

果蝇新型碱性磷酸酶相关基因CG6236的 敲除及表型分析

缪海锋¹ 方可欣¹ 黄爽爽² 金龙金² 林鑫华³ 吴一卉^{3*}

(¹温州医学院眼视光学院, 温州 325027; ²温州医学院检验医学院、生命科学学院, 温州 325035;

³中国科学院动物研究所生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 碱性磷酸酶广泛存在于人体各器官中, 其水平异常与一系列疾病有关, 但其在发育中的具体作用机制尚不明确。该文以果蝇为模式生物, 研究一个新型碱性磷酸酶样蛋白基因CG6236在发育中的功能。利用P-因子介导的不精确剪切获得CG6236缺失突变体果蝇品系, 发现CG6236纯合突变体半致死, 存活的幼虫及成蝇腹部出现黑色素瘤样表型。在细胞中表达CG6236融合蛋白, 发现其定位于细胞质中。另外, 缺失或过表达CG6236均不影响Wingless和Hedgehog信号通路。综上, 该研究首次获得CG6236基因缺失突变和转基因果蝇品系, 并观察了缺失CG6236果蝇的表型, 为进一步阐明基因CG6236的功能及作用机制奠定了基础。

关键词 CG6236; 碱性磷酸酶; 基因缺失; 黑色素瘤; 果蝇

碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)是一类将核酸、蛋白、生物碱等底物去磷酸化的酶, 即通过水解磷酸单酯将底物分子上的磷酸基团除去, 并生成磷酸根离子和自由的羟基。它广泛存在于人体各脏器官中, 目前, 发现有四种同功异构酶^[1], 分为组织特异性和非特异性两种类型, 前者存在于肠、胎盘、生殖细胞中, 后者主要存在于肝脏、骨髓及肾脏中^[2]。碱性磷酸酶在发育中具有重要的生物学作用, 并且其水平异常与一系列的疾病有关, 如炎症^[3-4]、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)^[5]、帕哲病(Paget's disease, PD)^[6]等。

碱性磷酸酶是碱性磷酸酶超家族(alkaline phosphatase superfamily)的主要成员。碱性磷酸酶超家族还包括碱性磷酸酶样蛋白家族(alkaline phosphatase-like family), 具体分为芳基硫酸酯酶家族(arylsulfatase)、N-乙酰基半乳糖胺-4-硫酸酯酶(N-acetyl galactosamine-4-sulfatase)、碱性磷酸酯酶(alkaline phosphatase)和2, 3-二磷酸甘油酸变位酶(iPGM)等。它们在发育和疾病中的作用尚不清楚, 因此对其研究具有重要意义。

果蝇基因CG6236位于三号染色体右臂, 编码一个含有680个氨基酸的蛋白, 从flybase提供的信息得知, 该蛋白具有碱性磷酸酶样核心结构域(alkaline phosphatase-like, core-domain)、碱性磷酸酶样 $\alpha/\beta/\alpha$ 结构域(alkaline phosphatase-like, alpha/beta/alpha)及功能未知

结构域DUF229(protein of unknown function DUF229)。目前研究认为, DUF229结构域参与线虫类幼虫期发育的生长调控, 但具体分子机制尚不清楚。基因Y41E3.1是CG6236在线虫中的同源基因, Piano等^[7]和Maeda等^[8]通过RNAi的方法筛选发现, Y41E3.1可能与线虫胚胎极体形成、母体生殖力及个体健康有关。目前, 对于基因CG6236的功能研究在果蝇中还未见相关报道。本课题首次获得CG6236基因缺失和转基因果蝇, 并初步观察了基因CG6236的表型, 为进一步研究CG6236的功能, 进而研究该类碱性磷酸酶样蛋白在发育中的功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 果蝇品系 P-因子插入果蝇购自美国Bloomington Drosophila Stock Center, 其基因型为P{SUPor-P}CG6236^{KG01833}。所用到的工具蝇基因型分别为w¹¹¹⁸、Dr/TM6B、w; Δ 2-3, Sb/TM6B, Tb、en-Gal4-UAS-GFP/CyO、ap-Gal4/BCG、yw hs-flp; FRT82B ubiquitous-

收稿日期: 2012-02-15 接受日期: 2012-03-21

国家重大科技计划专项课题(No.2011CB943900)、温州医学院人才启动项目(No.QTJ08012)、温州医学院科研基金重大项目(No.XNK07005)、温州市科技局计划项目(No.Y20110154)和温州医学院眼视光医院课题(No.YNK201113)资助项目

*通讯作者。Tel: 010-64807731, E-mail: yihuiwu@ioz.ac.cn

GFP/TM6B, *Tb*, 均由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 Polyfect Transfection Reagent试剂盒购自QIAGEN公司; 内切酶*Kpn* I和*Xba* I购自NEB公司; fastPfu DNA聚合酶、fastPfu 5×Buffer、PCR产物纯化试剂盒购自北京全式金公司; 琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒购自康为世纪公司; 一抗mouse anti-V5购自Invitrogen公司; mouse anti-Wg(4D4)、mouse anti-Ptc、Rat anti-Ci均购自Developmental studies hybridoma bank; Guinea pig anti-Sens为本实验室自制^[9]; 荧光偶联二抗购自Invitrogen公司。

1.2 方法

1.2.1 突变体果蝇获取 将带有P-因子的果蝇与表达转座酶基因的果蝇品系*w*; $\Delta 2-3$, *Sb/Tm6B*, *Tb*杂交, 根据Spradling等^[10]的方法进行基因杂交实验。最后提取果蝇基因组DNA并进行PCR筛选, 将PCR产物回收纯化后送与北京华大基因公司进行测序鉴定, 最后建成CG6236-*d/TM6B*突变体果蝇品系, 共d1、d2、d3三株。

1.2.2 过表达重组质粒构建 用*w¹¹¹⁸*野生型果蝇cDNA为模板, 利用PCR的方法扩增出CG6236 cDNA全长片段, 纯化后用*Kpn* I和*Xba* I进行双酶切, 连接至*pUAST-V5*载体, 筛选获得*pUAST-CG6236-V5*重组质粒。所得质粒用于细胞转染及果蝇胚胎显微注射。

1.2.3 细胞定位 采用Polyfect Transfection Reagent转染试剂, 将2 μ g *pUAST-CG6236-V5*质粒和0.2 μ g *PM1-Gal4*质粒共转染到Hela细胞中, 具体过程参照试剂盒说明书。培养48 h后按照Belenkaya等^[11]的方法进行固定和免疫荧光染色。制片后, 用激光共聚焦显微镜(Carl Zeiss, LSM780)拍照。

1.2.4 基因功能分析 将*yw hs-ftp; FRT82B ubi-GFP/TM6B, Tb*果蝇与CG6236-*d1 FRT82B/TM6B*果蝇杂交。每隔48 h将亲本转入新鲜的培养基中, 再将旧管(一龄和二龄幼虫)放入37 °C的水浴锅中热激2 h。隔24 h后再将同一管于37 °C的水浴锅中热激2 h, 之后放入25 °C培养箱中培养。待出现三龄幼虫后将其在显微镜下解剖。按照Belenkaya等^[11]的方法固定和免疫荧光染色。制片后, 用激光共聚焦显微镜拍照。取显微注射后获得的CG6236过表达雄蝇*UAS-CG6236-V5/TM6B*分别与*en-Gal4-UAS-GFP/CyO*, *ap-Gal4/BCG*雌蝇杂交, 待出现F1代三龄幼虫后将其在显微镜下解剖, 按上述方法固定和免疫荧光染色, 制片后在激光共聚焦显微镜下拍照。

2 结果

2.1 基因CG6236及其同源物保守性分析

基因CG6236编码的蛋白含有碱性磷酸酶样结构域, 可能具有碱性磷酸酶或硫酸酯酶的活性。为了研究这一类蛋白的功能, 我们利用生物信息学的方法在果蝇中找到14个与CG6236蛋白同样具有碱性磷酸酶样结构域的基因, 它们在某些特征氨基酸上具有一定的保守型。以其中4个为例(其对应的基因分别是CG9988、CG16854、CG7120、CG15695), 利用多序列比对工具ClustalW^[12]比对发现这些序列的相同度超过30%(图1), 其中, 在天冬氨酸、组氨酸、丝氨酸和苏氨酸等功能性残基以及其它疏水性和极性氨基酸残基上具有很好的保守性。

2.2 获得基因CG6236突变体果蝇

为研究基因CG6236的功能, 我们利用P-因子介导的不精确剪切的方法来获取CG6236缺失突变体果蝇。经一系列杂交实验, 最后总共获得280株P-因子被切除的果蝇, 经自动基因测序仪测序, 发现其中3株造成目标基因缺失(图2A, P-因子发生精确解离后的PCR条带大小为2 185 bp)。其中第一株果蝇(CG6236-*d1*)中基因CG6236的翻译起始位点区域及前两个外显子已被删除, 共切除546 bp; 第二株果蝇(CG6236-*d2*)中基因CG6236的翻译起始位点区域、第一个及部分第二个外显子已被删除, 共切除492 bp; 第三株果蝇(CG6236-*d3*)中基因CG6236的翻译起始位点区域、前三个及部分第四个外显子已被删除, 共切除1 122 bp(图2B)。三个突变体果蝇品系子代纯合突变体均半致死, 且致死期介于二龄和三龄幼虫之间, 提示CG6236应该具有重要的功能。

2.3 CG6236编码的蛋白在细胞质中表达

基因的表达位置与其功能密切相关, 因此我们构建了基因CG6236全序列cDNA的*pUAST-CG6236-V5*重组质粒。将*pUAST-CG6236-V5*质粒转染HeLa细胞, 对标签V5进行免疫染色以标记CG6236的表达位置(图3A), Hoechst标记细胞核(图3A'), 结果显示, CG6236编码的蛋白在细胞质中表达。

2.4 基因CG6236缺失产生黑色素瘤样表型

我们得到的三个突变体果蝇均表现为半致死性状。以第一个突变体果蝇为例, 我们发现存活的纯合突变体幼虫后侧腹部, 以及成蝇腹部均出现黑色素瘤样(melanotic tumor)表型(图4), 其它两个突变体果蝇中也出现相同的情况。解剖果蝇发现黑色素

CG6236A	202	NVLMFGFD SLSRNAFIRKIL PRTYEYLTQQLGATV LGYNIVG DGTPQALVPL LTG FTELELPET RKRL SGA
CG6236B	202	NVLMFGFD SLSRNAFIRKIL PRTYEYLTQQLGATV LGYNIVG DGTPQALVPL LTG FTELELPET RKRL SGA
CG16854	228	SVMLGMD SLSHLNPLRQ RRRTANYV RKHL SHVEFW YKVG DNTFPNLVPL LSGL LIDQELN ACTFK TLR
CG7120	254	SVMLGID SISR VNL IRAMP PKTAQYL YDNG -VFEL AGYK V VD ONTFPN IMAVL TCYN LPNAME ACSPF VWG
CG15695	294	SVLL WG ID SISR DN LEL TD PR MEY LNQ H-VFEL QCYK MG DNTFPN MAVL TC FNK TYAN ARCH PE KVR
CG9988	213	SVLMFGID SLSR IN LR TD PK VYK FL TRDG-WFB QCYK IG DNTFPN LAIL TCYN PE SA IKK VC W HED
CG6236A		G S VD SYP MI WKDFAR LG Y MT S F NE D LP N VG TFT Y R MT G FE A Q P VD H Y L K T Y Y Q A H M AA E SK P N-----
CG6236B		G S VD SYP MI WKDFAR LG Y MT S F NE D LP N VG TFT Y R MT G FE A Q P VD H Y L K T Y Y Q A H M AA E SK P N-----
CG16854		- S Y D R C S F I W K K Y Q Q L G Y R S I F A E D V A M L S A P N T Q N G F R K Q P T D Y L R P M I M E M E K T V A F K K D L N M - HL
CG7120		- G L D K C D Y I W K Y Q Q R G Y V T A Y A E D A V K I N T F N L K K G F K N F P A D Y L R P Y L S A A E S Q L D H T I V W L - V H
CG15695		- G L D A C P F I W K D F K D K G Y T A F A E D W S K F S T F D Y S S R G F F N F P T D V T G R P L V L A V E K E L T I L Q R G Q M P - Y
CG9988		G C L D R T P F I W H Y F R N A S Y L T A Y A E D E A G I N T F N W K P G F L E Q P T D F Y L R P L Q A I E S G L N T W E C S D C S M K Y
CG6236A		C I G H Q F D H I T M E Y T K N F M L K Y R D - A P R F A F S F H G L S H D S I N L V G A A D D V H D W L V A L K E R S L L D D T I L I
CG6236B		C I G H Q F D H I T M E Y T K N F M L K Y R D - A P R F A F S F H G L S H D S I N L V G A A D D V H D W L V A L K E R S L L D D T I L I
CG16854		C H S R R T A D V L L E Y M K L V P R M S R - D L Y F S F F W T V A L T H D Y F N F P S L L D E A M L Q Q L Q L D S G L L N R T V V N
CG7120		C L G Y L T A A H H V D Y G L E F T R K F L N - E T Y F G F F W I N H S H D I S Q T S S M D S M E E Y L R K L V R Q T M E N T V V V
CG15695		C L G R K P A S E Y I D M G V Q F T M V N R N - S T F F G M F W I N T F S H N D F S M P S A M D E R M V K Y R T L D K G I M E N T I L I
CG9988		C I G R R I T S S Y A D M A R F A N R F V D E R P I W G L F W S N S F S H D S P Q M P S K M E D Y V L Q Y L L D F E A D G V F D S I H V
CG6236A		M A D H E N F A E V R A T L Q C K Q E E L P F F S V F P E S F K K R F I Q E Y K N F L A P E S F K K R F P Q E Y K N F L A N E H L
CG6236B		M A D H E N F A E V R A T L Q C K Q E E L P F F S V F P E S F K K R F I Q E Y K N F L A P E S F K K R F P Q E Y K N F L A N E H L
CG16854		L L S D H L R W S F R R T Y Q G N H E R Q P L M L L Y P W M T E R Y P E A I A N L R L Y P W M T E R Y P E A I A N L R L N A R K L
CG7120		F F S D H H R G P I R A T W S G H L E E L P A I F I W L P Q H L R R S H P Q F V R S L Q L L P Q H L R R S H P Q F V R S L Q L M R N K L
CG15695		F F S D H S K G P L R N L D S G F V E E L P F I Y I R V P R W I R E K Y P K L L R N L Q M W P R W I R E K Y P K L L R N L Q M K N K L
CG9988		F L S D H S K Y G R L M S L P S G F L E E L P S M F I Y L P W F R A Q Y P E Y A R A L E L L P W F R A Q Y P E Y A R A L E L M R N K L
CG6236A		T T F F D I R A T L K H V I Q L Q T I R I S E L A R G R A M S L L D P I P S N K S C A D A Y I E P W C A L N W L P L Q L N D S K Y T G I I 550
CG6236B		T T F F D I R A T L K H V I Q L Q T I R I S E L A R G R A M S L L D P I P S N K S C A D A Y I E P W C A L N W L P L Q L N D S K Y T G I I 550
CG16854		T T F F D V H A T M L Q L L N L N H - D S T L P R G I S L F L P I P A A R T C E Q A G I A A W C T C H Q R Q E L Q I N I P R - Y 568
CG7120		T T F Y D L J L T M K H I L A I S G - DC P Q C Q S L L T P V S P Q R S C S D W G I A D W C T C W E Y D T I S S T S K E S R M L G 590
CG15695		T S P Y D I R A T L R H I E L D T -PD G C S S C H S V F E E V D W S R N S Q A G I E D W C A C N S F S D V P T I D S A R S M S 628
CG9988		T S N Y D L N I L K H I E L G G - DC P E C Q S L F Y P V E T R S E D A G I P E D F C T C V P Y K R L D T Q W A K S I A P K 553

序列比对结果发现序列相似性大于30%。功能性保守位点(离子结合及催化位点)用蓝色粗体表示,并在顶部用‘*’标记,其它保守性位点用黄色粗体表示。

The range of sequence identity is over 30%. The proposed functionally conserved residues (metal binding or catalytic) are indicated in bold and blue colour, and also indicated by ‘*’ at the top of the alignment block. The other conserved residues are shown in bold and yellow colour.

图1 基因CG6236及其同源基因蛋白序列保守性分析

Fig.1 Conservation analysis of CG6236 and homologues

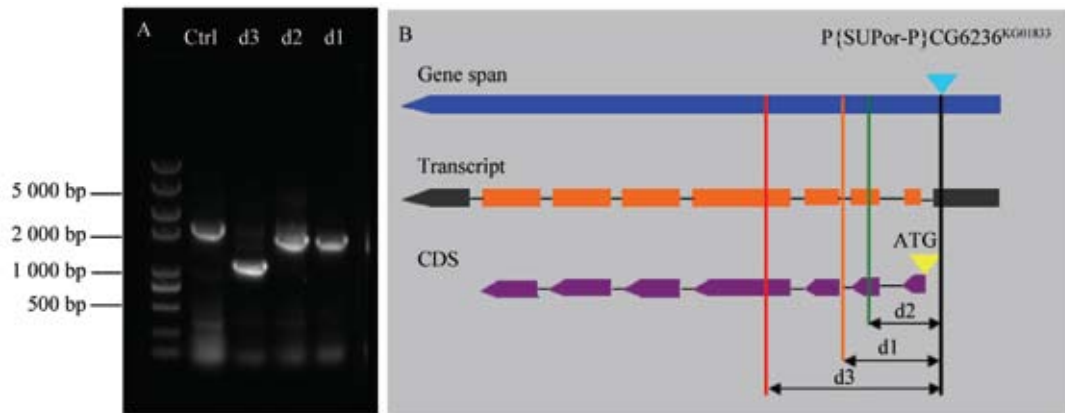
瘤附着在中肠(midgut)及后肠(hindgut)上。

2.5 缺失和过表达基因CG6236均不影响Wingless和Hedgehog信号通路

果蝇Wingless(Wg)及Hedgehog(Hh)蛋白在信号转导的调控机制中起重要的作用,通过信号转导激活下游靶基因表达,影响细胞的增殖、分化、黏附和运动等多种行为,并在动物的胚胎发育、各组织

器官形态建成中起重要的调控作用,Wnt/Wg及Hh信号通路的异常会导致多种人类重大疾病(如先天性缺陷、肿瘤)的发生^[13-14]。在果蝇幼虫翅膀成虫盘中,Wg蛋白在背腹分界线上表达,并向两边形成一个浓度梯度^[14]。Hh蛋白在翅膀成虫盘后部表达,并向前诱导Patched(Ptc)表达^[15]。

CG6236编码的蛋白可能具有硫酸酯酶的活性。

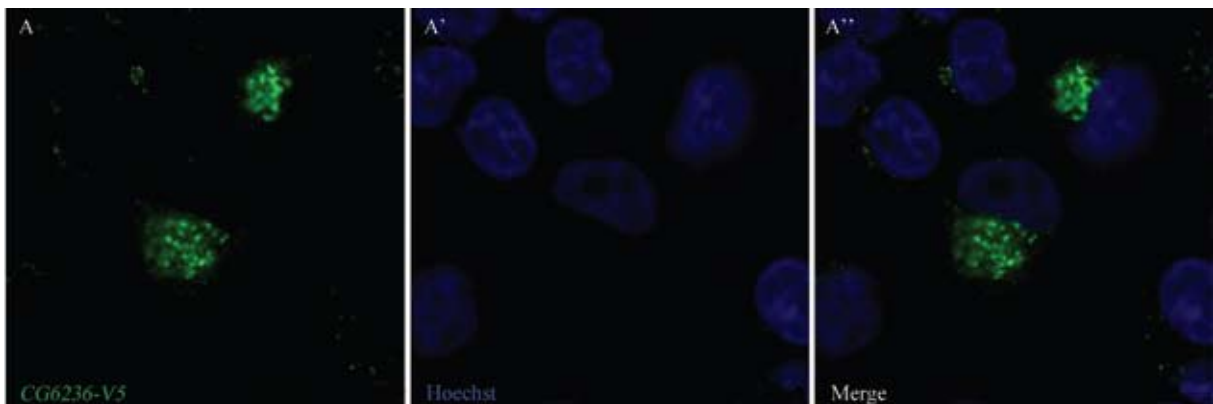


A: *CG6236*缺失突变体PCR结果, 从右到左泳道依次为d1、d2、d3、阳性对照和marker; B: 突变体基因缺失示意图, 双向箭头所指为切除部分, 紫色方块代表*CG6236*编码序列, 蓝色三角为P-因子插入位置。

A: PCR results of deletions, from right to left are d1, d2, d3, positive control and DNA marker; B: the diagram of deletion results. Bi-direction arrows indicate the deletion regions, purple blocks represent the coding sequence of *CG6236*, blue triangle indicates the P-element insertion location.

图2 基因*CG6236*缺失突变体的鉴定及示意图

Fig.2 The PCR results and diagram of identified *CG6236* deletions

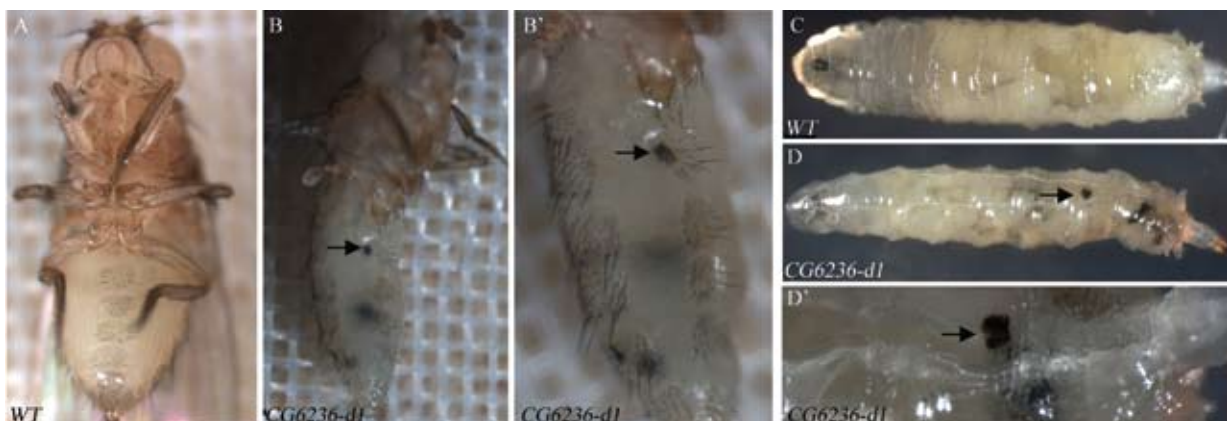


A: *CG6236*在细胞质中表达; A': HeLa细胞核; A'': A和A'的叠加图。

A: the protein of *CG6236* is localized in the cytoplasm; A': the nuclei of HeLa cells; A'': the merge of A and A'.

图3 *CG6236*编码的蛋白在细胞质中的定位

Fig.3 The location of *CG6236* protein in the cytoplasm



A: 野生型; B~B': 成蝇腹部出现黑色素瘤样表型(箭头); C: 野生型; D~D': 三龄幼虫后侧腹部出现黑色素瘤样表型(箭头)。

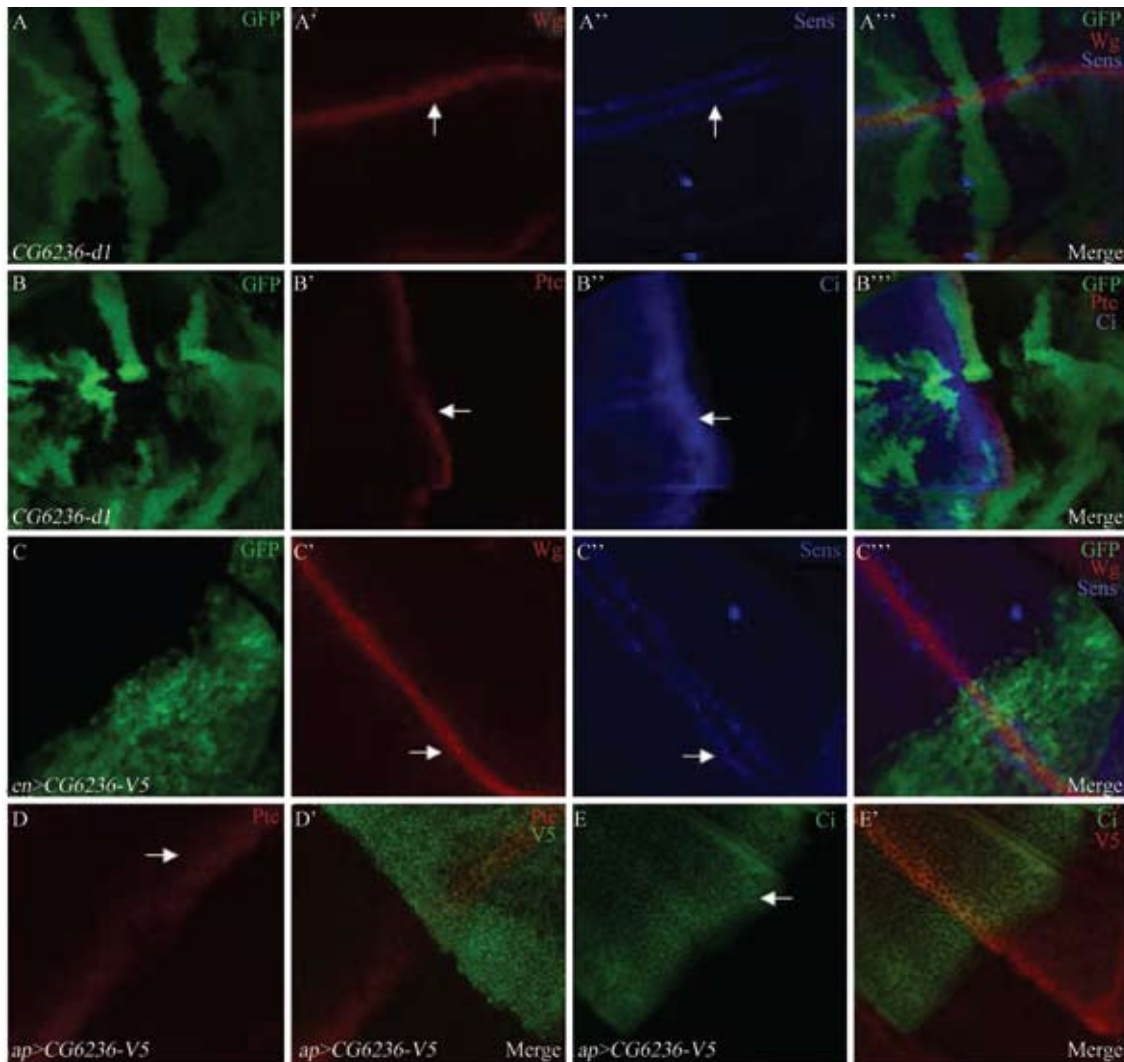
A: wild type; B~B': melanotic tumors are observed in the abdomen of adult flies (arrow); C: wild type; D~D': melanotic tumors are observed in the posterior of 3rd-instar larva (arrow).

图4 *CG6236*纯合突变体果蝇出现黑色素瘤样表型

Fig.4 Melanotic tumors are observed in homo-mutant alleles for *CG6236*

硫酸酯酶在个体发育中具有重要的作用,如目前已有文献报道在鸡胚胎中*sulfatases 1*通过调节Hh信号活性影响神经胶质细胞的生成^[16],在果蝇中硫酸酯酶相关基因*sulfated*参与负反馈调节Wg信号通路^[17]。因此,需要鉴定其对Wg及Hh信号通路的影响。我们采用FLP-FRT的方法^[18]在果蝇翅膀成虫盘中产生*CG6236*突变体体细胞克隆,经与周围的野生型细胞

比较,发现Wg及其下游靶基因*Senseless(Sens)*和Hh信号通路中的*Ptc*和*Cubitus interruptus(Ci)*的表达水平未受影响(图5A~图5B'')。其次,用Gal4诱导的增强子捕获方法^[19]在幼虫翅膀成虫盘中特定部位过表达*CG6236*,发现Wg、Sens、Ptc以及Ci蛋白的表达水平也没有明显变化(图5C~图5D'')。可见基因*CG6236*不参与Wg和Hh信号通路的调控。



A~B: GFP阴性细胞为*CG6236*突变体细胞。A~B''': 翅膀成虫盘腹侧向上,前侧向左;A': 在突变细胞中,Wg表达水平没有变化(箭头);A'': Sens表达水平没有变化(箭头);B': 在突变细胞中,Ptc表达水平没有变化(箭头);B'': Ci表达水平未见明显变化(箭头)。C~E': 翅膀成虫盘背侧向右上,前侧向左上。C: GFP标记部位为*CG6236-V5*过表达区域;C': 在*CG6236-V5*过表达细胞中,Wg表达水平没有变化(箭头);C'': Sens表达水平没有变化(箭头);D~D': 在*CG6236-V5*过表达细胞中(D',绿色),Ptc表达水平未见明显变化(D,箭头);E~E': 在*CG6236-V5*过表达细胞中(E',红色),Ci表达水平未见明显变化(E,箭头)。

A~B: wing disc bearing *CG6236* mutant clones are marked by the absence of GFP. A~B''': wing disc is oriented ventral up, anterior left; A': the expression of Wg is normal in *CG6236* mutant clones (arrow); A'': Sens staining is not reduced (arrow); B': Ptc level is not altered in *CG6236* mutant clones (arrow); B'': Ci level is normal (arrow); C~E': wing discs are oriented dorsal top-right, anterior top-left; C: *CG6236-V5* is over-expressed in wing disc using *en-Gal4-UAS-GFP*; C': Wg level is not altered in P compartment (arrow) compared to A compartment; C'': Sens level is also not altered (arrow); D~D': *CG6236-V5* is over-expressed using *ap-Gal4* in wing disc (D', green), the expression of Ptc is normal in D compartment (D, arrow); E~E': *CG6236-V5* is over-expressed using *ap-Gal4* in wing disc (E', red), Ci staining is normal in E compartment (E, arrow).

图5 缺失和过表达基因*CG6236*不影响Wg和Hh信号通路

Fig.5 *CG6236* is not required for Wg and Hh signaling

3 讨论

黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)由于其生长周期短、遗传背景简单且易于操作等优点, 已经被广泛运用于遗传学和发育生物学研究。

我们利用生物信息学的方法在果蝇中找到了14个与CG6236相似、同样具有碱性磷酸酶样结构域的蛋白基因, 比对发现这些基因编码的蛋白在天冬氨酸、组氨酸、丝氨酸和苏氨酸等功能性残基, 以及脯氨酸、甘氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸等结构性残基上有很好的保守性。Danesin等^[16]和Bhadra等^[20]曾对类似的蛋白家族做过深入的生物信息学分析, 发现这些保守的氨基酸位点在三维结构上具有很好的相似性。碱性磷酸酶样超蛋白家族中的碱性磷酸酶和硫酸酯酶的活性中心分别为丝氨酸和半胱氨酸, 它们在拓扑结构上处于等同的位置, 而CG6236及相关基因在该位置上是丝氨酸/苏氨酸, 和碱性磷酸酶接近。另外, 在碱性磷酸酶和硫酸酯酶中保守的金属离子结合氨基酸残基在CG6236及相关基因中也同样保守, 提示CG6236及相关基因很可能具有碱性磷酸酶的活性。

P-因子介导的不精确剪切已经成为研究果蝇基因功能的一种重要的方法, 本实验中一共从280株P-因子切除后果蝇中获得3株CG6236基因缺失果蝇, 获得基因缺失果蝇的概率为1.07%。目前文献中报道, P-因子发生跳跃的概率大致在35%~75%范围之间^[21], 相比之下获得基因缺失果蝇的概率似乎很低, 可能是P-因子与CG6236的距离、发生不精确解离的方向及大小、染色质区域复杂程度等有关。

CG6236基因突变果蝇纯合子半致死, 致死期介于二龄和三龄幼虫之间, 存活的纯合子成蝇腹部、幼虫后侧腹部出现黑色素瘤样表型, 提示CG6236在果蝇发育中起重要的作用。果蝇中Wg和Hh信号通路的异常已被证实会导致肿瘤的发生^[13,22], 由于CG6236蛋白可能具有碱性磷酸酶或硫酸酯酶的活性, 我们怀疑CG6236可能参与Wg和Hh信号通路, 但结果发现缺失或过表达CG6236都不影响Wg和Hh信号通路, 说明CG6236蛋白很可能不具有硫酸酯酶的活性, 其作用机制与这两个信号通路无关。

鉴于CG6236突变后果蝇出现黑色素瘤样表型, 可见其在果蝇发育中发挥重要的作用。果蝇中黑色素瘤在幼虫阶段已经形成, 且通常在腹部出现^[22], 有文章指出参与免疫应答的基因会导致黑色素瘤的

形成^[23]。目前, 果蝇中黑色素瘤的发生主要认为是与Toll和JAK/STAT信号通路有关。Toll信号通路在进化上保守, 在果蝇免疫应答^[24]及发育上起重要的作用^[25-26], 当果蝇受到细菌或真菌的感染时, Toll信号通路被激活诱导果蝇免疫系统产生抗菌多肽(antimicrobial peptides, AMPs)^[26]。Lemaitre等^[27]及Qiu等^[28]发现, 突变Toll信号通路成员*cactus*, 或过表达*Toll*基因会产生黑色素瘤样的表型。

JAK/STAT是一条多种细胞因子共用的信号传导途径, 也在免疫系统起重要的作用^[29]。已有报道发现, 过表达果蝇JAK家族成员*hopscotch(hop)*基因会导致黑色素瘤的产生^[30-31]。NURF301是核小体重塑因子(nucleosome remodeling factor, NURF)复合体中的一个成员, Badenhorst等^[32]发现, 果蝇*nurf301*基因缺失会产生黑色素瘤, 且证实NURF301参与负调控JAK/STAT信号通路。根据我们的实验结果发现, CG6236突变后的表型与*nurf301*缺失后产生的表型相似, 因此我们猜测CG6236也有可能和JAK/STAT信号通路有关。综上所述, 对于CG6236是否与Toll和JAK/STAT信号通路有关, 以及CG6236的具体作用机制还有待进一步证明。

本课题首次报道了一个基因CG6236的初步研究结果, 获得CG6236基因缺失突变及转基因果蝇品系, 明确CG6236在细胞质中表达, 并发现缺失基因CG6236会导致黑色素瘤的产生, 以上结果为进一步研究基因CG6236及这一类基因的功能提供了基础。

参考文献 (References)

- 1 Stingham ST, Moura JF, Zancanella P, Rodrigues GA, Pianovski MA, Lalli E, *et al.* Specific immunoassays for placental alkaline phosphatase as a tumor marker. *J Biomed Biotechnol* 2006; 2006(5): 56087.
- 2 Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nihon Med Sch* 2010; 77(1): 4-12.
- 3 Goldberg RF, Austen WG Jr, Zhang X, Munene G, Mostafa G, Biswas S, *et al.* Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(9): 3551-6.
- 4 Tuin A, Poelstra K, de Jager-Krikken A, Bok L, Raaben W, Velders MP, *et al.* Role of alkaline phosphatase in colitis in man and rats. *Gut* 2009; 58(3): 379-87.
- 5 Vardy ER, Kellett KA, Cocklin SL, Hooper NM. Alkaline phosphatase is increased in both brain and plasma in Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis* 2012; 9(1): 31-7.
- 6 Magnusson P, Davie MW, Sharp CA. Circulating and tissue-derived isoforms of bone alkaline phosphatase in Paget's disease

- of bone. *Scand J Clin Lab Invest* 2010; 70(2): 128-35.
- 7 Piano F, Schetter AJ, Mangone M, Stein L, Kempthues KJ. RNAi analysis of genes expressed in the ovary of *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* 2000; 10(24): 1619-22.
- 8 Maeda I, Kohara Y, Yamamoto M, Sugimoto A. Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Curr Biol* 2001; 11(3): 171-6.
- 9 Zhang P, Wu Y, Belenkaya TY, Lin X. SNX3 controls Wingless/Wnt secretion through regulating retromer-dependent recycling of Wntless. *Cell Res* 2011; 21(12): 1677-90.
- 10 Rubin GM, Spradling AC. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* 1982; 218(4570): 348-53.
- 11 Belenkaya TY, Han C, Standley HJ, Lin X, Houston DW, Heasman J. *pygopus* Encodes a nuclear protein essential for wingless/Wnt signaling. *Development* 2002; 129 (17): 4089-101.
- 12 Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994; 22(22): 4673-80.
- 13 MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: Components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 2009; 17(1): 9-26.
- 14 Couso JP, Bishop SA, Martinez Arias A. The wingless signalling pathway and the patterning of the wing margin in *Drosophila*. *Development* 1994; 120(3): 621-36.
- 15 Ramirez-Weber FA, Casso DJ, Aza-Blanc P, Tabata T, Kornberg TB. Hedgehog signal transduction in the posterior compartment of the *Drosophila* wing imaginal disc. *Mol Cell* 2000; 6(2): 479-85.
- 16 Danesin C, Agius E, Escalas N, Ai X, Emerson C, Cochard P, *et al.* Ventral neural progenitors switch toward an oligodendroglial fate in response to increased Sonic hedgehog (Shh) activity: Involvement of Sulfatase 1 in modulating Shh signaling in the ventral spinal cord. *J Neurosci* 2006; 26(19): 5037-48.
- 17 You J, Belenkaya T, Lin X. Sulfated is a negative feedback regulator of wingless in *Drosophila*. *Dev Dyn* 2011; 240(3): 640-8.
- 18 Xu T, Rubin GM. Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* 1993; 117(4): 1223-37.
- 19 Duffy JB. GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* 2002; 34 (1/2): 1-15.
- 20 Bhadra R, Srinivasan N, Pandit SB. A new domain family in the superfamily of alkaline phosphatases. *In Silico Biol* 2005; 5(4): 379-87.
- 21 O'Brochta DA, Gomez SP, Handler AM. P element excision in *Drosophila melanogaster* and related drosophilids. *Mol Gen Genet* 1991; 225(3): 387-94.
- 22 Barigozzi C. The significance of melanotic tumors of *Drosophila*. *Folia Hered Pathol (Milano)* 1966; 15 (2): 51-72.
- 23 Watson KL, Johnson TK, Denell RE. Lethal(1) aberrant immune response mutations leading to melanotic tumor formation in *Drosophila melanogaster*. *Dev Genet* 1991; 12(3): 173-87.
- 24 Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86(6): 973-83.
- 25 Belvin MP, Anderson KV. A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996; 12: 393-416.
- 26 Hetru C, Hoffmann JA. NF-kappaB in the immune response of *Drosophila*. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; 1(6): a000232.
- 27 Lemaitre B, Meister M, Govind S, Georgel P, Steward R, Reichhart JM, *et al.* Functional analysis and regulation of nuclear import of dorsal during the immune response in *Drosophila*. *EMBO J* 1995; 14(3): 536-45.
- 28 Qiu P, Pan PC, Govind S. A role for the *Drosophila* Toll/Cactus pathway in larval hematopoiesis. *Development* 1998; 125(10): 1909-20.
- 29 Kalaitzidis D, Gilliland DG. Going with the flow: JAK-STAT signaling in JMML. *Cancer Cell* 2008; 14(4): 279-80.
- 30 Harrison DA, Binari R, Nahreini TS, Gilman M, Perrimon N. Activation of a *Drosophila* Janus kinase (JAK) causes hematopoietic neoplasia and developmental defects. *EMBO J* 1995; 14(12): 2857-65.
- 31 Hou XS, Melnick MB, Perrimon N. Marelle acts downstream of the *Drosophila* HOP/JAK kinase and encodes a protein similar to the mammalian STATs. *Cell* 1996; 84(3): 411-9.
- 32 Badenhorst P, Voas M, Rebay I, Wu C. Biological functions of the ISWI chromatin remodeling complex NURF. *Genes Dev* 2002; 16(24): 3186-98.

Drosophila Novel Alkaline Phosphatase Related Gene CG6236 Deletion and Phenotypic Analysis

Miao Haifeng¹, Fang Kexin¹, Huang Shuangshuang², Jin Longjin², Lin Xinhua³, Wu Yihui^{3*}

(¹School of Optometry and Ophthalmology, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China; ²School of Medical Lab Science & School of Life Sciences, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China; ³State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Alkaline phosphatase (ALP) is present in all tissues through the entire body in human, and the abnormal ALP level is related to many diseases. However, the molecular mechanism of ALP during development remains unclear. Here, we report and analyze the function of gene *CG6236*, an important ALP-like gene, using *Drosophila* model system. We generated 3 mutant alleles for *CG6236* using imprecise P-element excision method. We found that homo-mutant alleles were semi-lethal, and there were melanotic tumors in the abdomen of homozygous mutant larvae and adult flies. Moreover, we generated *pUAST-CG6236-V5* construct and its transgenic lines. The staining results showed that the protein of *CG6236* was localized in the cytoplasm. Furthermore, by mosaic clone analysis and over-expression of *CG6236* in wing discs, we showed that *CG6236* is not required for Wingless and Hedgehog signaling. Taken together, this is the first time to generate *CG6236* mutants and transgenic lines in *Drosophila*, and uncover the phenotype of a novel ALP related gene *CG6236*. Our findings provided evidence and laid foundation for further research to elucidate the physiological function and molecular mechanism of *CG6236*.

Key words *CG6236*; alkaline phosphatase; gene deletion; melanotic tumor; *Drosophila*

Received: February 15, 2012 Accepted: March 21, 2012

This work was supported by the National Basic Research Program of China (No.2011CB943900), Research Foundation for Advanced Talents of Wenzhou Medical College (No.QTJ08012), the Scientific Research Fund Major Project of Wenzhou Medical College (No.XNK07005), the Wenzhou Municipal Science and Technology Program (No.Y20110154) and the Research Foundation of Ophthalmology and Optometry, Wenzhou Medical College (No.YNKT201113)

*Corresponding author. Tel: 86-10-64807731, E-mail: yihuiwu@ioz.ac.cn