

研究论文

Non-muscle Myosin II-A调节斑马鱼胚胎发育过程中肠内分泌细胞的极化

袁 玮¹ 浦 超² Rupesh Puri² 石运伟¹ 王 新¹ 李石莹¹ 刘 东^{1*}(¹南通大学江苏省神经再生重点实验室, 南通 226001; ²南通大学医学院, 南通 226001)

摘要 胃肠道上皮由包括肠内分泌细胞在内的多种细胞类型组成, 其中肠内分泌细胞占胃肠道上皮细胞总量的1%左右。在哺乳动物胚胎发育过程中, 肠内分泌细胞位于深层组织, 因此很难观察和研究。到目前为止, 参与调节肠内分泌细胞形成和更新的分子调控机制仍然很不清楚。*Tg(nkx2.2a:mEGFP)*转基因斑马鱼品系中GFP表达在发育过程中的肠内分泌细胞, 并且在胚胎期斑马鱼通体透明, 因此*Tg(nkx2.2a:mEGFP)*为研究胚胎发育过程中肠内分泌细胞的形成过程及其分子调控提供了良好的模型。该研究发现, 斑马鱼肠内分泌细胞形成的关键阶段为受精后48~72 h(hour past fertilization, hpf), 而极化的关键时期为60~72 hpf。斑马鱼中Non-muscle Myosin II-A(NM II-A)对应的两个基因 *myh9a*和*myh9b*在肠内分泌细胞极化关键阶段的肠上皮表达。在60~70 hpf, 利用不同浓度的NM II功能特异性的抑制剂blebbistatin处理*Tg(nkx2.2a:mEGFP)*斑马鱼胚胎, 结果显示: blebbistatin可抑制肠内分泌细胞的极化, 并呈现剂量依赖性, 随着blebbistatin浓度的增加极化细胞的比例越来越低; 提示NM II-A调节斑马鱼胚胎发育过程中肠内分泌细胞的极化。

关键词 NM II-A; 肠内分泌细胞; blebbistatin; 极化; 斑马鱼

Non-muscle Myosin II-A Is Required for the Polarization of Developing Enteroendocrine Cells in Zebrafish Embryos

Yuan Wei¹, Pu Chao², Rupesh Puri², Shi Yunwei¹, Wang Xin¹, Li Shiyang¹, Liu Dong^{1*}(¹Jiangsu Key Laboratory of Neuroregeneration, Nantong University, Nantong 226001, China;²Medical School of Nantong University, Nantong 226001, China)

Abstract The epithelium of the gastrointestinal tract comprises multiple cell types, including the enteroendocrine cells, which constitute 1% of the total epithelial cell population. Intestinal enteroendocrine cells are not clustered together but spread as single cell throughout the intestinal tract. The deep internal position of the developing digestive system has made morphological analysis of this organ relatively difficult, particularly at early stages of development. Up to date, the regulation of enteroendocrine cells polarization remains poorly understood. In *Tg(nkx2.2a:mEGFP)* line, the regulatory elements of the *nkx2.2a* gene drive strong GFP expression in enteroendocrine

收稿日期: 2014-09-05 接受日期: 2014-12-11

南通大学自然科学基金(批准号: 12Z053)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0513-85051593, E-mail: liudongtom@gmail.com

Received: September 5, 2014 Accepted: December 11, 2014

This work was supported by the Natural Science Foundation of Nantong University (Grant No.12Z053)

*Corresponding author. Tel: +86-513-85051593, E-mail: liudongtom@gmail.com

网络出版时间: 2015-03-04 10:34

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150304.1034.004.html>

cells. Additionally, zebrafish embryos are transparent. Therefore, this line appears to be a good model for study of intestinal enteroendocrine cell development. Here we found that 48~72 h past fertilization (hpf) is an important stage for enteroendocrine cells formation, and 60~72 hpf is an important stage for its polarization. Non-muscle Myosin II-A (NM II-A) gene *myh9a* and *myh9b* were expressed in intestinal epithelium during a time window encompassing enteroendocrine cells polarization. Blocking the function of NM II-A by blebbistatin impaired polarization of enteroendocrine cells at a dose-dependent manner. This result suggests that NM II-A is required for the polarization of developing enteroendocrine cells in zebrafish embryos

Keywords Non-muscle Myosin II-A; enteroendocrine cells; blebbistatin; polarization; zebrafish

脊椎动物复杂的胃肠道上皮由内胚层的一个薄层细胞发育而来。胃肠道上皮是一个充满活力并能自我更新的组织系统,其形成和更新的过程包含了大量的细胞行为。肠道上皮包含有多种快速增殖的未分化和已分化的细胞系,这些细胞能特异地执行消化、吸收、保护和内分泌功能。哺乳动物小肠上皮内环境稳定是通过干细胞自我更新、增殖、定向分化、迁移和死亡来维持的^[1-2]。哺乳动物的小肠祖细胞进行一系列的细胞命运决定,从而产生肠细胞、杯状细胞、肠内分泌细胞和潘氏细胞。肠内分泌细胞在胃肠道占上皮细胞总量的1%左右^[2],是胃肠道和胰腺中一类特殊的内分泌细胞,与其他内分泌细胞不同之处不仅在于它是单一分散的细胞,而且其寿命非常有限,只有短短的几天到一个星期。在成年哺乳动物中肠内分泌细胞和其他胃肠道上皮细胞一样连续不断地从肠黏膜隐窝的干细胞分化^[3]。同时它是体内数量最多的分泌细胞,胃肠道的肠内分泌细胞共同构成最大的内分泌器官。它们响应各种胃肠刺激后分泌激素,并将激素释放到血液中来产生效应或传输给肠神经系统以激活神经反应^[4-5]。肠内分泌细胞分布在肠上皮并且数量远远超过吸收细胞和杯状细胞,位于深层位置很难去观察和研究。到目前为止,参与其形成和更新的分子调控机制仍然很不清楚。

近年来,斑马鱼在胃肠道发育以及相关研究上的应用促进了我们对这些机制的理解。斑马鱼作为广泛使用的模式动物归功于多种原因,包括其有很强的繁殖能力、可体外受精以及胚胎的光学透明度便于活体成像等^[6-8]。尽管发育中消化系统所处的深层次的内部位置使这个器官的形态分析比较困难,但是斑马鱼组织特异性表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的转基因品系改变了这种情况^[9-10]。特别有趣的是, *Tg(nkx2.2a:mEGFP)*品系

中GFP不仅表达于大脑、背侧神经管、发育中的胰腺,而且在发育过程中的肠内分泌细胞也有强烈的表达^[11-13]。因此, *Tg(nkx2.2a:mEGFP)*为研究胚胎发育过程中肠内分泌细胞的形成过程及其分子调控提供了良好的模型。

Non-muscle Myosin II(NM II)是一类多亚基蛋白质,用来命名由 *myh9*、*myh10*、*myh14*这三个基因表达的非肌源性肌球蛋白重链(nonmuscle myosin heavy chains, NMHCs),分别叫做NM II-A(Myh9)、NM II-B(Myh10)、NM II-C(Myh14)^[14-17]。在斑马鱼中, NM II-A(*myh9*)存在两个拷贝,分别为*myh9a*和*myh9b*^[18]。这三类NM II亚型具有非常相似的分子结构,一个NM II亚型包含两类结构区域,一个是N-末端具有MgATPase活性和肌动蛋白结合活性的球形头部,另一个是C-末端 α -螺旋卷曲的介导纤维交联的尾部^[19]。NM II的每种亚型都是一个六聚体,包括两条重链(230 kDa)、两条调控NM II活性的调节轻链RLCs(regulatory light chains)(20 kDa)及两条稳定重链结构的必需轻链ELCs(essential light chains)(17 kDa)。NM II可以可逆性地结合肌动蛋白纤维,水解ATP,被肌动蛋白激活后可将化学能转变为机械力和运动^[14,20]。肌球蛋白是一个基于肌动蛋白的分子马达家族,可以通过水解ATP产生物理推力,在细胞内运输不同的货物。而这三类NM II也是如此,在很多需要力和移动的基本细胞进程中扮演重要的角色,如细胞迁移、细胞和细胞间的黏附、细胞形态的改变等^[21-22]。此外,通过blebbistatin介导的NM II功能抑制等实验证明,在体内(*in vivo*)和体外(*in vitro*) NM II还调控细胞的极性^[22-25]。我们在前期工作中发现, NM II在斑马鱼发育中的肠上皮表达,且斑马鱼肠内分泌细胞的形成和极化发生在NM II-A表达的阶段。因此,我们假设NM II-A参与调控肠内分泌细胞的极化,本研究利用blebbistatin介导的NM

II-A功能抑制来验证这一假设。

1 材料与方法

1.1 斑马鱼

AB系斑马鱼和 *Tg(nkx2.2a:mEGFP)* 转基因斑马鱼系饲养和杂交方案严格按照文献[18]中的描述进行。收集鱼卵, 培养于28.5 °C系统水中, 根据形态特征区分发育阶段^[26]。用来原位杂交的斑马鱼胚胎在4%多聚甲醛中室温下2 h或者4 °C过夜固定, 之后用PBST(phosphate-buffered saline Tween-20)清洗, 甲醇脱水后20 °C储存备用。

1.2 整体原位杂交

取斑马鱼早期不同发育阶段的胚胎, 用PBST溶液洗去多余的甲醇溶液, 蛋白酶K消化, 将胚胎进行预杂交3 h, 然后加入所合成的反义RNA探针杂交过夜。多余的探针用0.2×SSC溶液洗去, 加入anti-Dig-AP(购于Roche公司)与反义RNA探针结合过夜。未结合的抗体用1×PBST溶液洗去, 再加入BCIP/NBT/NTMT溶液显色30 min, 迅速用PBST溶液洗去多余的显色液, 显微镜下观察并记录。用来制作 *myh9a*(NM_001098177.2)、*myh9b*(XM_001920063.3)、*myh10*(XM_686375)探针所用的PCR引物在我们之前的研究中已有报道^[18], 制作 *myh14*(XM_005157931.1)探针1(861 bp)的PCR引物序列为: 正向引物: 5'-AAG GCA AAA GCT GTT CTG GA-3'; 反向引物: 5'-GCG AAG CTG CTT ATT GGT TC-3'。探针2(767 bp)的PCR引物序列为: 正向引物: 5'-CAT CAG CGT GCT GGA GTT TA-3'; 反向引物: 5'-AAC TCA CCG GTC CAC TGT TC-3'。

1.3 显微成像

不同发育阶段的 *Tg(nkx2.2a:mEGFP)* 斑马鱼胚胎用E3/0.16 mg/mL tricaine(Ms-222)/1% 1-phenyl-2-thiourea(Sigma公司)麻醉后, 包埋到1%的低熔点琼脂糖里面(UltraPure™ Low Melting Point Agarose, Invitrogen)。用Leica SP5(Leica Microsystems)激光共聚焦显微20×镜头成像, 用Leica LAS AF lite(Leica Microsystems)和Imaris软件进行图像处理。原位杂交结果用Olympus DP71 CCD在Olympus MVX10体视显微镜观察和成像。

1.4 Blebbistatin处理

Blebbistatin(Sigma公司)先溶解到DMSO中制成10 mmol/L储存液, 然后用E3培养液稀释至不同

的浓度, 从2.5~30 μmol/L, 每2.5 μmol/L为一个单位。在细胞六孔板每个孔中加入5 mL blebbistatin工作液, 28.5 °C预温20 min后, 在每个孔中加入刚发育至60 hpf的10条斑马鱼胚胎。将胚胎放置在28.5 °C培养箱中培育, 待斑马鱼胚胎发育至70 hpf时停止处理, 将胚胎转入E3中观察和成像分析。

1.5 统计分析

每次实验均选取相同背景的6对斑马鱼进行交配。在每对斑马鱼的所产胚胎中随机选取5枚, 共约30枚胚胎进行后续的观察和计数。统计方法选用配对T检验, 数据以均数±标准差表示, 实验重复4次。

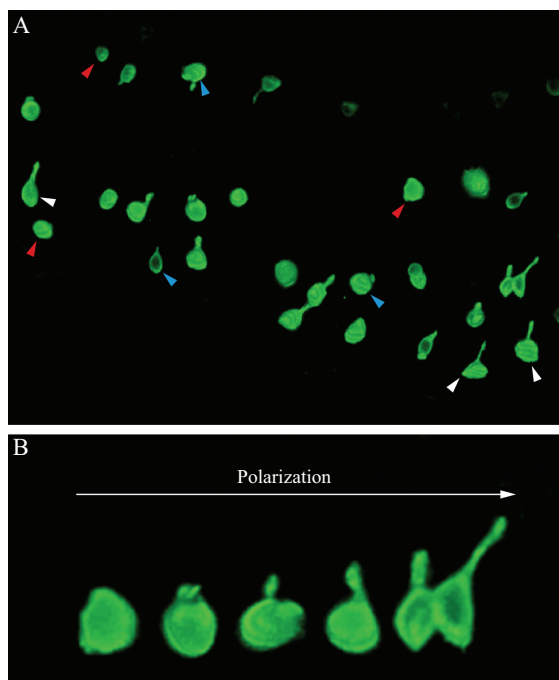
2 结果

2.1 斑马鱼肠内分泌细胞的形成和极化

据报道, 在26~30 hpf斑马鱼内胚层的一个连续排列的薄层细胞于卵黄囊的上表面位于胚胎中线的位置形成原始的肠结构。30~52 hpf是斑马鱼肠道开始并逐渐腔化的关键时期, 而52~76 hpf是肠上皮极化的关键时期^[13]。为了研究肠内分泌细胞极化过程的分子调控机制, 首先需要清楚地了解其形成和极化的过程。我们利用激光共聚焦显微成像技术分析肠内分泌细胞在极化前和极化后的形态(图1)和形成过程(图2)。细胞极化与未极化形态上的区别在于: 未极化的细胞为球形, 极化的细胞会在原来形态的基础上拉伸出一条细长的尾巴, 出现类似蝌蚪形的两极明显变化, 并且极化后的细胞排列有规律, 细胞细长的部分指向消化道腔。在分析过程中, 每个时间点我们选取了大约30枚胚胎进行统计分析。其中, 未极化的肠内分泌细胞从约48 hpf起在肠道的后部泄殖孔的位置开始形成, 此时这类细胞大约有30个左右聚集在一起并且没有极化发生, 细胞呈圆形(图2A和图2A')。到60 hpf肠内分泌细胞逐渐分散在整个肠道, 数量大约50~60个, 此时一部分细胞开始极化(图2B和图2B')。到3 dpf后肠内分泌细胞数量增加到约200个, 大部分已经发生极化(图2C和图2C')。因此, 斑马鱼胚胎在受精后48~72 hpf为肠内分泌细胞形成的关键阶段, 60~72 hpf为肠内分泌细胞极化的关键阶段。到4 dpf肠内分泌细胞增加到大约300个(图2D和图2D'), 而7 dpf增加到大约500个(图2E和图2E')。

2.2 NM II在斑马鱼胚胎的肠上皮表达

为了研究NM II是否参与斑马鱼肠内分泌细胞



A: 绿色荧光蛋白标记斑马鱼肠内分泌细胞的细胞膜。红色箭头指示未极化细胞, 蓝色箭头指示开始极化的细胞, 白色箭头指示极化细胞(200 $\times$); B: 极化中肠内分泌细胞的形态(300 $\times$)。

A: the enteroendocrine cells membrane was labeled by GFP. Red arrowheads indicated unpolarized cells, blue arrowheads indicated polarizing cells and white arrowheads indicated polarized cells (200 $\times$); B: the morphology of polarizing cells (300 $\times$).

图1 激光共聚焦显微镜下斑马鱼肠内分泌细胞的形态

Fig.1 The morphology of enteroendocrine cells by confocal microscope imaging

的极化调控, 首先我们利用全胚胎的RNA原位杂交技术系统分析了 *myh9a*、*myh9b*、*myh10*和*myh14*在斑马鱼胚胎发育中的肠上皮的表达情况。根据结果2.1, 斑马鱼肠内分泌细胞形成和极化的关键阶段为48~72 hpf, 在48和72 hpf的原位杂交试验中没有检测到*myh10*和*myh14*的表达信号(图3C、图3C'、图3D、图3D'、图3G和图3H)。此外, 也没有检测到*myh9a*在48 hpf斑马鱼胚胎肠上皮的杂交信号(图3A和图3A'); 但是*myh9b*在48 hpf的斑马鱼胚胎肠上皮表达。到72 hpf, *myh9a*和*myh9b*都在斑马鱼胚胎肠上皮表达(图3E和图3F)。这些结果与小鼠内的研究结果一致, 即在小鼠胚胎期NM II-A也在小肠上皮高表达^[27]。

2.3 Blebbistatin抑制肠内分泌细胞的极化

Blebbistatin是特异性抑制NM II功能的小分子化合物。研究结果2.1显示, 60~72 hpf为肠内分泌细胞极化的关键阶段。因此, 我们选择在60~70 hpf用不同浓度梯度的blebbistatin来处理胚胎。实验结果显示, blebbistatin抑制肠内分泌细胞的极化, 且随着浓度的增加, 极化细胞的比例越来越低(图4)。在0 $\mu\text{mol/L}$ 处理组, 约95%的肠内分泌细胞发生极化(图4A和图4E); 在2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 处理组, 分别约为88%、40%、20%、15%、5%的肠内

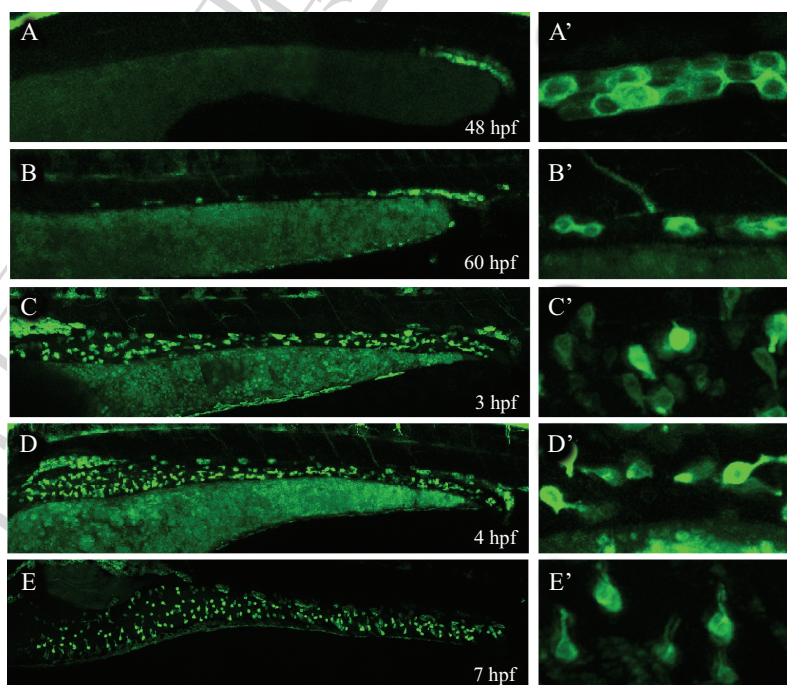


图2 激光共聚焦显微成像分析斑马鱼肠内分泌细胞的形成和极化过程(左栏: 150 $\times$; 右栏: 200 $\times$)

Fig.2 The formation and polarization of enteroendocrine cells analyzed by confocal microscope imaging (left column: 150 $\times$; right column: 200 $\times$)

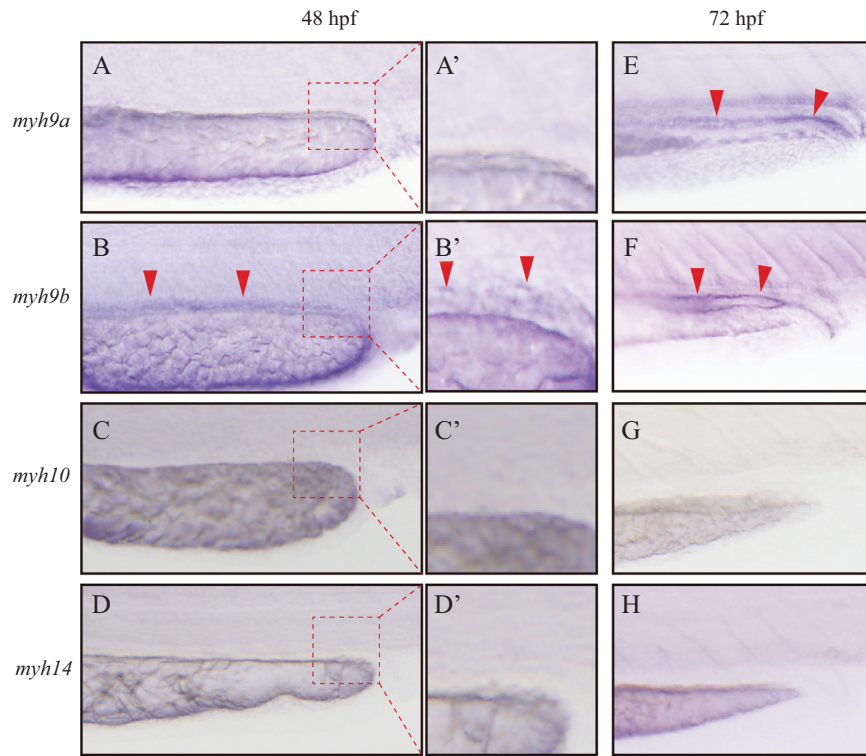
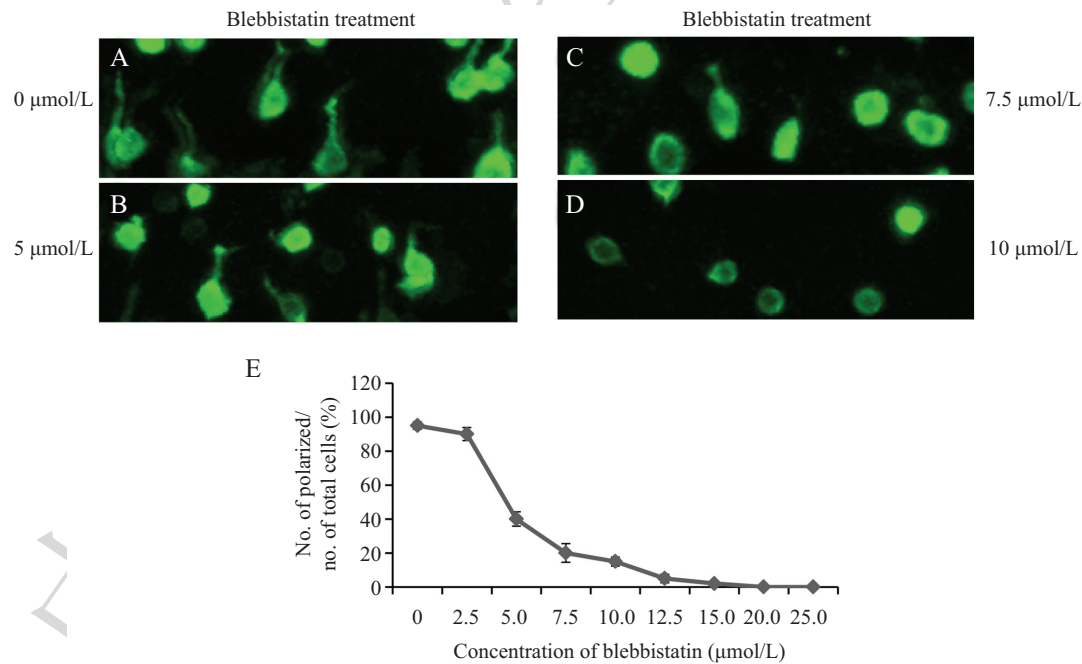


图3 整体原位杂交分析*myh9a*、*myh9b*、*myh10*和*myh14*在肠道上皮细胞的表达(A~H: 60×; A'~D': 100×)

Fig.3 The expression of *myh9a*, *myh9b*, *myh10* and *myh14* in intestinal epithelium analyzed by whole-mount *in situ* hybridization (A~H: 60×; A'~D': 100×)



A: 0 $\mu\text{mol/L}$ 处理组约95%的肠内分泌细胞发生极化(200×); B: 5 $\mu\text{mol/L}$ 处理组约40%的肠内分泌细胞发生极化(200×); C: 7.5 $\mu\text{mol/L}$ 处理组约20%的肠内分泌细胞发生极化(200×); D: 10 $\mu\text{mol/L}$ 处理组约15%的肠内分泌细胞发生极化(200×); E: 不同浓度处理组的肠内分泌细胞极化比例的统计。

A: in 0 $\mu\text{mol/L}$ of blebbistatin treatment group, around 95% enteroendocrine cells polarized (200×); B: in 5 $\mu\text{mol/L}$ of blebbistatin treatment group, around 40% cells polarized (200×); C: in 7.5 $\mu\text{mol/L}$ of blebbistatin treatment group, around 20% cells polarized (200×); D: in 10 $\mu\text{mol/L}$ of blebbistatin treatment group, around 15% cells polarized (200×); E: the statistics of polarized cells in groups treated with blebbistatin at different concentrations.

图4 通过blebbistatin抑制NM II的功能影响肠内分泌细胞的极化呈现剂量依赖效应

Fig.4 Blocking the function of NM II by blebbistatin impaired polarization of enteroendocrine cells at a dose-dependent manner

分泌细胞发生极化(图4B~图4E); 15 $\mu\text{mol/L}$ 处理组约2%发生极化; 20 $\mu\text{mol/L}$ 和25 $\mu\text{mol/L}$ 处理组未观察到肠内分泌细胞发生极化。

3 讨论

本研究中,我们发现斑马鱼肠内分泌细胞形成的关键阶段为48~72 hpf; 极化的关键时期为60~72 hpf。在斑马鱼中NM II有三个亚型,其中NM II-A(Myh9)存在两个拷贝^[18], 其对应的基因分别为*myh9a*、*myh9b*、*myh10*和*myh14*。我们发现,*myh9a*和*myh9b*在肠内分泌细胞极化的关键阶段的肠上皮表达,提示其可能参与调控肠内分泌细胞的极化过程。在60~70 hpf利用不同浓度的NM II功能特异性抑制剂blebbistatin处理*Tg(nkx2.2a:mEGFP)*斑马鱼胚胎,发现blebbistatin可抑制肠内分泌细胞的极化,并呈现剂量依赖效应。

NM II三类亚型的氨基酸序列高度同源^[28],也表现出一些相同的生物化学特性,但是他们在细胞水平以及整体水平又表现出不同的定位和功能特性^[14-15,20]。报道显示,NM II参与调控一系列的细胞行为,包括细胞迁移、细胞间的黏附、细胞形态的改变^[21]。也有研究表明,NM II参与调节上皮细胞的形态形成^[22]。此外,通过blebbistatin介导的NM II功能抑制等实验证明,NM II在体内(*in vivo*)和体外(*in vitro*)还调控一些细胞的极性^[22-25,29],如肺上皮细胞等。本研究结果显示,NM II-A参与了斑马鱼肠内分泌细胞极化的调控。该研究结果进一步证实了NM II家族蛋白参与调控细胞的极化过程。在小鼠胚胎发育的E16.5,NM II-A表达在肠上皮细胞,提示NM II-A可能也参与调控肠内分泌细胞的极化,显示了其功能在脊椎动物进化过程中的保守性。此外,在小鼠胚胎中NM II-C表达在小肠上皮的顶膜上;在斑马鱼5 dpf,我们也发现了*myh14*基因表达在肠上皮(数据未显示),但是,时间点不在胚胎期肠内分泌细胞极化的关键阶段,提示NM II-C不参与胚胎期肠内分泌细胞的极化过程,但可能参与肠上皮细胞极性的维持或其他功能。在将来的工作中,可以进一步条件性敲除小鼠胚胎肠内分泌细胞中的NM II-A,通过遗传学方法来验证NM II-A在肠内分泌细胞极化过程中的调控作用。本文为进一步分析NM II家族在肠上皮内分泌细胞相关疾病中的功能提供了参考依据。

参考文献 (References)

- Gordon JI, Hermiston ML. Differentiation and self-renewal in the mouse gastrointestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6(6): 795-803.
- Sancho E, Batlle E, Clevers H. Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15(6): 763-70.
- Snippert HJ, van der Flier LG, Sato T, van Es JH, van den Born M, Kroon-Veenboer C, *et al.* Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell* 2010; 143(1): 134-44.
- Rehfeld, JF. The new biology of gastrointestinal hormones. *Physiol Rev* 1998; 78(4): 1087-108.
- Solcia E, Capella C, Buffa R, Usellini L, Fiocca R, Frigerio B, *et al.* The diffuse endocrine-paracrine system of the gut in health and disease: Ultrastructural features. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1981; 70: 25-36.
- Chen JN, Haffter P, Odenthal J, Vogelsang E, Brand M, van Eeden FJ, *et al.* Mutations affecting the cardiovascular system and other internal organs in zebrafish. *Development* 1996; 123: 293-302.
- Stainier DY, Fouquet B, Chen JN, Warren KS, Weinstein BM, Meiler SE, *et al.* Mutations affecting the formation and function of the cardiovascular system in the zebrafish embryo. *Development* 1996; 123: 285-92.
- Drummond IA, Majumdar A, Hentschel H, Elger M, Solnica Krezel L, Schier AF, *et al.* Early development of the zebrafish pronephros and analysis of mutations affecting pronephric function. *Development* 1998; 125(23): 4655-67.
- Field HA, Dong PD, Beis D, Stainier DY. Formation of the digestive system in zebrafish. II. Pancreas morphogenesis. *Dev Biol* 2003; 261(1): 197-208.
- Field HA, Ober EA, Roeser T, Stainier DY. Formation of the digestive system in zebrafish. I. Liver morphogenesis. *Dev Biol* 2003; 253(2): 279-90.
- Qi Y, Cai J, Wu Y, Wu R, Lee J. Control of oligodendrocyte differentiation by the Nkx2.2 homeodomain transcription factor. *Development* 2001; 128(14): 2723-33.
- Sussel L, Kalamaras J, Hartigan-O'Connor DJ, Meneses JJ, Pedersen RA, Rubenstein JL, *et al.* Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells. *Development* 1998; 125(12): 2213-21.
- Ng AN, de Jong Curtain TA, Mawdsley DJ, White SJ, Shin J, Appel B, *et al.* Formation of the digestive system in zebrafish: III. Intestinal epithelium morphogenesis. *Dev Biol* 2005; 286(1): 114-35.
- Conti MA, Adelstein RS. Nonmuscle myosin II moves in new directions. *J Cell Sci* 2008; 121(Pt 1): 11-8.
- Bresnick AR. Molecular mechanisms of nonmuscle myosin-II regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11(1): 26-33.
- Krendel M, Mooseker MS. Myosins: Tails (and heads) of functional diversity. *Physiology (Bethesda)* 2005; 20: 239-51.
- Sellers JR. Myosins: A diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1496(1): 3-22.
- Huang Y, Wang X, Wang X, Xu M, Liu M, Liu D, *et al.* Nonmuscle myosin II-B (*myh10*) expression analysis during zebrafish embryonic development. *Gene Expr Patterns* 2013; 13(7): 265-

- 70.
- 19 Wang A, Ma X, Conti MA, Liu C, Kawamoto S, Adelstein RS, *et al.* Nonmuscle myosin II isoform and domain specificity during early mouse development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(33): 14645-50.
- 20 Vicente-Manzanares M, Ma X, Adelstein RS, Horwitz AR. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10(11): 778-90.
- 21 Robinson DN, Spudich JA. Mechanics and regulation of cytokinesis. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16(2): 182-8.
- 22 Plosa EJ, Gooding KA, Zent R, Prince LS. Nonmuscle myosin II regulation of lung epithelial morphology. *Dev Dyn* 2012; 241(11): 1770-81.
- 23 Guo S, Kempfues KJ. A non-muscle myosin required for embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1996; 382(6590): 455-8.
- 24 Phillips HM, Murdoch JN, Chaudhry B, Copp AJ, Henderson DJ. Vangl2 acts via RhoA signaling to regulate polarized cell movements during development of the proximal outflow tract. *Circ Res* 2005; 96(3): 292-9.
- 25 Lee JH, Koh H, Kim M, Kim Y, Lee SY, Karess RE, *et al.* Energy-dependent regulation of cell structure by AMP-activated protein kinase. *Nature* 2007; 447(7147): 1017-20.
- 26 Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 1995; 203(3): 253-310.
- 27 Golomb E, Ma X, Jana SS, Preston YA, Kawamoto S, Shoham NG. Identification and characterization of nonmuscle myosin II-C, a new member of the myosin II family. *J Biol Chem* 2004; 279(4): 2800-8.
- 28 Matsumura F. Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes. *Trends Cell Biol* 2005; 15(7): 371-7.
- 29 Vicente-Manzanares M, Newell-Litwa K, Bachir AI, Whitmore LA, Horwitz AR. Myosin IIA/IIB restrict adhesive and protrusive signaling to generate front-back polarity in migrating cells. *J Cell Biol* 2011; 193(2): 381-96.