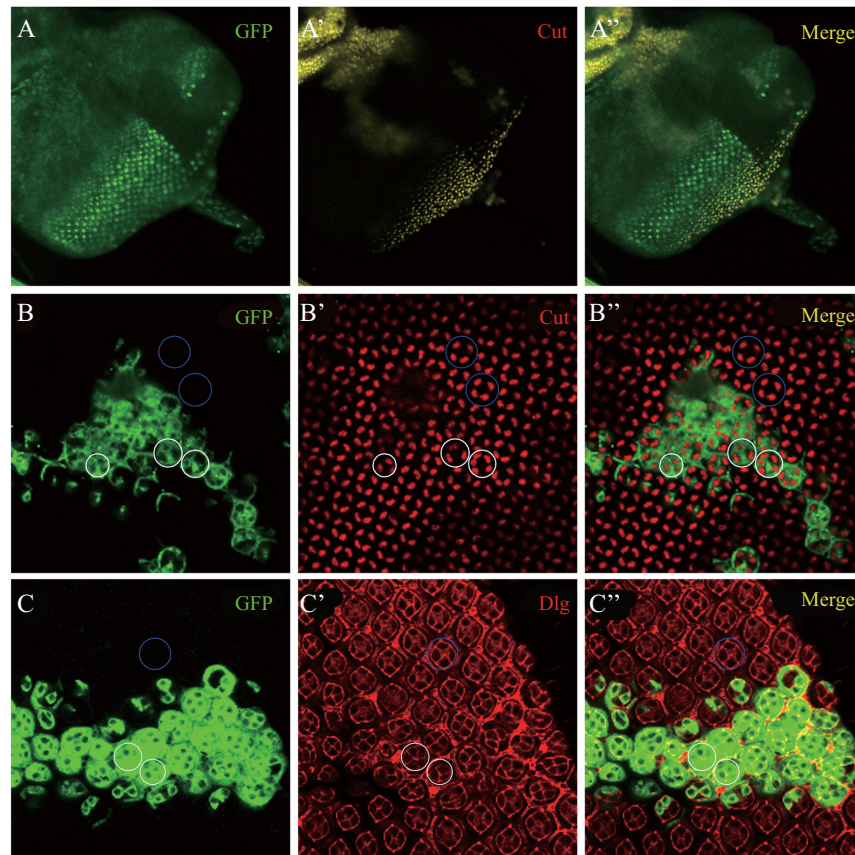
以上结果显示, not基因突变导致锥细胞分化异常, 据文献报道, 初级色素细胞分化受锥细胞的招募和调控^[27], 那么这种异常是否会影响初级色素细胞的分化。为了研究not突变体中初级色素细胞的分化情况, 我们通过MARCM克隆技术在蛹期眼睛构建not突变体克隆, 采用BarH1标记初级色素细胞。BarH1是一个转录因子, 由Bar基因编码, 该蛋白质在三龄幼虫时期标记R1/R6光感受器细胞, 在蛹期则可标记初级色素细胞^[28-29]。我们发现, 野生型锥细

胞两旁各有一个初级色素细胞包围(图3, 黄色圆圈标记), 而在not突变体细胞中, 初级色素细胞的排列出现紊乱、数量发生减少(图3, 白色圆圈标记), 说明初级色素细胞的分化出现异常。综上可知, not突变体中锥细胞异常分化导致初级色素细胞的异常分化。

为了进一步验证锥细胞分化的异常是由not基因突变所致, 我们进行了遗传挽救实验。利用MARCM克隆技术在not基因突变的细胞中过表达V5-not。研究发现, 当在突变体细胞中过表达V5-not之后, 果蝇眼睛成虫盘Cut蛋白质水平恢复正常(图4A~图4A''), 蛹期眼睛中锥细胞的数量也恢复正常(图4B~图4B'')。综上可知, Cut蛋白质水平的异常和锥细胞分化的异常由not突变所引起。上述结果说明, not基因突变可导致果蝇眼睛锥细胞的分化异常, 进而导致初级色素细胞分化异常。

2.3 not突变对果蝇光感受器细胞R1/R6分化的影响

果蝇锥细胞的分化开始于三龄幼虫晚期, 受光感受器细胞R1/R6的招募。为了探讨not突变引起锥细胞分化异常的原因, 我们在三龄幼虫时期的眼睛成虫盘检测了R1/R6光感受器细胞的分化情况。BarH1是果蝇R1/R6光感受器细胞分化必不可少的

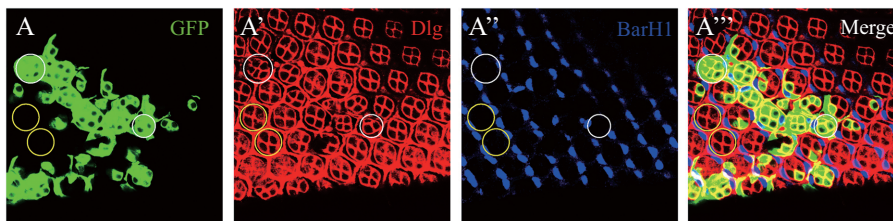


A~A'': 三龄幼虫眼睛成虫盘, *not*基因突变下调Cut蛋白质水平。A: 非GFP细胞标记*not*突变体细胞; A': *not*突变体中, Cut蛋白质水平下调。
B~C'': 果蝇蛹期眼睛, *not*基因突变导致锥细胞数量发生异常。B、C: GFP标记*not*突变体细胞; B'、C': *not*突变可导致蛹期眼睛中锥细胞数量由正常的4个变成3个或5个(Cut蛋白标记锥细胞细胞核, Dlg蛋白标记锥细胞轮廓)。

A-A'': in eye imaginal disc, *not* mutant caused reduction of Cut protein level. A: non-GFP marked *not* mutant cells; A': the protein level of Cut was reduced in *not* mutant cell. B-C'': in *Drosophila* pupal eye, the number of cone cells was changed. B,C: the GFP marked *not* mutant cells; B',C': the number of cone cells was changed in *not* mutant (Cut labeled the nuclear of cone cells, and the Dlg labeled the outline of cone cells).

图2 *not*基因突变对Cut蛋白质水平和锥细胞分化的影响

Fig.2 Effect of *not* knock-out on protein level of Cut and differentiation of cone cells



A~A''': 果蝇蛹期眼睛, *not*基因突变导致初级色素细胞分化发生异常。A: GFP标记*not*突变体细胞; A': Dlg蛋白质标记锥细胞轮廓; A'': BarH1蛋白质标记初级色素细胞, 在*not*突变体细胞中, 初级色素细胞分化发生异常。

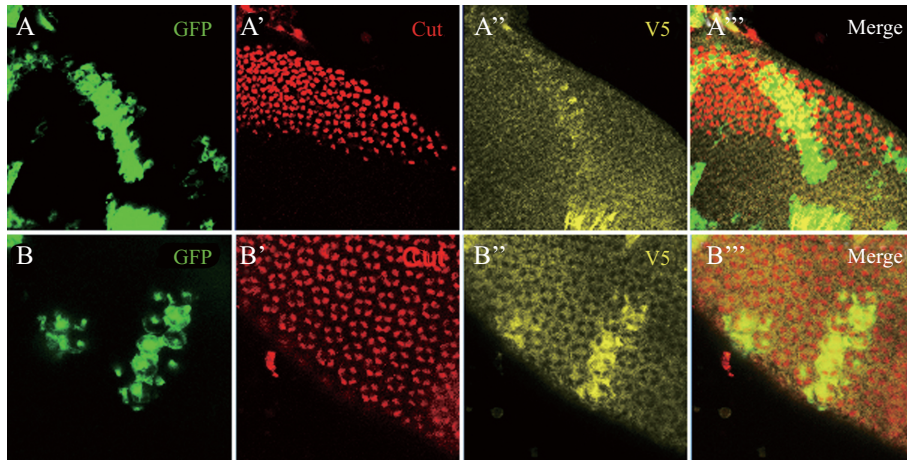
A-A''': the differentiation of primary pigment cells was abnormal in *not* mutant. A: GFP marked *not* mutant cells. A': the Dlg marked cone cells outline. A'': the BarH1 marked primary pigment cells. The differentiation of primary pigment cells was abnormal in *not* mutant.

图3 *not*基因敲除对初级色素细胞分化的影响

Fig.3 Effect of *not* knock-out on differentiation of primary pigment cells

转录因子, 在三龄幼虫时期眼成虫盘可作为R1/R6光感受器细胞的标志蛋白质^[29]。我们利用MARCM克隆技术在三龄幼虫眼睛成虫盘构建*not*基因的突变体细胞发现, 与野生型细胞相比, 突变体细胞中

BarH1的表达下调(图5), 这提示*not*突变可导致光感受器细胞R1/R6分化异常。以上结果表明, *not*突变引起的锥细胞分化异常可能由R1/R6光感受器的异常分化所致。



A~A''': 果蝇三龄幼虫眼睛成虫盘, 过表达 not 挽救Cut蛋白质水平。A: GFP标记克隆细胞; A': 在过表达 not 蛋白质的 not 突变体细胞中, Cut蛋白质水平表达恢复正常; A'': V5标记外源表达的 not 蛋白质。B~B''': 果蝇蛹期眼睛, 过表达V5- not 挽救 not 突变引起的锥细胞数量的异常; B: GFP标记蛹期眼睛中的克隆细胞; B': 过表达 not 蛋白质的 not 突变体中, 锥细胞的数量恢复正常; B'': V5标记外源表达的 not 蛋白质。

A~A''': in eye imaginal disc, overexpression of V5- not recovered the protein level of Cut. A: GFP marked the clone cells; A': overexpression of V5- not recovered the protein level of Cut in not mutant cells; A'': V5 marked the protein level of exogenous not protein. B~B''': in *Drosophila* pupal eye, overexpression of V5- not rescued abnormal number of cone cells caused by not mutant. B: GFP marked clone cells in pupal eye; B': the number of cone cells became normal when overexpression of V5- not protein in not mutant; B'': V5 marked the protein level of exogenous not protein in pupal eye.

图4 过表达 not 挽救 not 突变引起的缺陷

Fig.4 Overexpression of not rescued the defect caused by not mutant

2.4 not 突变对D-Pax2和Lozenge(Lz)的表达的影响

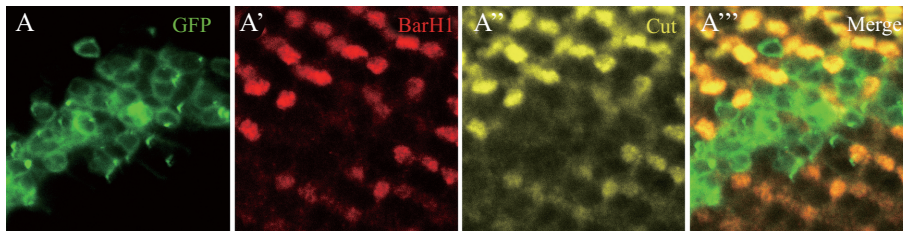
D-Pax2在果蝇胚胎发生期的神经系统、幼虫眼睛成虫盘及蛹期眼睛中的锥细胞、初级色素细胞和刚毛细胞中均有表达, 并且在锥细胞和初级色素细胞分化过程中发挥重要的调控作用^[22,30]。此外, D-Pax2还可调控锥细胞中Cut蛋白质水平^[30]。为了研究 not 突变体中Cut蛋白质水平的异常及锥细胞的分化异常是否与D-Pax2的蛋白质水平相关, 我们通过MARCM克隆技术在果蝇眼睛成虫盘中构建 not 突变体克隆, 利用免疫荧光染色技术检测D-Pax2的蛋白质水平。结果显示, 与周围野生型细胞相比, not 突变体中D-Pax2的蛋白质水平发生下调(图6A'), 说明 not 基因突变影响D-Pax2的蛋白质水平。以上结果表明, not 突变引起的锥细胞分化异常可能与D-Pax2的表达异常有关。由于 not 突变体果蝇成蝇纯合致死, 因此, 我们在其幼虫期通过TM3, GFP平衡棒筛选纯合突变体果蝇进行检测(不表达GFP的果蝇为纯合突变体)。为了确保得到的果蝇幼虫确实为纯合突变体, 同时, 为了验证 not 对D-Pax2的调控发生在mRNA水平还是蛋白质水平, 我们首先利用荧光定量PCR(RT-qPCR)技术, 通过 $not-1$ 和 $not-2$ 两对引物检测挑取果蝇中 not 基因的mRNA水平。结果

显示, 与 $w1118$ 果蝇相比, 挑取的果蝇几乎检测不到 not 的mRNA表达(图6B), 说明我们得到的果蝇确实是纯合突变体。然后, 我们利用D-Pax2-1和D-Pax2-2两对引物检测 $w1118$ 和 not 突变体果蝇中D-Pax2的mRNA水平结果如图6B所示, 在 not 突变体果蝇中, D-Pax2的mRNA水平发生上调。以上结果表明, not 同时在mRNA水平和蛋白质水平调控D-Pax2的表达, 并且 not 在D-Pax2蛋白质稳定性方面发挥着极其重要的作用。

Lozenge(Lz)是一个核蛋白, 属于Runx转录因子蛋白质家族一员^[31]。Lz在果蝇眼睛光感受器细胞R1/R6/R7、锥细胞及初级色素细胞中均有表达, 在这些细胞的分化过程中发挥重要的作用^[23]。此外, 研究报告, 在锥细胞中Lz直接调控D-Pax2蛋白的表达^[32]。为了验证 not 突变体中锥细胞的异常分化及D-Pax2的表达失调是否与Lz相关, 我们在果蝇眼睛中检测Lz蛋白质水平的情况。我们利用MARCM克隆技术在眼睛成虫盘构建 not 突变体克隆发现, not 突变体中Lz蛋白质水平没有受影响(图7)。综上所述可知, not 突变可影响D-Pax2的表达, 但不影响Lz蛋白质水平。

2.5 not 突变对Notch信号通路和EGFR信号通路的活性的影响

我们之前的实验结果显示, 在 not 突变细胞中

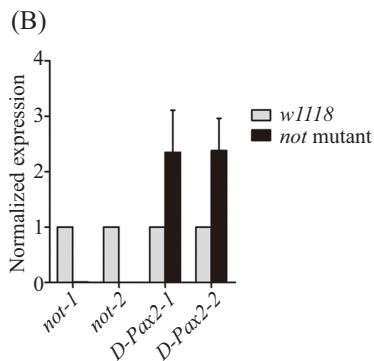
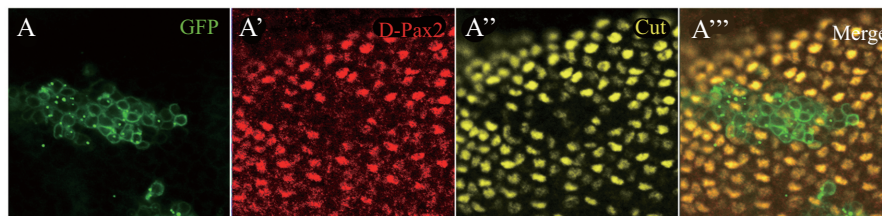


A~A''': 三龄幼虫眼睛成虫盘, *not*突变导致R1/R6光感受器细胞分化异常。A: GFP标记*not*突变体细胞; A': BarH1标记R1/R6光感受器细胞。*not*突变体细胞中, BarH1蛋白质水平明显下调; A'': *not*突变体细胞中, Cut蛋白质水平下调。

A~A''': in the eye imaginal disc, the differentiation of R1/R6 photoreceptor was abnormal in *not* mutant. A: GFP marked *not* mutant cells; A': BarH1 marked R1/R6 photoreceptor in eye imaginal disc. The protein level of BarH1 was significantly reduced in *not* mutant; A'': the protein level of Cut was reduced in *not* mutant.

图5 *not*突变导致R1/R6光感受器细胞分化异常

Fig.5 The differentiation of R1/R6 photoreceptor was abnormal in *not* mutant

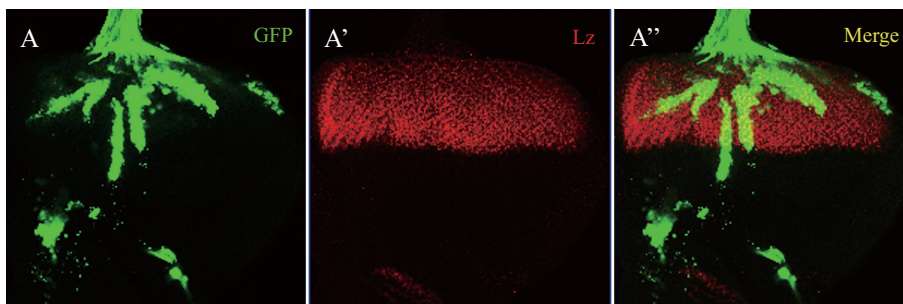


A~A''': 三龄幼虫眼睛成虫盘, *not*突变下调D-Pax2的蛋白质水平。A: GFP标记*not*突变体细胞; A': 在*not*突变细胞中, D-Pax2的蛋白质水平发生显著的降低; A'': 在*not*突变细胞中, Cut蛋白质水平下调。B: RT-qPCR检测*w1118*和*not*突变体中*not*与D-Pax2的mRNA水平(not-1和not-2分别检测*w1118*和*not*突变体中*not*基因的mRNA水平, D-Pax2-1和D-Pax2-2分别检测*w1118*和*not*突变体中D-Pax2基因的mRNA水平)。

A~A''': in eye imaginal disc, the protein level of D-Pax2 was reduced in *not* mutant. A: GFP marked *not* mutant cells; A': the protein level of D-Pax2 was significantly reduced in *not* mutant; A'': the protein level of Cut was reduced in *not* mutant. B: RT-qPCR to examine the mRNA level of *not* and D-Pax2 in *w1118* and *not* mutant, respectively. The primers of not-1 and not-2 examined the mRNA level of *not* in *w1118* and *not* mutant. The primers of D-Pax2-1 and D-Pax2-2 examined the mRNA level of D-Pax2 in *w1118* and *not* mutant.

图6 *not*调控D-Pax2的表达

Fig.6 *not* regulated the expression of D-Pax2

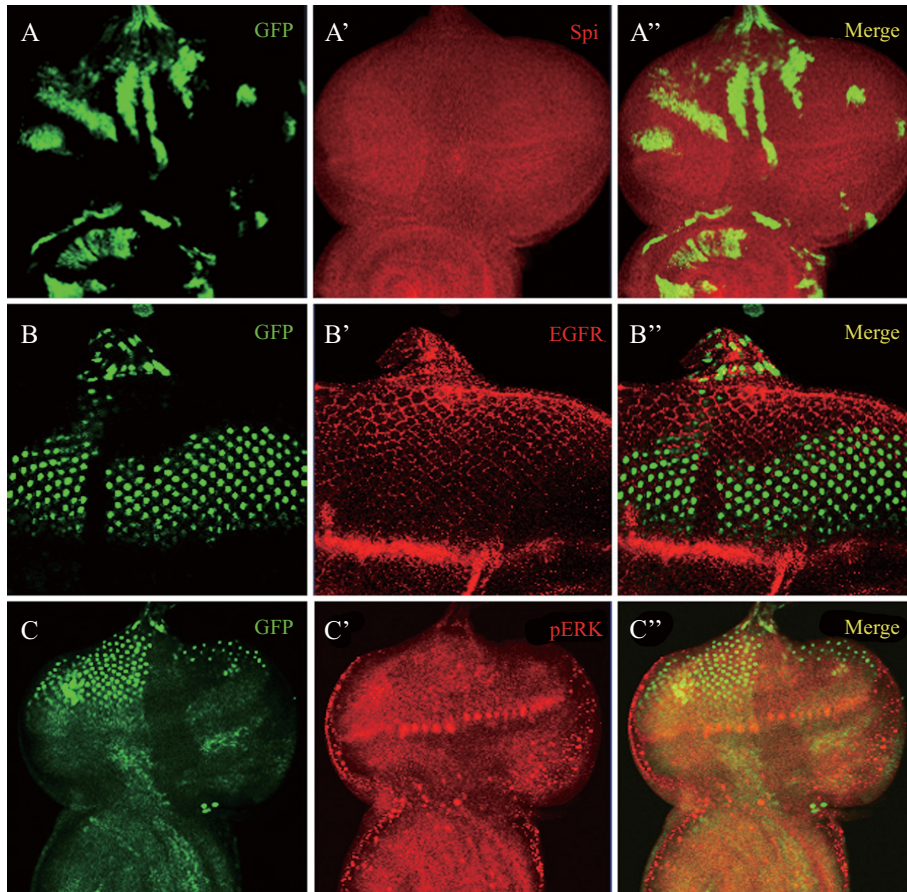


A~A'': 三龄幼虫眼睛成虫盘, *not*突变不影响Lz蛋白质水平。A: GFP标记*not*突变体细胞; A': *not*突变体中, Lz蛋白质水平没有受到影响。

A~A'': in eye imaginal disc, the protein level of Lz was not affected in *not* mutant. A: GFP marked the *not* mutant cell; A': the protein level of Lz was not affected in *not* mutant.

图7 *not*突变不影响Lz的蛋白质水平

Fig.7 The protein level of Lz was not affected in *not* mutant



A~C'': 三龄幼虫眼睛成虫盘, *not*突变不影响EGFR信号通路的活性。A~A'': *not*突变体中, EGFR信号通路配体Spi的蛋白质水平不受影响。A: GFP标记*not*突变体细胞; A': *not*突变体中, Spi的蛋白质水平不受影响。B~B'': *not*突变体中, EGFR信号通路的受体EGFR的蛋白质水平不受影响; B: 非GFP标记*not*突变体细胞; B': *not*突变体中, EGFR的蛋白质水平没有受影响。C~C'': *not*突变体中, EGFR信号通路的下游因子pERK的蛋白质水平不受影响。C: 非GFP标记*not*突变体细胞; C': *not*突变体中, pERK的蛋白质水平没有受影响。

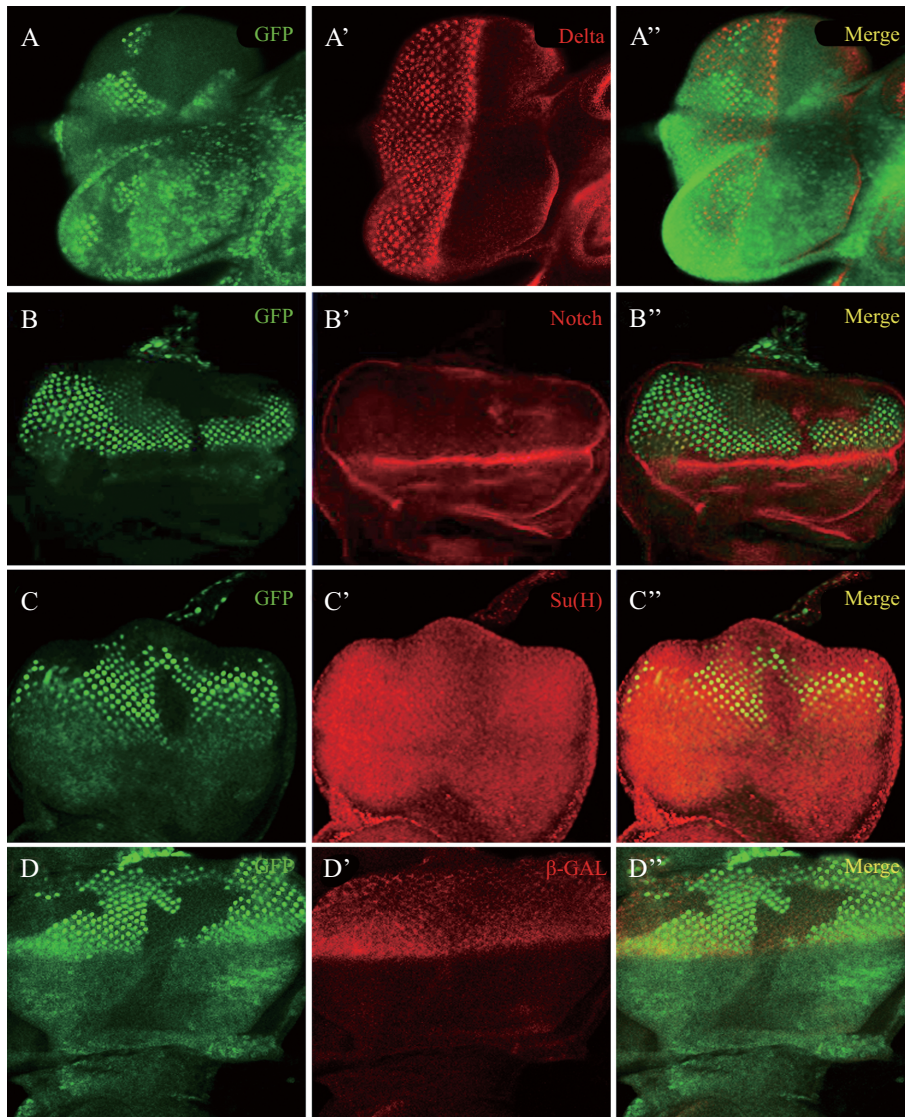
A-C'': in eye imaginal disc, the activity of EGFR signaling was not affected in *not* mutant. A-A'': the protein level of Spi, the ligand of EGFR signaling, was not affected in *not* mutant. A: GFP marked *not* mutant cells; A': the protein level of Spi was not affected in *not* mutant. B-B'': the protein level of EGFR, the receptor of EGFR signaling, was not affected in *not* mutant. B: the non-GFP marked *not* mutant cells; B': the protein level of EGFR was not affected in *not* mutant. C-C'': the protein level of pERK was not affected in *not* mutant cells. C: the non-GFP marked *not* mutant cells; C': the protein level of pERK was not affected in *not* mutant cells.

图8 *not*突变不影响EGFR信号通路的活性

Fig.8 The activity of EGFR signaling was not affected in *not* mutant

D-Pax2的表达发生异常。据文献报道, D-Pax2表达受EGFR及Notch信号通路的调控^[33-34], 而且EGFR和Notch信号通路在果蝇眼睛发育过程中发挥重要的作用, 包括锥细胞的分化^[35]。为了研究*not*突变引起的锥细胞分化异常及D-Pax2表达的失调是否受EGFR或Notch信号通路的调控, 我们通过免疫荧光染色技术检测*not*突变中这两条信号通路的表达情况。我们利用Minute克隆技术和MARCM克隆技术在三龄幼虫眼睛成虫盘构建*not*突变体克隆。为了检测EGFR信号通路是否发生异常, 我们通过免疫荧光染色技术检测了该信号通路中配体Spitz(Spi)、受体EGFR及下游因子磷酸化ERK(extracellular regulated

protein kinases)即pERK的表达情况, 结果显示, 在*not*突变细胞中, 以上蛋白质水平均未发生变化(图8A~图8C'')。由此可知, *not*突变不影响EGFR信号通路的活性。接着我们进一步检测了Notch信号通路的活性。我们通过免疫荧光染色技术检测Notch信号通路的配体Delta、受体Notch、转录因子Su(H)(suppressor of hairless)和下游靶基因E(spl)m8的表达情况, 结果表明, *not*突变细胞中以上蛋白质的水平均未受影响(图9A~图9D''), 说明*not*突变不影响Notch信号通路的活性。综上所述, 在*not*突变细胞中EGFR信号通路和Notch信号通路的活性均未受影响, 说明*not*突变细胞中锥细胞的异常分化及D-Pax2



A~D'': 三龄幼虫眼睛成虫盘, *not*突变不影响Notch信号通路的活性。A~A'': *not*突变体中, Notch信号通路配体Delta的蛋白质水平不受影响。A: 非GFP标记*not*突变体细胞; A': *not*突变体中, Delta的蛋白质水平不受影响。B~B'': *not*突变体中, Notch信号通路的受体Notch的蛋白质水平不受影响; B: 非GFP标记*not*突变体细胞; B': *not*突变体中, Notch的的蛋白质水平没有受影响。C~C'': *not*突变体中, Notch信号通路的下游转录因子Su(H)的蛋白质水平不受影响。C: 非GFP标记*not*突变体细胞; C': *not*突变体中, Su(H)的蛋白质水平不受影响。D~D'': *not*突变体中, Notch信号通路的下游靶基因E(spl)m8(由 β -GAL标记的)mRNA水平不受影响。D: 非GFP标记*not*突变体细胞; D': *not*突变体中, E(spl)m8的mRNA水平不受影响。

A~D'': in eye imaginal disc, the activity of Notch signaling was not affected in *not* mutant. A~A'': the protein level of Delta, the ligand of Notch signaling, was not changed in *not* mutant. A: non-GFP marked *not* mutant cells; A': the protein level of Delta was not changed in *not* mutant. B~B'': the protein level of Notch, the receptor of Notch signaling, was not changed in *not* mutant. B: the non-GFP marked *not* mutant; B': the protein level of Notch was not changed in *not* mutant. C~C'': the protein level of Su(H), the transcription factor of Notch signaling, was not changed in *not* mutant. C: the non-GFP marked *not* mutant cells; C': the protein level of Su(H) is not changed in *not* mutant. D~D'': the mRNA level of E(spl)m8, the target gene of Notch signaling, was not changed in *not* mutant. D: the non-GFP marked *not* mutant cells; D': The mRNA level of E(spl)m8 was not changed in *not* mutant cells.

图9 *not*突变不影响Notch信号通路的活性

Fig.9 The activity of Notch signaling was not affected in *not* mutant

的异常表达均不受EGFR和Notch信号通路的调控。

3 讨论

果蝇*not*蛋白质在进化中高度保守, 与人

USP22高度同源, 属于去泛素化酶家族的一员。本文以果蝇作为模式生物, 探讨*not*基因在果蝇眼睛发育过程中的作用。结果表明, 在果蝇三龄幼虫眼睛成虫盘敲除*not*基因可导致Cut蛋白质水平下

调。在果蝇眼睛中, Cut是锥细胞的标志蛋白质^[26], 进一步在蛹期眼睛中分析发现, *not*突变可导致锥细胞数量发生异常, 由正常的4个锥细胞变成5个或3个, 表明*not*突变影响锥细胞的正常分化。锥细胞是果蝇眼睛结构中覆盖于光感受器细胞上的一层细胞, 由包括R1/R6/R7及锥细胞的前体细胞组成的R7等值细胞团分化而来。在R7等值细胞团中, R7的分化受R1/R6光感受器细胞招募, R1、R6两个细胞中的一个细胞接受R8光感受器细胞分泌的蛋白质Boss(bridg of sevenless), 激活Sevenless信号通路, 分化为R7, 而不接受Boss蛋白质的细胞则分化为锥细胞, 因此我们检测了R1/R6光感受器的分化情况。结果显示, 在*not*突变体中, R1/R6光感受器的分化出现异常。这提示我们*not*突变体中, 锥细胞分化的异常可能与R1/R6光感受器的异常分化相关, 并且之前也有研究报道*not*突变会影响R1/R6光感受器神经细胞在果蝇大脑叶片层的正确投射^[3]。在蛹期, 锥细胞进一步招募初级色素细胞的分化^[27], 我们的实验结果显示, 在*not*突变体中, 初级色素细胞的分化也出现了异常, 说明锥细胞的异常分化影响了初级色素细胞的正常分化。

锥细胞的分化受Notch、EGFR信号通路^[20-21]及D-Pax2、Lz、Pros^[22-24]等转录因子的调控。本研究发现, *not*突变体中D-Pax2的表达发生了异常。据文献报道, 在果蝇眼睛发育中, D-Pax2位于Cut的上游并且参与Cut蛋白质水平的调控^[30], 说明*not*突变体中Cut蛋白质水平的异常及锥细胞分化的异常有可能由D-Pax2的异常表达所致。D-Pax2在果蝇中表达受EGFR信号通路及Notch信号通路的调控^[33-34], 同时, 转录因子Lz也参与D-Pax2的调控^[32]。然而, 我们的研究结果显示, 在*not*突变体中, Lz的蛋白质水平没有发生变化, 信号通路EGFR和Notch的活性并未受到影响, 说明在*not*突变体中, D-Pax2的异常表达并不受转录因子Lz及EGFR、Notch信号通路的调控。我们通过RT-qPCR进一步检测*not*突变体中D-Pax2的mRNA水平, 结果显示, D-Pax2的mRNA水平发生上调, 说明*not*同时在mRNA水平和蛋白质水平影响D-Pax2的表达, 并且在mRNA水平的调控与在蛋白质水平的调控呈现两个相反的方向: 在mRNA水平上调其表达, 在蛋白质水平则下调其表达, 提示我们*not*对D-Pax2蛋白质的稳定发挥极其重要的作用。然而, 其具体机制本文尚未揭示, 需要更深入的研究。

究。

综上所述, 本研究发现, 果蝇去泛素化酶*not*通过调控D-Pax2基因的表达及R1/R6光感受器细胞分化影响锥细胞及初级色素细胞的分化。而对于*not*如何调控D-Pax2基因表达及光感受器细胞R1/R6分化的具体机制还有待进一步深入研究。

参考文献 (References)

- 1 Amerik AY, Hochstrasser M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1695(1/2/3): 189-207.
- 2 Rao SG, Janiszewski MM, Duca E, Nelson B, Abhinav K, Panagakou I, *et al.* Invadolisyn acts genetically via the SAGA complex to modulate chromosome structure. *Nucleic Acids Res* 2015; 43(7): 3546-62.
- 3 Poeck B, Fischer S, Gunning D, Zipursky SL, Salecker I. Glial cells mediate target layer selection of retinal axons in the developing visual system of *Drosophila*. *Neuron* 2001; 29(1): 99-113.
- 4 Hu M, Li P, Li M, Li W, Yao T, Wu JW, *et al.* Crystal structure of a UBP-family deubiquitinating enzyme in isolation and in complex with ubiquitin aldehyde. *Cell* 2002; 111(7): 1041-54.
- 5 Zhang XY, Pfeiffer HK, Thorne AW, McMahon SB. USP22, an hSAGA subunit and potential cancer stem cell marker, reverses the polycomb-catalyzed ubiquitylation of histone H2A. *Cell Cycle* 2008; 7(11): 1522-4.
- 6 Liu Y, Yang Y, Xu H, Dong X. Implication of USP22 in the regulation of BMI-1, c-Myc, p16INK4a, p14ARF, and cyclin D2 expression in primary colorectal carcinomas. *Diagn Mol Pathol* 2010; 19(4): 194-200.
- 7 Liu YL, Yang YM, Xu H, Dong XS. Aberrant expression of USP22 is associated with liver metastasis and poor prognosis of colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2011; 103(3): 283-9.
- 8 Ao N, Liu Y, Bian X, Feng H, Liu Y. Ubiquitin-specific peptidase 22 inhibits colon cancer cell invasion by suppressing the signal transducer and activator of transcription 3/matrix metalloproteinase 9 pathway. *Mol Med Rep* 2015; 12(2): 2107-13.
- 9 Tang B, Tang F, Li B, Yuan S, Xu Q, Tomlinson S, *et al.* High USP22 expression indicates poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2015; 6(14): 12654-67.
- 10 Tang B, Liang X, Tang F, Zhang J, Zeng S, Jin S, *et al.* Expression of USP22 and Survivin is an indicator of malignant behavior in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2015; 47(6): 2208-16.
- 11 Yang DD, Cui BB, Sun LY, Zheng HQ, Huang Q, Tong JX, *et al.* The co-expression of USP22 and BMI-1 may promote cancer progression and predict therapy failure in gastric carcinoma. *Cell Biochem Biophys* 2011; 61(3): 703-10.
- 12 Xiao H, Tian Y, Yang Y, Hu F, Xie X, Mei J, *et al.* USP22 acts as an oncogene by regulating the stability of cyclooxygenase-2 in non-small cell lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 460(3): 703-8.
- 13 Hu J, Liu YL, Piao SL, Yang DD, Yang YM, Cai L. Expression

- patterns of USP22 and potential targets BMI-1, PTEN, p-AKT in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2012; 77(3): 593-9.
- 14 Zhang Y, Yao L, Zhang X, Ji H, Wang L, Sun S, *et al.* Elevated expression of USP22 in correlation with poor prognosis in patients with invasive breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011; 137(8): 1245-53.
- 15 Ren N, Zhu C, Lee H, Adler PN. Gene expression during *Drosophila* wing morphogenesis and differentiation. *Genetics* 2005; 171(2): 625-38.
- 16 Treisman JE. Retinal differentiation in *Drosophila*. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental Biol* 2013; 2(4): 545-57.
- 17 Charlton-Perkins M, Whitaker SL, Fei Y, Xie B, Li-Kroeger D, Gebelein B, *et al.* Prospero and Pax2 combinatorially control neural cell fate decisions by modulating Ras- and Notch-dependent signaling. *Neural Dev* 2011; 6: 20
- 18 Chang HC, Solomon NM, Wassarman DA, Karim FD, Therrien M, Rubin GM, *et al.* phyllopod functions in the fate determination of a subset of photoreceptors in *Drosophila*. *Cell* 1995; 80(3): 463-72.
- 19 Greenwald I, Rubin GM. Making a difference: the role of cell-cell interactions in establishing separate identities for equivalent cells. *Cell* 1992; 68(2): 271-81.
- 20 Freeman M. Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the *Drosophila* eye. *Cell* 1996; 87(4): 651-60.
- 21 Nagaraj R, Canon J, Banerjee U. Cell fate specification in the *Drosophila* eye. *Results Probl Cell Differ* 2002; 37: 73-88.
- 22 Fu W, Noll M. The Pax2 homolog sparkling is required for development of cone and pigment cells in the *Drosophila* eye. *Genes Dev* 1997; 11(16): 2066-78.
- 23 Flores GV, Daga A, Kalhor HR, Banerjee U. Lozenge is expressed in pluripotent precursor cells and patterns multiple cell types in the *Drosophila* eye through the control of cell-specific transcription factors. *Development* 1998; 125(18): 3681-7.
- 24 Kauffmann RC, Li S, Gallagher PA, Zhang J, Carthew RW. Ras1 signaling and transcriptional competence in the R7 cell of *Drosophila*. *Genes Dev* 1996; 10(17): 2167-78.
- 25 Shi Y, Noll M. Determination of cell fates in the R7 equivalence group of the *Drosophila* eye by the concerted regulation of D-Pax2 and TTK88. *Dev Biol* 2009; 331(1): 68-77.
- 26 Blochlinger K, Jan LY, Jan YN. Postembryonic patterns of expression of cut, a locus regulating sensory organ identity in *Drosophila*. *Development* 1993; 117(2): 441-50.
- 27 Cagan RL, Ready DF. The emergence of order in the *Drosophila* pupal retina. *Dev Biol* 1989; 136(2): 346-62.
- 28 Hayashi T, Kojima T, Saigo K. Specification of primary pigment cell and outer photoreceptor fates by BarH1 homeobox gene in the developing *Drosophila* eye. *Dev Biol* 1998; 200(2): 131-45.
- 29 Higashijima S, Kojima T, Michiue T, Ishimaru S, Emori Y, Saigo K. Dual Bar homeobox genes of *Drosophila* required in two photoreceptor cells, R1 and R6, and primary pigment cells for normal eye development. *Genes Dev* 1992; 6(1): 50-60.
- 30 Fu W, Duan H, Frei E, Noll M. shaven and sparkling are mutations in separate enhancers of the *Drosophila* Pax2 homolog. *Development* 1998; 125(15): 2943-50.
- 31 Daga A, Karlovich CA, Dumstrei K, Banerjee U. Patterning of cells in the *Drosophila* eye by Lozenge, which shares homologous domains with AML1. *Genes Dev* 1996; 10(10): 1194-205.
- 32 Flores GV, Duan H, Yan H, Nagaraj R, Fu W, Zou Y, *et al.* Combinatorial signaling in the specification of unique cell fates. *Cell* 2000; 103(1): 75-85.
- 33 Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: Cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999; 284(5415): 770-6.
- 34 Raabe T. The sevenless signaling pathway: Variations of a common theme. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1496(2/3): 151-63.
- 35 Moses K. *Drosophila* eye development. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag 2002, 21-88.