

ESYT-2 在致密核心囊泡分泌中起到的作用 *

冯婉娟 刘 贝 孟令锋 张 立 张蓉颖[△]

(华中科技大学分子生物物理教育部重点实验室 生命科学与技术学院 湖北 武汉 430074)

摘要 目的:研究秀丽隐杆线虫(简称线虫)中一种扩展的 Synaptotagmin 同源物 ESYT-2 在致密核心囊泡分泌过程中起到的作用。方法:以线虫为研究对象,运用线虫腔胞吸收 ANF-GFP 的基本原理来确定 ESYT-2 与分泌相关,之后又进一步使用全内反射荧光显微镜技术(TIRFM)来研究 ESYT-2 对致密核心囊泡的具体调控。结果:① ESYT-2 功能缺失影响线虫神经细胞致密核心囊泡分泌。② ESYT-2 影响致密核心囊泡分泌的栓系过程。结论:ESYT-2 调控了致密核心囊泡的分泌过程。

关键词 致密核心囊泡 线虫 ESYT-2 全内反射荧光显微镜

中图分类号 Q2-33 Q75 Q78 Q813 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)10-1862-03

ESYT-2 Regulates the Tethering Step of DCV Exocytosis in *C. elegans**FENG Wan-juan, LIU Bei, MENG Ling-feng, ZHANG Li, ZHANG Rong-ying[△]

(College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430074, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of ESYT-2 protein on DCV exocytosis in *C. elegans*. **Methods:** *C. elegans* was used as a model, neuropeptide release was assessed by measuring the fluorescence intensity of ANF-GFP in coelomocytes in vivo. Then the movements of single vesicles was tracked by using optical measurements (TIRFM). **Results:** ① ESYT-2 loss of function animals exhibited a defect in DCV release. ② ESYT-2 regulated the tethering step of DCV exocytosis in *C. elegans*. **Conclusion:** ESYT-2 affected DCV exocytosis in *C. elegans*.

Key words: Dense core vesicle(DCV); *C. elegans*; ESYT-2; Total Internal Reflect Fluorescence Microscopy(TIRFM)

Chinese Library Classification(CLC): Q2-33, Q75, Q78, Q813 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)10-1862-03

前言

自 20 世纪 60 年代英国科学家西德尼·布雷纳(Sydney Brenner)首次研究秀丽隐杆线虫(简称线虫)开始^[1],至今仅短短 40 多年,在细胞、分子、发育、医学等领域,都取得了非常重要的研究成果,并先后有多名科学家因为在线虫领域的研究获得了诺贝尔生理学或医学奖^[2,3]。线虫饲养方便,生长周期短,在分泌途径中大多数蛋白功能保守,基因组全序列测定已完成,并易于进行包括基因敲除、突变和转基因等的基因操作。基于其以上优势,本研究用线虫来研究细胞分泌和突触传递。

细胞的分泌是一个复杂的循环过程,它包括分泌囊泡的生物合成(biogenesis)、转运(translocation)、定向(targeting)、栓系(tethering)、锚定(docking)、启动(priming)、膜融合(fusion)等步骤^[4]。细胞分泌的囊泡被分为突触囊泡和致密核心囊泡^[5]。致密核心囊泡主要储存和分泌生物胺、神经肽和神经营养因子^[6]。在神经细胞和内分泌细胞中,致密核心囊泡释放大量神经调节因子,广泛的调节很多生理过程,如交感神经细胞调节心率和血压以及胰腺 β 细胞中致密核心囊泡释放胰岛素调节血糖。在大脑中,5-羟色胺和其他一元胺的功能障碍有可能导致神经失常。因而研究 DCVs 的分泌过程对于了解一些如高血压、糖尿

病和精神障碍疾病有很重要的作用。

ESYT-2(Extended SynapTotagmin homolog)是一种扩展的 Synaptotagmin 同源物^[7]。ESYT-2 具有三个 C₂ 结构域,是一个与细胞质膜栓系的 Ca²⁺ 结合蛋白,可能与细胞分泌相关。因而本研究首先运用线虫腔胞吸收 ANF-GFP 的原理来确定 ESYT-2 与分泌相关,之后又进一步使用全内反射荧光显微镜技术来研究 ESYT-2 对致密核心囊泡的具体调控。

1 材料与方法

1.1 线虫的培养和线虫胚胎细胞的提取

线虫以标准方法培养在 20℃^[8]。在本研究中所需要的线虫种系为:esyt-2(ok2509), KM246 *gvlIs246[Pida-1IDA-1::gfp]*^[9], EG3680 *oxIs206[Paex3ANF::GFP]*^[10]。将 esyt-2 分别与 KM246, EG3680 交配得到带有 IDA-1::GFP 标记的突变种系和 ANF::GFP 标记的突变种系。

本研究使用标准方法来提取线虫胚胎细胞^[11,12]。简而言之,首先用次氯酸盐溶液裂解线虫,使线虫表皮破裂,得到虫卵。使用 60%蔗糖溶液梯度离心,将虫卵悬浮在混合液最上层,虫体残骸沉淀于混合液最下层。收集最上层虫卵,使用几丁质酶(Sigma Chemical, St. Louis, MO)消化卵壳,得到单个细胞。用细

* 基金项目 科技部国家重大科学研究计划蛋白质专项资助项目(2007CB914202) 国家自然科学基金资助项目(31071249)

作者简介 冯婉娟(1983-),女,博士研究生,主要从事分子与细胞生物学研究;

△通讯作者 张蓉颖(1975-),女,华中科技大学生命科学与技术学院副教授,博士,主要从事膜与细胞生物物理研究,

Tel: 027-87792337 E-mail: ryzhang@mail.hust.edu.cn。

(收稿日期 2011-08-22 接受日期 2011-09-19)

胞培养基 L15(Gibco, Carlsbad, CA, USA)中止细胞消化,经由过滤器(Millipore, Bedford MA)过滤 将细胞滴于铺有花生凝集素(0.5 mg/ml, Sigma)的培养皿中。待细胞沉降完全后,加入 L15 培养基移至 20℃培养箱培养。72 小时后可以成像试验。

1.2 腔胞中 ANF-GFP 的测量

外源的神经肽 ANF-GFP 在腔胞中荧光强度的测量在之前的研究中被详细介绍过^[10]。在研究中使用共聚焦显微系统来拍摄固定了的线虫腔胞。图像使用 60× 的奥林巴斯倒置显微镜 (IX-71)拍摄。我们只拍摄并且统计那些没有被其他组织遮住的腔胞细胞。图像由 Image-J 1.43b 来进行分析。

1.3 全内反射荧光显微镜技术

全内反射荧光显微镜系统以 100× 的奥林巴斯 IX70 显微镜为基础,激光光源通过全内反射的光路系统进入显微镜^[13,14]。使用波长为 488nm 的激光作为激发光。使用 iXonEM + 885 EMCCD 对样品进行采样,采样频率为 40Hz。本实验测得的消散场穿透深度为 $d=109\text{nm}$ 。采集图像的软件为 CCD 配套软件 Andor IQ 1.91。图像处理和分析使用 Matlab 软件^[15]。作图使用 Igor Pro 软件。

1.4 统计学分析

所有的数据的误差分析均使用标准差。按照数据是否符合正态分布,数据的差异性使用 the Student's t test 或者 the Mann-Whitney rank sum test 来检测。其中 $P < 0.05$ 为 *, $P < 0.01$ 为 **, $P < 0.001$ 为 ***。所有的对比数据都是在同一天或者同一种条件下完成的。

2 结果

2.1 ESYT-2 突变种系中神经肽分泌减少

外源性的神经肽 ANF-GFP 在广谱表达的启动子 *aex-3* 的驱动下,在线虫神经系统中表达^[10,16]。外源神经肽 ANF-GFP 被包裹在致密核心囊泡中,随着神经细胞的分泌进入线虫体腔内,最后被有线虫“清洁细胞”之称的腔胞细胞所吸收。因此,在腔胞吸收没有问题的情况下,线虫腔胞内 ANF-GFP 荧光强度可以间接反映线虫神经细胞的分泌情况。我们发现,在 ESYT-2 功能缺失的突变体中,线虫腔胞内 ANF-GFP 的荧光强度明显降低(图 1B)。为了排除腔胞吸收缺陷的可能性,在线虫体腔内注射了若丹明染料 (Rhodamine-conjugated dextran, 10 kDa) 发现与野生型相比,ESYT-2 突变体中腔胞吸收若丹明的荧光强度并没有减弱(图 1C)。因此可以得出结论,ESYT-2 突变体中神经肽分泌减少。

2.2 ESYT-2 在致密核心囊泡的栓系过程中起作用

本研究运用全内反射荧光显微技术来研究囊泡的分泌过程^[17]。全内反射荧光显微镜的基本原理是,激光入射角从折射率较高的一个物质射到折射率较低的另一个物质,激光入射角等于或者大于临界角时,发生了全反射。这一过程会在两介质的临界面产生一个消散场,这个消散场大概有 100nm~200nm 并呈指数递减。这个消散场的能量可以激发进入其中的荧光蛋白发光。带有荧光标记的囊泡进入消散场(离膜 100nm 左右),我们通过 CCD 可以观察到囊泡在细胞质膜附近的运动情况。全内反射荧光显微镜是一个研究膜蛋白的好方法^[18]。

在对 *esyt-2* 的研究中,用 IDA-1::GFP 标记线虫 ALA 神经

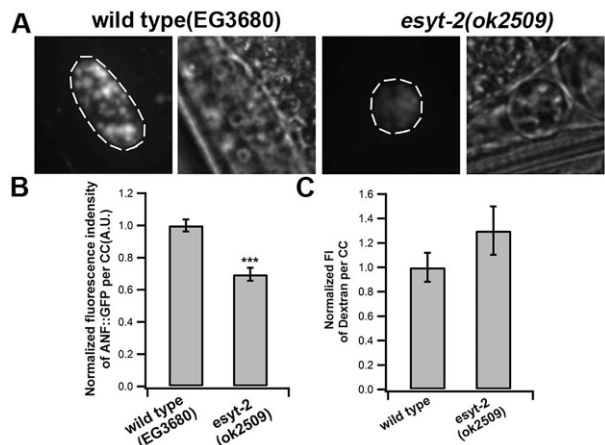


图 1 ESYT-2 是神经细胞释放外源神经肽 ANF-GFP 所需要的。(A)线虫腔胞吸收 ANF-GFP 荧光示意图和腔胞明场示意图。(B)在野生型和 *esyt-2* 突变体中,腔胞 ANF-GFP 的平均荧光强度柱状图。(C)在野生型和 *esyt-2* 突变体中,腔胞吸收的 Dextran 的平均荧光强度示意图。

Fig. 1 ESYT-2 was required for the release of ectopically expressed ANF-GFP in neurons. (a) Representative examples of ANF-GFP fluorescence and bright field images of coelomocytes in worms of the indicated strains. (b) Histograms showing the average total fluorescence intensity of ANF-GFP in coelomocytes in wild type and *esyt-2* worms. (c) Histograms showing the average total fluorescence intensity of Dextran (10KDa) in coelomocytes from wild type and *esyt-2* worms.

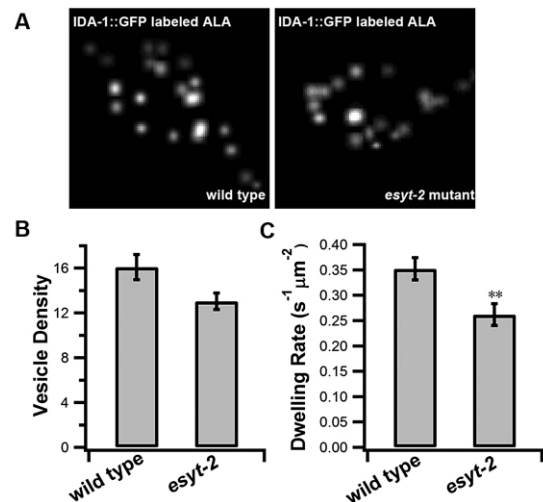


图 2 ESYT-2 调控致密核心囊泡的栓系过程。(A)在不同线虫种系中,IDA-1::GFP 标记的 ALA 神经元示意图。(B)不同线虫种系中,进入消散场的囊泡的密度。(C)不同线虫种系中,单位时间单位面积在消散场内囊泡在细胞膜附近停留的数目。

Fig. 2 ESYT-2 participated in the tethering of DCVs. (A) Representative examples of IDA-1::GFP labelled ALA neurons in worms of the indicated strains. (B) Density of total visible DCVs (per μm^2) in the evanescent field in wild type worms and *esyt-2* (*ok2509*) mutants. (C) The dwelling rate of DCVs (per second per unit area) in the evanescent field in wild type worms and *esyt-2*(*ok2509*) mutants.

元的致密核心囊泡^[19]。我们发现,与野生型相比,ESYT-2 缺失的线虫神经元中,进入消散场的囊泡密度有所减少,但减少量没有显著性差异,这说明了 ESYT-2 对致密核心囊泡转运至质

膜附近这一过程影响不是很大。然而,ESYT-2 缺失的突变体中,在膜上停留(囊泡荧光强度相对稳定,位移不超过一个像素点且持续拍摄三帧以上)的致密核心囊泡数目大大减少。这一现象说明,ESYT-2 与致密核心囊泡和细胞膜的栓系过程相关。

3 讨论

使用线虫为模型,研究 ESYT-2 蛋白在致密核心囊泡分泌过程中起到的作用。我们首先在生理条件下确定蛋白确实为致密核心囊泡所需,然后进一步使用全内反射荧光显微镜技术研究单个致密核心囊泡的运动情况,从微观角度来看 ESYT-2 对分泌的影响。我们的结论是 ESYT-2 是致密核心囊泡分泌所需的,它调控了囊泡与细胞膜的栓系过程。

ESYT-2 是一个扩展的 SYnapTotagmin 同源物,在线虫中对 *esyt-2* 的研究还比较少,只是通过生物信息学的方法进行比对得知它是 Ca^{2+} 依赖的囊泡膜结合蛋白。在哺乳动物细胞中对 E-Syt2 有一定的了解,其为钙敏感蛋白,其复合的 C_2 结构域与囊泡的上膜有关^[7],近期也有文章指出 E-Syt2 与内吞可能有关^[20]。然而,哺乳动物细胞有一系列的 E-Syts,据目前来看有 E-Syt1, E-Syt2 和 E-Syt3 三种,这三者 E-Syts 之间功能是否一致,是否有冗余作用,这些问题都需要进一步讨论。而线虫中则只发现了 *esyt-2*,所以我们认为在线虫中研究这个蛋白具有一定的优势。当然它如何接受钙信号并且和哪些蛋白相互协调调节分泌还需进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans* [J]. Genetics, 1974, 77: 71-94
- [2] Golstein P. Controlling cell death[J]. Science, 1997, 275: 1081-1082
- [3] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Mello, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature, 1998, 391: 806-811
- [4] Sudhof TC. The synaptic vesicle cycle [J]. Annu Rev Neurosci, 2004, 27: 509-547
- [5] Kasai H. Comparative biology of Ca^{2+} -dependent exocytosis: implications of kinetic diversity for secretory function [J]. Trends Neurosci, 1999, 22: 88-93
- [6] Sugita S. Mechanisms of exocytosis[J]. Acta Physiol (Oxf), 2008, 192: 185-193
- [7] Min SW, Chang WP, Sudhof TC. E-Syts, a family of membranous Ca^{2+} -sensor proteins with multiple C_2 domains [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104: 3823-3828
- [8] Stiernagle T. Maintenance of *C. elegans*, WormBook, 2006: 1-11
- [9] Cai T, Fukushige T, Notkins AL, et al. Insulinoma-Associated Protein IA-2, a Vesicle Transmembrane Protein, Genetically Interacts with UNC-31/CAPS and Affects Neurosecretion in *Caenorhabditis elegans* [J]. J Neurosci, 2004, 24: 3115-3124
- [10] Speese S, Petrie M, Schuske K, et al. UNC-31 (CAPS) is required for dense-core vesicle but not synaptic vesicle exocytosis in *Caenorhabditis elegans*[J]. J Neurosci, 2007, 27: 6150-6162
- [11] Christensen M, Estevez A, Yin X, et al. A primary culture system for functional analysis of *C. Elegans* neurons and muscle cells[J]. Neuron, 2002, 33: 503-514
- [12] Strange K, Christensen M, Morrison R. Primary culture of *Caenorhabditis elegans* developing embryo cells for electrophysiological, cell biological and molecular studies[J]. Nat Protoc, 2007, 2: 1003-1012
- [13] Bai L, Zhu D, Zhou K, et al. Differential properties of GTP- and Ca^{2+} -stimulated exocytosis from large dense core vesicles [J]. Traffic, 2006, 7: 416-428
- [14] Zhou KM, Dong YM, Ge Q, et al. PKA activation bypasses the requirement for UNC-31 in the docking of dense core vesicles from *C. elegans* neurons[J]. Neuron, 2007, 56: 657-669
- [15] Lin XG, Ming M, Chen MR, et al. UNC-31/CAPS docks and primes dense core vesicles in *C. elegans* neurons [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 397: 526-531
- [16] Iwasaki K, Staunton J, Saifee O, et al. Thomas, *aex-3* encodes a novel regulator of presynaptic activity in *C. elegans* [J]. Neuron, 1997, 18: 613-622
- [17] Burchfield JG, Lopez JA, Mele K, et al. Exocytotic vesicle behaviour assessed by total internal reflection fluorescence microscopy [J]. Traffic, 2010, 11: 429-439
- [18] Axelrod D. Chapter 7: Total internal reflection fluorescence microscopy[J]. Methods Cell Biol, 2008, 89: 169-221
- [19] Zahn TR, Macmorris MA, Dong W, et al. *Caenorhabditis elegans* homolog of the diabetic autoantigens IA-2 and phogrin, is expressed in peptidergic neurons in the worm [J]. J Comp Neurol, 2001, 429: 127-143
- [20] Jean S, Mikryukov A, Tremblay MG, et al. Extended-synaptotagmin-2 mediates FGF receptor endocytosis and ERK activation in vivo [J]. Dev Cell, 2010, 19: 426-439
- [21] Murata S, Matsuo R, Ikeda O, et al. Platelets promote liver regeneration under conditions of Kupffer cell depletion after hepatectomy in mice[J]. World J Surg, 2008, 32(6):1088-1096
- [22] 程延安,袁利超,党双锁,等.间断小剂量 DEN 诱发大鼠肝癌模型研究[J]. 肿瘤防治杂志, 2005, 12(11): 806-808
Cheng Yan-an, Yuan Li-chao, Dang Shuang-suo, et al. Research of rat hepatocarcinogenesis model induced by low doses of DEN intermittently[J]. Chin J Cancer Prev Treat, 2005, 12(11): 806-808

(上接第 1845 页)

- [19] 周侗,陈勇,尤楠,等.二乙基亚硝胺诱导大鼠肝癌模型的建立及评价[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(20): 3812-3815
Zhou Ti, Chen Yong, You Nan, et al. Establishment and evaluation of hepatocellular carcinoma model induced by diethylnitrosamine in rats [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010, 10(20): 3812-3815
- [20] Witters P, Freson K, Verslype C, et al. Review article: blood platelet number and function in chronic liver disease and cirrhosis[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2008, 27(11): 1017-1029