

研究论文

C-cadherin控制非洲爪蛙早期胚胎中微丝骨架的合成

史慧娟 张 艳 陶庆华*

(清华大学生命学院, 北京 100084)

摘要 上皮细胞间形成的Adherens junctions复合物通过E-cadherin胞质区段, 经由catenin家族蛋白介导, 与细胞中微丝骨架系统(microfilament)相互作用, 参与控制细胞极性、迁移, 发育中的形态建成运动以及组织稳态维持等重要生命现象。多方面实验证据表明, cadherin复合物与微丝骨架系统的相互作用是高度动态的; 作者前期的工作发现, 在非洲爪蛙早期胚胎中, 经典cadherin(C-cadherin)在细胞膜上的表达量决定细胞中微丝骨架合成总量。该研究进一步提供实验证据, 表明随着囊胚期细胞增殖的进行, 囊胚中期以后, 细胞表面C-cadherin逐步富集, 相应地细胞中微丝骨架的合成量也增加。我们还通过细胞解聚, C-cadherin敲降和过量表达, 以及C-cadherin与F-actin共定位分析等实验验证在囊胚期外胚层细胞中, 细胞膜C-cadherin表达量与细胞微丝骨架的合成量高度正相关。

关键词 微丝骨架; 钙粘连蛋白; 非洲爪蛙

前言

经典钙粘连蛋白(包括E-cadherin、N-cadherin、VE-cadherin)家族一次跨膜糖蛋白, 是上皮细胞之间的钙离子依赖粘连带, 在维持上皮组织完整性、细胞极性、细胞迁移等过程中发挥重要作用^[1]。经典cadherin的功能受与其胞内区段相互作用的蛋白质的精确调控。p120-catenin特异地结合经典cadherin细胞膜临近区域, 调控经典cadherin在细胞膜上的稳定性和表达量; 而 β -catenin则结合于经典cadherin羧基端区域, 并进一步招募 α -catenin而调控cadherin与微丝骨架(filamentous actin cytoskeleton, 简称F-actin)的相互作用。在成熟上皮组织中, E-cadherin复合物在上皮细胞接触区域的顶侧聚集, 与皮层F-actin形成稳定的相互作用, 调控上皮细胞顶侧-基底侧极性和上皮组织的稳态发育。在上皮细胞之间形成新生粘连带结构的初始阶段, E-cadherin复合物调控F-actin组装和动态变化, 而新合成的F-actin则促进稳定的cadherin粘连带结构形成^[2-6]。因此, cadherin复合物与F-actin的相互作用是高度动态的。

在非洲爪蛙受精卵发育至囊胚期期间, 裂球间的粘连受母源储备的经典cadherin成员C-cadherin(又称EP-cadherin或者XB-cadherin)的控制。囊胚期细

胞膜上C-cadherin的表达量受LPA受体等GPCR介导的细胞信号调控, 从而决定细胞皮层F-actin的组装^[7-9]。囊胚期细胞皮层F-actin为胚胎提供足够的机械支撑力量, 维持胚胎的球形形状^[10]。当囊胚期F-actin的组装或者动态变化受到干扰, 胚胎无法进行正常的形态建成运动^[7-8]。原肠胚期, 各胚层开始分化; 外胚层在腹方形成表皮、在背方分化成神经板, 表皮和神经板中分别特异地表达E-cadherin和N-cadherin。敲降E-cadherin或者N-cadherin均会导致神经管闭合缺陷; 相应地, 两种上皮组织中细胞皮层F-actin的组装量也下调^[11]。这些实验结果初步揭示了在非洲爪蛙胚胎早起发育和形态建成运动中, 经典cadherin在细胞膜上的稳定表达与皮层F-actin的动态组之间的调控关系。

本研究通过细胞解聚、母源基因敲降或者过量表达等方法改变囊胚期C-cadherin在细胞膜上的表达量, 综合运用免疫荧光、激光共聚焦显微成像等技术揭示了囊胚形成过程中细胞膜上C-cadherin的

收稿日期: 2012-06-08 接受日期: 2012-10-18

国家自然科学基金(No.30930012)资助项目

*通讯作者。Tel: 010-62788745, Fax: 010-62792749, E-mail: qhtaolab@mail.tsinghua.edu.cn

表达量与皮层F-actin组装之间的高度正相关性。

1 材料与方法

1.1 胚胎操作和动物极帽分离

通过常规体外受精方法获得足够的受精卵,在卵裂期,用2% Cysteine(pH8.0)去除胶囊,并用0.1×MMR进行充分清洗,然后将胚胎培养于0.1×MMR溶液中备用。为了进行动物极帽的分离,将足量的囊胚期胚胎转移到经2% Agarose铺底,含有1×MMR溶液(0.1 mol/L NaCl, 2.0 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgSO₄, 2 mmol/L CaCl₂, 5 mmol/L HEPES, pH7.8)的培养皿中,用钟表匠镊子去除胚胎的卵黄膜,然后用解剖针逐个分离动物极帽;分离完毕,用巴斯德滴管轻轻吹洗动物极帽,去除黏着的细胞碎片,并将它们转移到新鲜1×MMR中培养10~15 min。C-cadherin mRNA的过量表达实验中,将500 pg合成加帽 C-cadherin mRNA注射到2-细胞期胚胎动物极,然后培养到所需时期。C-cadherin mRNA合成:用Asp718将pCS107-Xt C-cad进行线性化,然后纯化,用Ambion mMessage mMachine SP6 Kit进行体外合成。

为了敲除母源C-cadherin,先分离足够的第6期成熟卵细胞,将4~6 ng的特异反义寡核苷酸C-cad AS61注射到卵母细胞中,培养36~48 h后,用2 μmol/L孕酮(progesterone)诱导其恢复减数分裂,之后将不同的处理组别进行活体染料(Bismarck brown, Nile blue, neutral red)标记,通过手术将标记的对照组和实验组卵母细胞灌注到正在产卵的雌蛙腹腔中。受体雌蛙在手术前12 h,经注射1 000单位人绒毛膜促性腺激素(HCG)诱导产卵。手术前,用0.2% MS222将雌蛙进行深度麻醉。灌注完毕,用丝质缝合线分别将受体雌蛙腹壁肌肉和皮肤缝合,然后将雌蛙放入高盐溶液(1.2×MMR)中恢复,大约3~4 h后,收集染料标记的和部分受体自身卵进行体外受精。详细实验流程参考文献^[12-13]。

C-cad AS61序列^[14]: 5'-C*C*T*CTCCAGCTCCCT-*A*C*G-3'; *代表硫代磷酸二酯键嵌合修饰。

1.2 免疫染色、F-actin染色

用FG固定液(3.7% formaldehyde, 0.25% Glutaraldehyde, 1×PBSTx)将动物极帽室温固定10 min,然后用1×PBS+0.3% Triton X-100(1×PBSTx)溶液洗涤3次,加入适量Alexa488-Phalloidin(5 U/mL, Molecular

Probes, Oregon, USA), 4 °C培养8~12 h, 然后进行激光共聚焦显微镜观察。如果需要进行抗C-cad免疫染色, 将经FG固定后或者经Phalloidin染色后的动物极帽用10%正常山羊血清(NGS, 用1×PBSTx稀释)封闭1~2 h, 然后加入含抗C-cad抗体(1:300; 6B6, DSHB, University of Iowa, USA)的新鲜10% NGS, 4 °C培养6~8 h, 用1×PBSTx洗涤3次, 每次30 min, 然后加入含1:500稀释的山羊抗小鼠IgG(Cy5-GaM IgG, Jackson lab), 4 °C 2 h, 然后用1×PBS清洗3次, 每次10 min。如有必要, 可以进行Phalloidin复染。

1.3 Western blot

为了检测C-cad蛋白总量, 用50 mL 1×PBS+1% Triton X-100(含蛋白酶抑制剂, PIC cocktail, Roche)将5枚胚胎进行充分裂解, 750×g离心, 去除卵黄颗粒和脂肪, 然后取上清液加入等体积4×上样液。一抗6B6, 1:500; 二抗GaM-HRP, 1:2 500(Jackson lab)。

1.4 激光共聚焦显微镜观察

使用Zeiss LSM 510, 低倍成像使用Fluar UV/20×NA0.75物镜; 高倍使用C-Apochromat 63×NA1.3水镜。

2 结果

2.1 运用囊胚期动物极外胚层组织研究微丝骨架的合成

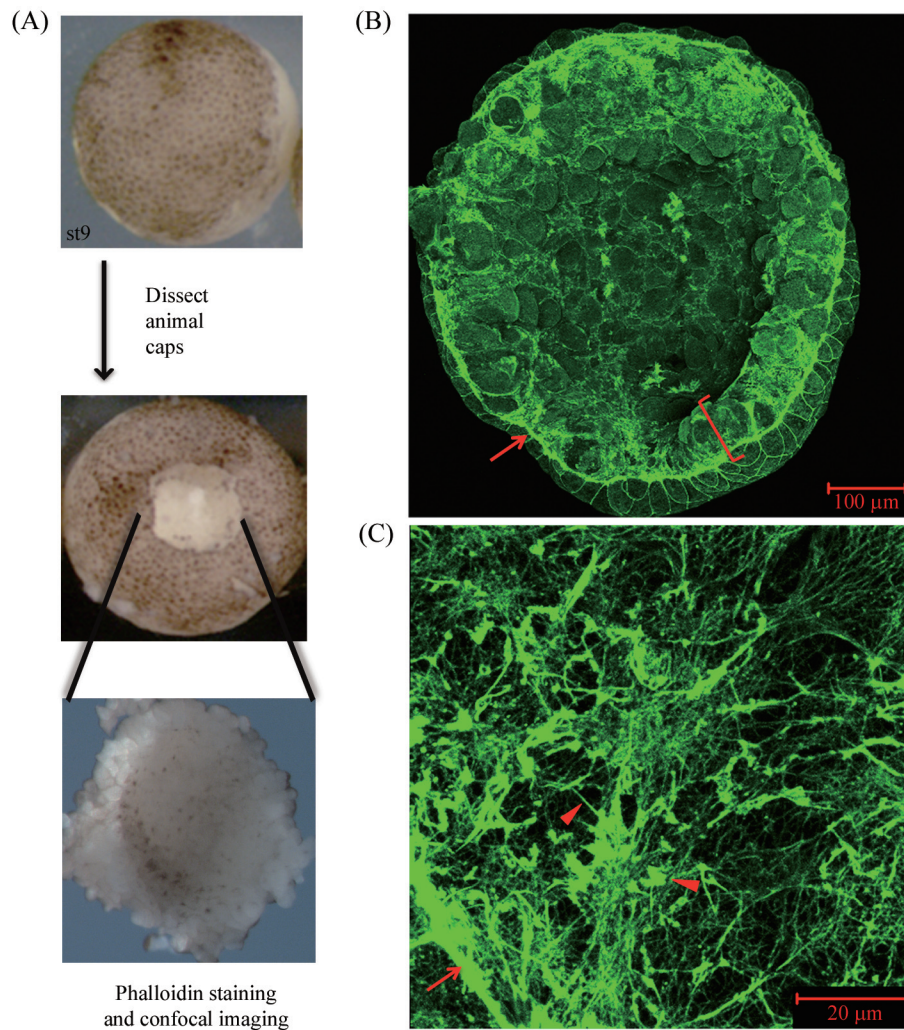
非洲爪蛙囊胚期胚胎外胚层组织(动物极帽)被证明是研究微丝骨架合成机制和发育功能的优良系统。将去胶囊(jelly coat)的受精卵培养至囊胚中期(st8.5), 然后转移10~15枚胚胎至有琼脂糖包被的、含有等渗透压培养溶液(1×MMR)的培养皿中, 用钟表匠镊子剥去卵黄膜, 待其恢复5~10 min, 然后用解剖针逐一分离动物极帽(图1A); 动物极帽的大小一般为胚胎赤道直径的1/3左右。分离完毕, 用灭菌巴斯德滴管轻轻吹洗动物极帽, 去掉黏着的细胞碎片, 并将它们转移到新鲜等渗溶液中培养10~15 min, 之后, 用甲醛/戊二醛/PBST溶液将它们置于轻轻摇动的摇床上, 室温固定10 min, 然后用PBST溶液清洗5次, 每次5 min; 加入Alexa488-Phalloidin(5 U/mL)染色8~12 h (4 °C); 使用PBS清洗, 3次, 每次10 min。然后进行激光共聚焦显微镜观察记录。图1B显示一个典型的正在愈合的动物极帽低倍物镜(20×)观察结果: F-actin在正在愈合的外缘、切割创面、以及细胞周周围的合成量较高。红色箭头所示创面外缘F-actin

呈环状结构,即所谓“purse string”,是富含F-actin、actinomycin的动态结构,正是这一结构所产生的收缩力将致使整个动物极帽愈合成圆球状。还可以在较高倍物镜下观察细胞皮层F-actin的组织结构、丝状或者片状伪足结构(图1C)。

2.2 囊胚期C-cadherin的表达量与细胞中F-actin合成量正相关

为了研究囊胚期C-cadherin和F-actin表达量变化的相关性,我们分别分离囊胚中期(st7.5)和晚期(st9.75)的动物极帽,然后按上述实验流程记录不

同发育时期动物极帽细胞中F-actin合成量的变化;不同的是,我们也对一部分动物极帽单独进行抗C-cadherin免疫染色。图2A和2B显示,囊胚晚期动物极帽细胞中F-actin的合成量显著高于囊胚中期的合成量。而免疫染色的结果则显示,C-cadherin在细胞膜上的表达量也有显著提高。为了进一步验证这一结果,我们还对从囊胚中期到原肠早期的整体胚胎中C-cadherin的表达量进行了Western blot分析,结果(图2D)显示,囊胚晚期(st9)和原肠早期(st10)C-cadherin的表达总量较囊胚中期(st7-8)也显著增加。

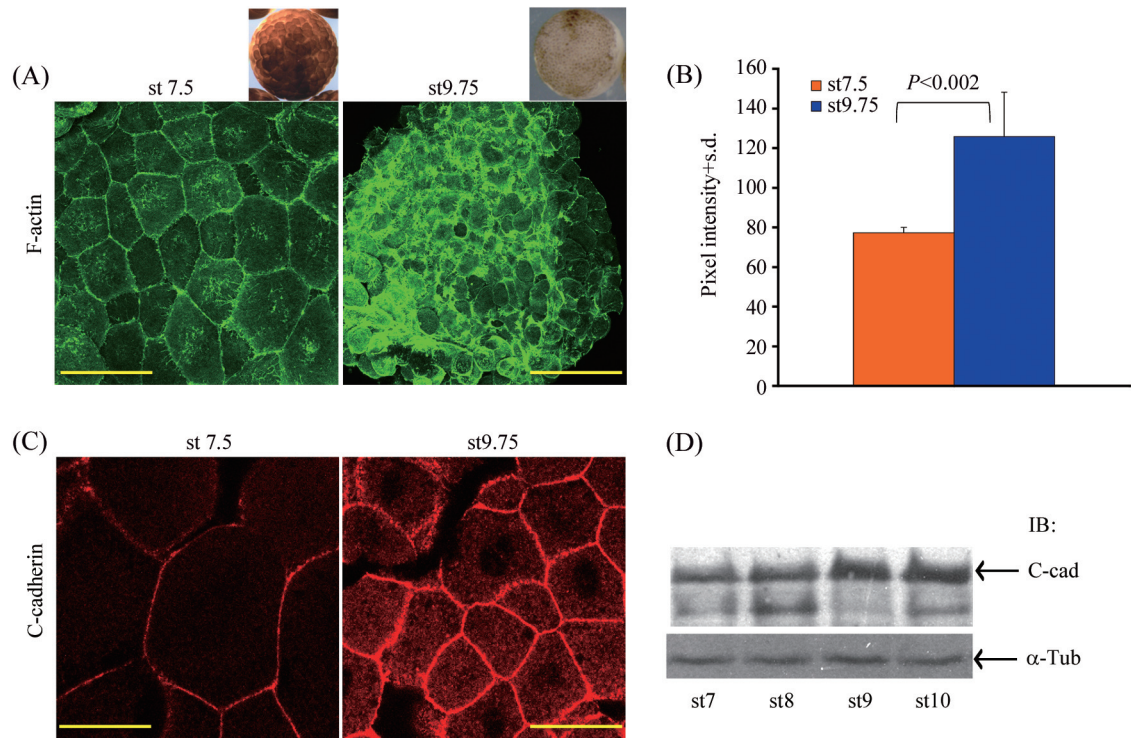


A: 图示分离动物极帽的过程;经Alexa488-Phalloidin染色后通过激光共聚焦显微镜获取的动物极帽内侧低倍(B)和高倍(C) F-actin成像照片。箭头所指为purse string;三角号所指为富含F-actin的伪足;方括弧所指为伤愈面。

A: a schematic depiction of the procedures for detecting cortical actin of animal explants from late blastula stage (st9) *Xenopus* embryos; B: lower magnification confocal imaging of a representative animal explant stained with Alexa488-conjugated Phalloidin showing an actin rich purse-string (indicated by red arrow) assembled along the outer edge of the explant. The healing edge of the explant is marked by a red bracket (scale bar=100 μm); C: high magnification confocal imaging showing the purse-string (red arrow) and actin-rich membrane processes (red triangles, scale bar=20 μm).

图1 使用囊胚期动物极外胚层组织研究F-actin合成

Fig.1 Analyzing cortical actin assembly using ectodermal explants of *Xenopus* blastula



A: 囊胚中期(st7.5)和囊胚晚期(st9.75)动物极帽内侧F-actin染色, scale bar=200 μ m; B: 图2A所示实验F-actin合成量的定量分析结果; C: 囊胚中期(st7.5)和囊胚晚期(st9.75)动物极帽细胞表面C-cad蛋白免疫荧光染色结果, scale bar=100 μ m; D: 囊胚中期(st7)和原肠早期(st10)胚胎中C-cad蛋白表达量Western blot分析结果。

A: F-actin staining on the inner surface of representative animal explants from blastula embryos at st7.5 and st9.75 respectively, scale bar=200 μ m; B: quantitative measurements of pixel intensity of F-actin staining from all animal explants examined in experiments shown in A; C: immunostaining results comparing the expression levels of C-cadherin on the cell surfaces of animal explants from embryos at st7.5 and st9.75 respectively, scale bar=100 μ m; D: Western blot results showing the total amount of C-cadherin increases at the mid-blastula transition(st8-9). α -Tubulin serves as a loading control.

图2 囊胚期细胞F-actin合成量与细胞膜C-cad蛋白表达量协同变化

Fig.2 The increase of cortical actin assembly at the mid-blastula transition is correlated with the increase of C-cadherin expression in the cell surface

2.3 细胞解聚导致F-actin合成量的下降

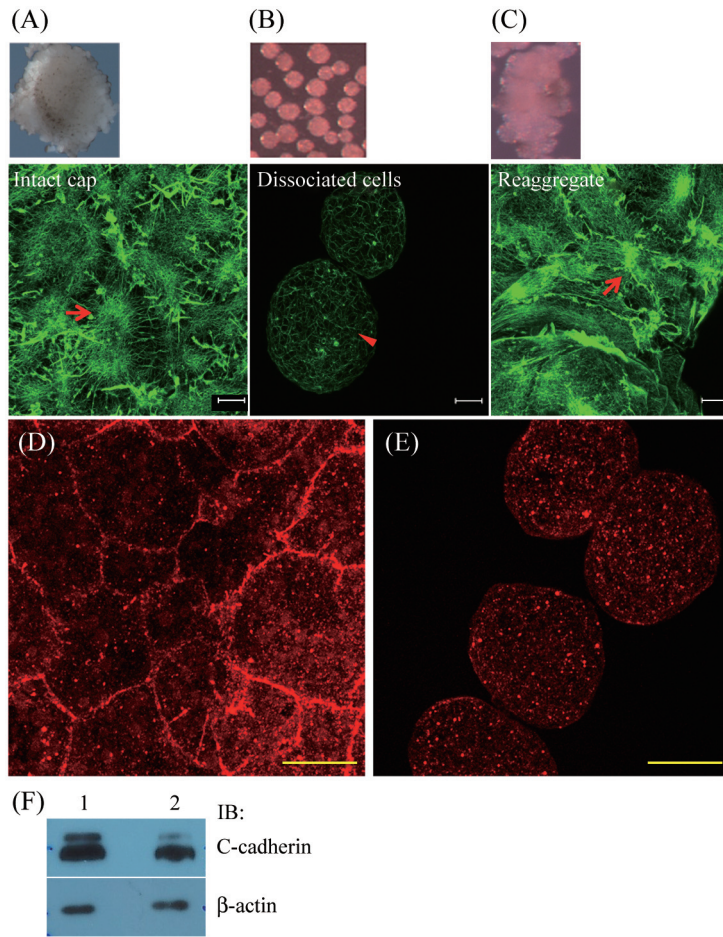
为了研究细胞膜C-cadherin表达与细胞皮层F-actin合成量的关系,我们还比较了完整动物极帽细胞与解聚动物极帽细胞中F-actin量的差异。图3A显示,在完成的动物极帽中,可以观察到典型的致密细胞皮层F-actin网络和富含F-actin的丝状或者片状伪足结构。而当动物极帽被解聚成单个细胞,细胞皮层F-actin的合成量则显著下降,而且网络结构的致密度也下降,细胞周围也没有伪足的形成。为了检验解聚细胞的健康状况,我们还在解聚培养2 h后,向培养液中加入钙镁离子,观察细胞间能否重新聚集。图3C显示,这些培养细胞可以重新聚集,而聚集集体中F-actin的合成量也基本恢复正常,表明解聚细胞中F-actin合成量的下降不是因为细胞死亡导致的。

将部分动物极帽和解聚细胞按相同条件进行

抗C-cadherin免疫染色的实验结果表明,与完整动物极帽中细胞(图3D)相比,解聚细胞表面C-cadherin的表达量显著下降,而在胞质中则可以检测到大量的C-cadherin阳性颗粒(图3E)。Western blot实验结果也表明,细胞解聚导致细胞中的C-cadherin表达总量略有下调(图3F)。这些结果表明,当细胞之间失去cadherin介导粘连后,微丝骨架的合成量和网络密度均会下降,至少部分原因是因为C-cadherin不能在细胞膜上稳定地表达。

2.4 细胞膜C-cadherin与细胞皮层F-actin共定位检测

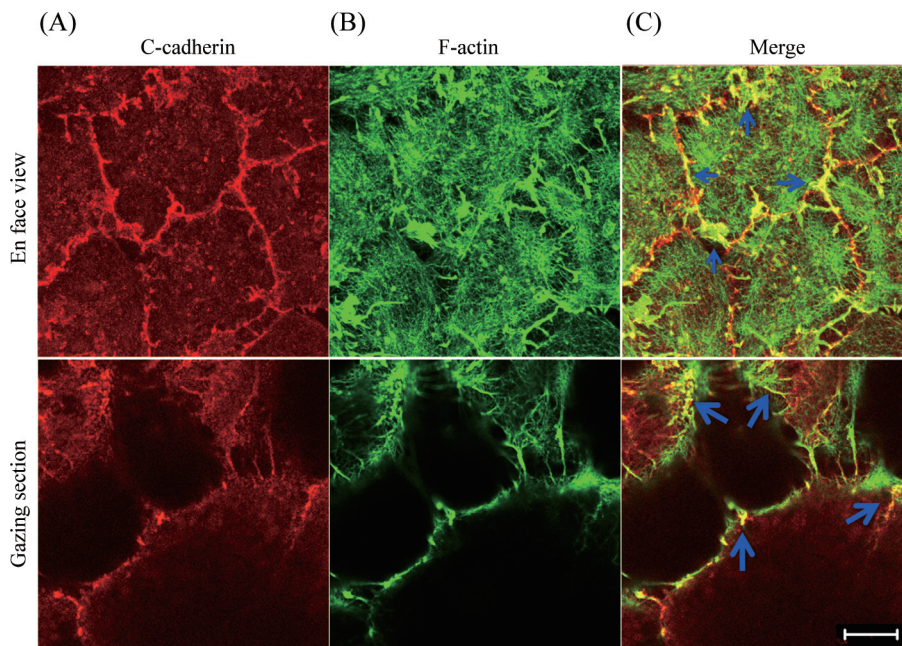
以上结果表明,在胚胎早期发育过程,C-cadherin在细胞膜表面的表达量与细胞皮层F-actin的合成量以及组织结构有密切关系,为了进一步在囊胚期胚胎细胞中观察C-cadherin与F-actin的共定位关系,



A: 完整动物极帽内侧F-actin表现为致密网络结构(箭头所指); B: 单个解聚细胞中F-actin网络密度和总量明显降低(三角号); C: 单细胞重聚后, F-actin的合成结构特征恢复正常; D: 完整动物极帽C-cad免疫荧光染色; E: 解聚单细胞C-cad免疫荧光染色; F: Western blot结果显示完整动物极帽(lane 1)和解聚动物极帽(lane 2)中C-cadherin的表达总量; Scale bars=10 μ m.

A: F-actin staining in intact animal explant showing the dense cortical actin network (indicated by red arrow); B: F-actin staining of dissociated cells showing the decrease of the density and total amount of cortical actin (indicated by red solid triangle); C: F-actin staining of reagggregates of a group of cells showing the density and amount of cortical actin are restored; D,E: immunostaining indicating the expression levels of C-cadherin on the cell surfaces of an intact animal explant (D) and on the surfaces of dissociated cells (E); F: Western blot for C-cadherin in intact animal explants (lane 1) and dissociated cells (lane 2). β -actin serves as a loading control. Scale bars=10 μ m.

图3 细胞解聚导致F-actin合成量和网络密度下降
Fig.3 Cell dissociation resulted in the reduction of the density and the amount of cortical actin



A: 囊胚晚期动物极帽C-cad免疫荧光染色结果; B: 囊胚晚期动物极帽F-actin染色结果; C: 囊胚晚期动物极帽C-cad免疫荧光染色和F-actin染色的重叠效果。箭号所指共染色明显区域, scale bar=20 μ m。

C-cadherin (A) and F-actin (B) double staining of animal explants from st9.75 embryos showing C-cadherin and F-actin colocalize at the cell-cell contact sites (C). Upper panels: en face view; lower panels: view from a gazing section. Scale bar=20 μ m.

图4 C-cadherin与细胞质皮层F-actin的共定位

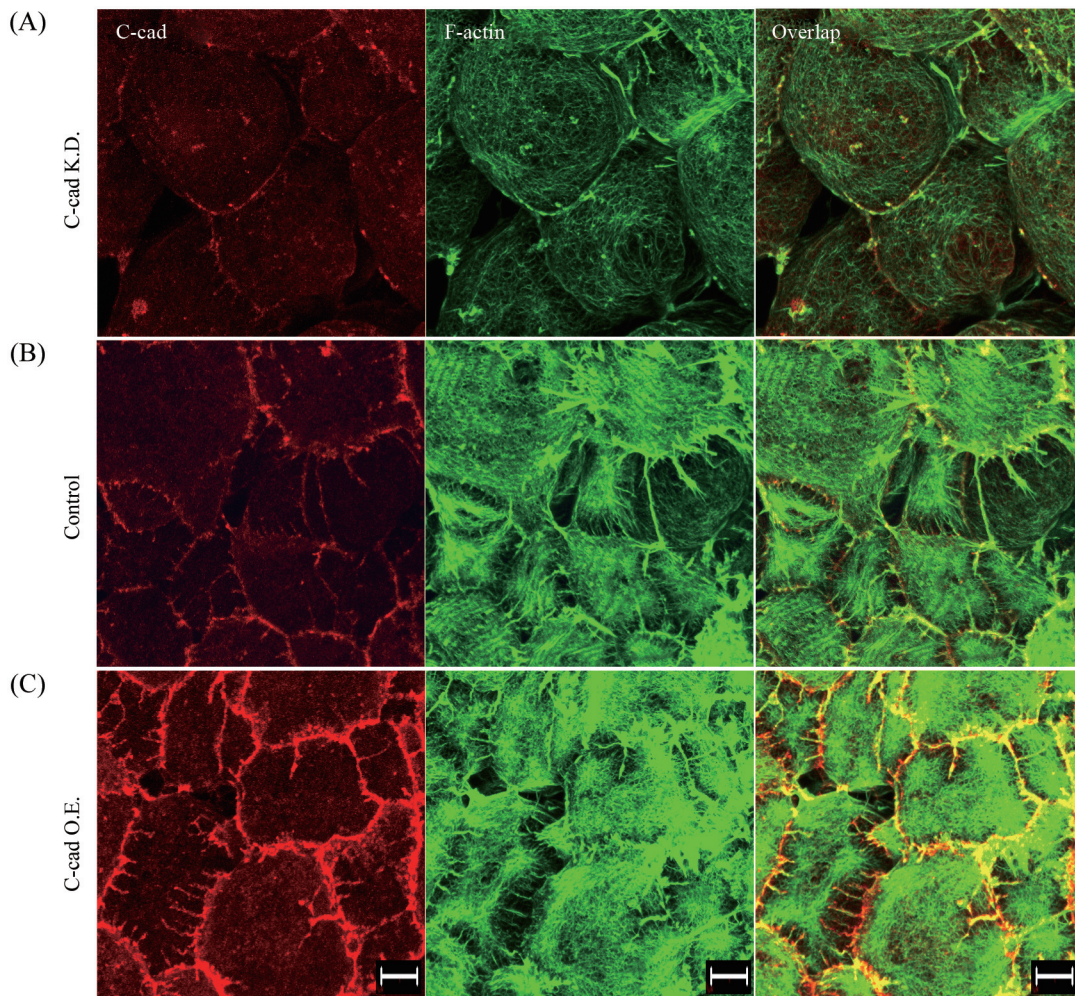
Fig.4 The co-localization of cortical actin and C-cadherin at the cell surface

我们对分离培养的动物极帽进行了抗C-cadherin和Phalloidin共染色研究,图4A上半部分图片显示的是动物极帽内表面C-cadherin与F-actin的共定位情形,在细胞接触部位,二者的共定位非常明显。图4下半部分显示的是激光共聚焦单张层扫的结果,这里业可以观察到C-cadherin与F-actin在细胞接触部位和伪足结构中的共定位。

2.5 细胞表层F-actin合成量对细胞膜C-cadherin表达量的响应

微丝骨架系统对cadherin在细胞表面的稳定表达非常重要,因此上面的观察结果还不足以支持cadherin可以控制F-actin合成的观点,因此,我们

进行了C-cadherin敲降和过量表达实验,直接观察C-cadherin表达量改变后,F-actin合成量的变化。为了敲降母源C-cadherin mRNA,我们使用已经多次验证能够有效降解非洲爪蛙母源mRNA的反义寡核苷酸,并运用受体转移技术获得C-cadherin敲降胚胎。在C-cadherin过量表达实验中,我们将500 pg的合成非洲爪蛙C-cadherin mRNA注射到2-细胞期动物极。然后按上述程序,分离囊胚晚期动物极帽,进行抗C-cadherin和F-actin染色。图5显示,同来源于正常胚胎的动物极帽(图5B)相比,敲降母源C-cadherin(图5A)的确导致细胞中F-actin合成量的显著下降;而过量表达(图5C)则显著增加了F-actin的合成量。这些



A: 敲降C-cad(C-cad K.D.)导致F-actin合成量和网络密度下降; B: 对照组; C: 过量表达C-cad(C-cad O.E.)导致F-actin合成量显著上调; Scale bar=10 μm 。

C-cadherin(red panels) and F-actin(green panels) double staining showing that depletion of C-cadherin (A) and overexpression of C-cadherin (C) result in the decrease and increase, respectively of cortical actin assembly. The levels of C-cadherin on the cell surfaces and cortical actin are shown in panel B. Scale bar=10 μm .

图5 细胞膜C-cadherin的表达量与细胞中F-actin合成量正相关

Fig.5 The amount of cortical actin assembly is proportional the levels of expression of C-cadherin on the cell surface

结果还进一步显示了C-cadherin和F-actin的共定位关系。

综合以上结果, 我们认为在非洲爪蛙早期发育中, C-cadherin在细胞膜表面的表达量决定了细胞皮层微丝骨架合成量。

3 讨论

非洲爪蛙受精卵经历12次快速的同步化、无间期卵裂至囊胚中期, 期间细胞不具备迁移能力。囊胚中期之后, 胚胎细胞获得迁移能力, 是原肠运动发生的必要条件^[15]。分析囊胚形成过程中cadherin与皮层F-actin的组装之间的调控关系有助于与我们进一步深入分析胚胎形态建成运动的遗传控制机制。本研究提供多方面实验证据, 表明在非洲爪蛙囊胚形成过程中, C-cadherin的表达总量和细胞膜上C-cadherin的表达量在囊胚形成过程中均显著上调, 相应地, 囊胚晚期细胞中皮层F-actin的组装量较囊胚早期细胞中显著增多。运用寡核苷酸特异地敲降母源C-cadherin的表达量, 导致囊胚晚期细胞中皮层F-actin的组装量显著下降, 而过量表达C-cadherin则导致囊胚晚期细胞中皮层F-actin的组装量显著增多。在囊胚晚期动物极组织解聚试验中, 我们发现细胞间粘连的破坏也导致细胞表面C-cadherin的表达量下降, 而单细胞中皮层F-actin的组装量也显著减少。在C-cadherin与F-actin双重染色实验中, 我们发现C-cadherin与皮层F-actin在细胞接触区域显示明显的共定位。因此, 我们认为在非洲爪蛙囊胚形成过程中, 细胞膜表面的C-cadherin表达量与细胞皮层F-actin的组装存在正调控关系。在分析外胚层分化过程中E-cadherin和N-cadherin的功能中, 我们也发现E-cadherin和N-cadherin分别控制表皮和神经上皮细胞中F-actin的组装^[11]。因此, 控制胚胎细胞皮层F-actin的组装是经典cadherin的共性。

多种胞质蛋白可以调控cadherin在细胞表面的稳定表达。p120-catenin通过与E-cadherin胞内区段的细胞膜临近区域结合而稳定E-cadherin在细胞膜上的表达, 泛素连接酶Hakai则通过泛素化E-cadherin胞内区段的细胞膜临近区域而促进E-cadherin的内吞。 α -catenin调控cadherin从内膜系统到细胞质膜的分泌过程。在非洲爪蛙囊胚中的功能分析表明, p120 catenin不仅促进C-cadherin在细胞膜表面的稳定表达, 而且还具有促进皮层F-actin组装的功能^[7]。

p120 catenin促进F-actin在cadherin复合物周围的组装的分子机制尚不明了。囊胚期细胞表面C-cadherin的稳定表达也受LPA等G蛋白偶联受体(GPCR)介导的细胞信号的调控^[7-9]。敲降LPA受体等GPCR导致皮层F-actin组装缺陷, 而过量表达C-cadherin则可以拯救LPA受体等GPCR敲降胚胎中皮层F-actin的组装。结合本研究的发现, 我们推测在非洲爪蛙囊胚形成过程中, LPA受体等GPCR介导的细胞信号通过尚不明了的机制在囊胚中期之后被激活, 促进C-cadherin在细胞膜上的稳定表达, 进而促进皮层F-actin的组装。C-cadherin如何通过如p120-, α -, β -, γ -catenin等胞质蛋白相互作用, 并接受细胞信号如小GTP酶的调控而促进形态建成运动中胚胎细胞皮层F-actin的动态组装, 是我们将来的工作重点。

致谢——

感谢美国俄亥俄州辛辛那提儿童医院研究中心发育生物学系Chris Wylie、Jeanet Heasman、Matt Kofron提供的帮助。

参考文献 (References)

- 1 Ratheesh A, Yap AS. A bigger picture: Classical cadherins and the dynamic actin cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13(10): 673-9.
- 2 Ehrlich JS, Hansen MD, Nelson WJ. Spatio-temporal regulation of Rac1 localization and lamellipodia dynamics during epithelial cell-cell adhesion. *Dev Cell* 2002; 3(2): 259-70.
- 3 Jamora C, Fuchs E. Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nat Cell Biol* 2002; 4(4): E101-8.
- 4 Kovacs EM, Ali RG, McCormack AJ, Yap AS. E-cadherin homophilic ligation directly signals through Rac and phosphatidylinositol 3-kinase to regulate adhesive contacts. *J Biol Chem* 2002; 277(8): 6708-18.
- 5 Kovacs EM, Goodwin M, Ali RG, Paterson AD, Yap AS. Cadherin-directed actin assembly: E-cadherin physically associates with the Arp2/3 complex to direct actin assembly in nascent adhesive contacts. *Curr Biol* 2002; 12(5): 379-82.
- 6 Vaezi A, Bauer C, Vasioukhin V, Fuchs E. Actin cable dynamics and Rho/Rock orchestrate a polarized cytoskeletal architecture in the early steps of assembling a stratified epithelium. *Dev Cell* 2002; 3(3): 367-81.
- 7 Tao Q, Lloyd B, Lang S, Houston D, Zorn A, Wylie C. A novel G protein-coupled receptor, related to GPR4, is required for assembly of the cortical actin skeleton in early *Xenopus* embryos. *Development* 2005; 132(12): 2825-36.
- 8 Lloyd B, Tao Q, Lang S, Wylie C. Lysophosphatidic acid signaling controls cortical actin assembly and cytoarchitecture in *Xenopus* embryos. *Development* 2005; 132(4): 805-16.
- 9 Tao Q, Nandadasa S, McCrea PD, Heasman J, Wylie C. G-protein-coupled signals control cortical actin assembly by control-

- ling cadherin expression in the early *Xenopus* embryo. Development 2007; 134(14): 2651-61.
- 10 Kofron M, Heasman J, Lang SA, Wylie CC. Plakoglobin is required for maintenance of the cortical actin skeleton in early *Xenopus* embryos and for cdc42-mediated wound healing. J Cell Biol 2002; 158(4): 695-708.
- 11 Nandadasa S, Tao Q, Menon NR, Heasman J, Wylie C. N- and E-cadherins in *Xenopus* are specifically required in the neural and non-neural ectoderm, respectively, for F-actin assembly and morphogenetic movements. Development 2009; 136(8): 1327-38.
- 12 Mir A, Heasman J. How the mother can help: Studying maternal Wnt signaling by anti-sense-mediated depletion of maternal mRNAs and the host transfer technique. Methods Mol Biol 2008; 469: 417-29.
- 13 Hulstrand AM, Schneider PN, Houston DW. The use of antisense oligonucleotides in *Xenopus oocytes*. Methods 2010; 51(1): 75-81.
- 14 Heasman J, Crawford A, Goldstone K, Garner-Hamrick P, Gumbiner B, McCrea P, et al. Overexpression of cadherins and underexpression of beta-catenin inhibit dorsal mesoderm induction in early *Xenopus* embryos. Cell 1994; 79(5): 791-803.
- 15 Newport J, Kirschner M. A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: I. characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage. Cell 1982; 30(3): 675-86.

C-cadherin Controls Cortical F-actin Assembly in the Early *Xenopus* Embryo

Shi Huijuan, Zhang Yan, Tao Qinghua*

(Tsinghua University School of Life Sciences, Beijing 100084, China)

Abstract Both classical cadherins and cortical F-actin are involved in the control of multiple aspects of cellular function. The dynamic interaction between cadherin complex and cortical F-actin is critical for the homeostasis of epithelial tissues and the morphogenetic movements during embryogenesis. Our previous work showed that cadherin complex on the cell surface can actively promote cortical F-actin assembly and the expression level of C-cadherin on the cell surface of the primary ectoderm of *Xenopus* blastula determines the amount of cortical F-actin assembly. In this study we demonstrate that the cortical F-actin assembly is dramatically increased in the late blastula compared to the early blastula, and this increase is highly correlated with the accumulation of C-cadherin on the cell surface during *Xenopus* blastula formation. By depleting the maternally stored C-cadherin and dissociating the animal caps at late blastula stage, we show the reduction of the expression level of C-cadherin on the cell surface resulted in the decrease of cortical F-actin assembly. These results further support our hypothesis that cortical F-actin assembly in the early *Xenopus* embryo is largely controlled by the expression level of C-cadherin on the cell surface.

Key words cortical actin; C-cadherin; *Xenopus*

Received: June 8, 2012 Accepted: October 18, 2012

This work was supported by National Natural Science Foundation of China (No.30930012)

*Corresponding author. Tel: 86-10-62788745, Fax: 86-10-62792749, E-mail: qhtaolab@tsinghua.edu.cn