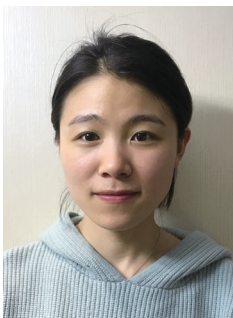




周天华, 浙江大学求是特聘教授、博士生导师, 国家杰出青年科学基金获得者, 国家“万人计划”领军人才入选者。周天华教授长期从事细胞运动与分裂的分子调控及其在消化道癌症发生发展作用中的研究。近年来, 主要结合癌症病人的临床特征, 建立了多种癌症转移的小鼠模型, 在分子、细胞、动物和病理等水平, 系统探索了癌细胞在转移过程中的动态变化及其分子机制, 力图发现干预癌症转移的新靶点和途径。

<https://person.zju.edu.cn/0005005>



谢珊珊, 博士, 浙江大学医学院助理研究员。主要研究方向为纤毛发生的机制及功能和RNA修饰在胃肠道肿瘤发生中的作用及其分子机制。代表性论文发表于*Cell Research*、*FASEB Journal*、*Cell Discovery*和*World Journal of Gastroenterology*等学术期刊上。

<https://person.zju.edu.cn/0618160>

微丝的信号调控机制和体内功能

陆云昆¹ 谢珊珊^{1,2*} 周天华^{1,3*}

¹浙江大学医学院细胞生物学系, 杭州 310058; ²浙江大学医学院附属儿童医院, 杭州 310052;

³浙江大学与多伦多大学联合遗传与基因组医学研究所, 杭州 310058)

摘要 微丝是细胞骨架的主要成分之一, 广泛存在于所有真核细胞中。微丝与其相关蛋白介导的信号通路几乎在所有的生物学事件中发挥重要作用, 参与了细胞形态维持、细胞运动、信号转导等细胞基本生物学行为的调控。同时, 微丝及其相关蛋白还在个体发育中扮演重要角色, 其异常与疾病发生发展过程密切相关。该文就微丝相关蛋白、微丝相关信号通路、微丝功能及其与疾病相关的最新研究进展进行小结, 并对微丝的未来研究方向进行了初步的探讨。

关键词 微丝; 微丝相关蛋白; 细胞形态; 细胞运动; 信号转导; 体内功能

The Signal Regulatory Mechanism and Function of Actin Filaments

Lu Yunkun¹, Xie Shanshan^{1,2*}, Zhou Tianhua^{1,3*}

¹Department of Cell Biology, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China;

²The Children's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310052, China;

³Joint Institute of Genetics and Genomic Medicine between Zhejiang University and University of Toronto, Hangzhou 310058, China)

Abstract Actin filaments are one of the main component of the cytoskeleton, which are widely exist in all eukaryotic cells. Actin filaments and actin-associated proteins-mediated signaling pathways play important roles in

国家自然科学基金项目基金(批准号: 91740205、31620103911、31571446、3180090070)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-88208258, E-mail: tzhou@zju.edu.cn; Tel: 0571-88208257, E-mail: xss891227@163.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.91740205, 31620103911, 31571446, 3180090070)

*Corresponding authors. Tel: +86-571-88208258, E-mail: tzhou@zju.edu.cn; Tel: +86-571-88208257, E-mail: xss891227@163.com

网络出版时间: 2019-04-03 16:23:56

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190403.1623.002.html>

many cellular biological events, including cell morphology maintain, cell motility, signal transduction. Actin filaments and actin-associated proteins also play a key role in development, and their abnormality is associated with disease. In this review, we summarized the latest advance of actin, actin-associated proteins, actin-related signaling pathways and their correlation with diseases. We also preliminarily discussed the future research direction of actin filaments.

Keywords actin filament; actin-associated proteins; cell morphology; cell motility; signal transduction; *in vivo* function

1 微丝

细胞骨架是真核细胞中的三维网络结构,包括微丝(actin filament)、微管(microtubule)和中间丝(intermediate filament)三种结构组分。微丝在细胞生命活动中起到了至关重要的作用,包括细胞形态的维持、细胞运动、细胞内及细胞间信号转导、细胞分裂等。电镜下所观察到的微丝是一条直径约7 nm的扭链式的纤维状结构,呈双股螺旋状,螺距约为36 nm。肌动蛋白是微丝的主要组成成分,在体内有两种存在形式:肌动蛋白单体(G-actin,也称球状肌动蛋白)和由肌动蛋白单体组装而成的纤维状肌动蛋白(F-actin)。其中肌动蛋白单体是一种球形蛋白,分子量约为43 kDa,根据等电点的不同分为 α 、 β 、 γ 三种类型^[1]。在不同种类的细胞中,或者在细胞中的不同部位,不同的微丝结合蛋白使得微丝具有不同的作用,如形成应力纤维、伪足、微绒毛、胞质分裂环等^[2]。

2 微丝相关蛋白

除肌动蛋白外,还有许多其他蛋白参与微丝的结构组成,例如:肌球蛋白(myosin)、肌钙蛋白(troponin)、CapZ(capping actin protein of muscle z-line)等;另外,有许多蛋白参与调控微丝的聚合、形态以及解聚,例如:肌动蛋白相关蛋白2/3复合物(ARP2/3)、胸腺素 β 4(thymosin β 4)、细丝蛋白(filamin)、丝切蛋白(cofilin)等。探索微丝与其相关蛋白之间的相互调控,有助于我们更好地理解微丝的生物功能。

2.1 组装相关蛋白

肌动蛋白单体组装成微丝是一个动态过程,由于微丝具有极性,在正常生理状态下,正端生长迅速,而负端生长缓慢。肌动蛋白具有ATP酶活性,微丝正端的肌动蛋白单体多与ATP结合,较为稳定,因此微丝正端可以持续组装肌动蛋白单体从而不断延长;而微丝负端的肌动蛋白单体则多数与ADP结合,

较为不稳定,则容易发生解离^[3]。

微丝在组装起始阶段,胸腺素 β 4与肌动蛋白单体结合,抑制肌动蛋白单体参与微丝负极的组装(图1A)。胸腺素 β 4可以通过抑制cofilin的活性从而抑制微丝解聚和重排^[4]。前纤维蛋白(profilin)与肌动蛋白ADP单体结合,催化ADP向ATP的转变,维持细胞内一定数量的肌动蛋白ATP单体,促进了微丝正极的组装,但阻断了微丝负极的组装,加速了微丝的生长速度,保证了微丝组装过程的稳态^[5-6]。

同时,profilin与胸腺素 β 4对肌动蛋白单体结合ATP或者ADP而产生的不同构象十分敏感,微丝在延长的过程中,profilin与胸腺素 β 4会通过改变其蛋白结构,加强或者减弱对肌动蛋白单体的结合能力,从而保证微丝的顺利组装^[7]。微丝的组装需要经过“核化”,即几个肌动蛋白单体先聚合成“核”,形成寡聚体,然后再与其他单体结合形成更大的多聚体,进而开始微丝的组装。在成核的过程中,形成蛋白(formin)的FH1结构域与profilin结合,FH2结构域与肌动蛋白单体结合,从而促使微丝的组装(图1B)。

肌动蛋白成核促进因子ARP2/3复合物被WASP(Wiskott-Aldrich syndrome proteins)激活后能结合于微丝的一端(以后形成微丝正端),调节微丝形成树枝状聚合,然后继续延伸,在细胞内形成复杂的微丝网^[8](图1C)。最近研究发现,中心体也可以直接促进微丝组装,中心体上的PCM1(pericentriolar material 1)可以通过招募细胞内ARP2/3复合物与WASH(Wiskott-Aldrich syndrome protein family homolog complex)到中心体上,促使肌动蛋白单体成核组装成微丝。因此,有人也将中心体称为细胞内的“微丝组织中心”(actin-organizing center)^[9]。

2.2 加帽蛋白

加帽蛋白(capping protein)主要包括原肌球蛋白(tropomodulin)、CapZ或凝溶胶蛋白(gelsolin)超家族等。在微丝组装完毕后,微丝末端的肌动蛋白

单体上的ATP很可能继续发生水解, 从而使得整根微丝处于不稳定的状态。因此, 在微丝的长度达到动态平衡后, 微丝的正负两端会分别与不同的加帽蛋白结合(图1D), 阻止肌动蛋白单体的继续添加或者丢失。另外, 加帽蛋白也可以通过自身改变构象, 使得微丝发生解聚或者重新组装, 从而促使细胞运动^[2]。在体外肌动蛋白组装时, 加帽蛋白是ARP2/3复合物所介导的肌动蛋白成核所必需的^[10]。

2.3 交联蛋白

微丝在细胞内排列方式主要有2种: 束状排列和网状排列, 微丝的排列方式主要由微丝交联蛋白的种类决定, 根据不同的功能需求, 微丝在不同的时间与空间排列成不同的类型(图1E)。成束蛋白(bundling proteins)将微丝束组合成平行排列, 而凝胶形成

蛋白(gel-forming proteins)将微丝连接成网状。其中丝束蛋白(fimbrin, 又称毛缘蛋白)是一种典型的成束蛋白, 主要存在于细胞前端的丝状伪足中, 丝束蛋白横向连接的微丝束排列较为紧密, 在内吞膜泡的形成、胞质分裂环的形成和裂殖酵母细胞极性的维持中起到了很重要作用^[11]。 α -辅肌动蛋白(α -actinin)是另一种微丝成束蛋白, 主要存在于应力纤维中, 与丝束蛋白相比, 成束后的微丝之间的距离较大。

2.4 切割/解聚蛋白

在细胞迁移等过程中, 细胞往往需要快速解聚细胞内某块区域的微丝, 这时候就需要微丝切割/解聚蛋白。肌动蛋白解聚因子(ADF)/cofilin家族是一类常见的介导微丝解聚的蛋白, 可以结合肌动蛋白ADP单体, 阻止其向肌动蛋白ATP单体转化, 抑制肌

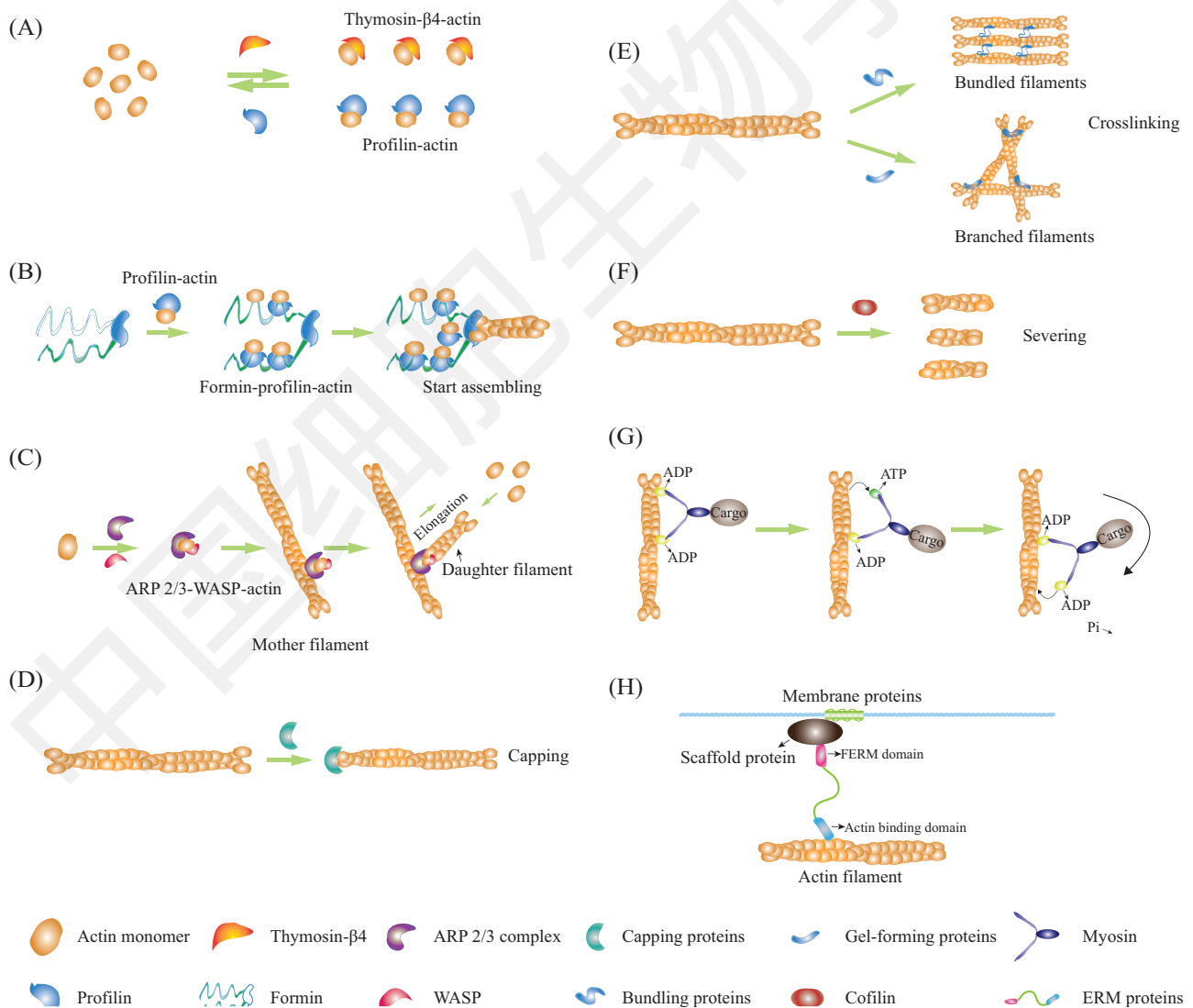


图1 微丝相关蛋白

Fig.1 Actin-associated proteins

动蛋白单体的组装^[12]。另外, ADF/cofilin结合F-actin的正端, 加快微丝上肌动蛋白单体的解离速率, 实现对F-actin的切割(图1F)。ADF/cofilin主要位于细胞前端, 降解微丝并提供新的微丝生长所需的G-actin, 对于细胞运动以及细胞迁移十分重要^[6]。我们实验室先前的研究发现, NUDC(nuclear distribution C)可以通过结合并稳定cofilin 1, 促进片状伪足的形成, 进而参与纤毛生长的调控^[13]。

2.5 分子马达蛋白

肌球蛋白(myosin)是肌肉中肌原纤维的主要组成蛋白, 通过水解ATP产生能量在微丝上运动并且为肌肉收缩提供力^[14]。myosin与微丝之间的相互作用产生两种类型的运动。首先, myosin作为细胞骨架的主要“分子马达”之一, 可以携带蛋白或RNA等大分子或分泌小泡在短距离内沿着微丝运动, 运输这些“货物”到相应位置^[15](图1G)。其次, 当微丝束成反向平行排列时, myosin可以选择性地收缩或者分解一些微丝, 调整微丝网络的结构, 使细胞内不同位置的微丝网络保持动态稳定, 从而控制细胞的形态和运动能力^[16]。

2.6 ERM蛋白

ERM蛋白家族主要由埃兹蛋白(ezrin)、根蛋白(radixin)和膜突蛋白(moesin)三种蛋白组成。ERM蛋白家族均有一个FERM结构域, 可以与膜蛋白或者支架蛋白结合, 同时它们的C-端均有肌动蛋白的结合位点。ERM蛋白通过支架蛋白把微丝与膜蛋白连接在一起, 是构成上皮结构的重要组成部分(图1H)。在细胞皮层的维持中, ERM蛋白为微管和微丝之间的复杂相互作用提供了一个良好的分子框架^[17]。RhoA可以激活ERM蛋白, 使细胞皮层内的微丝重新排列, 促进微丝与质膜之间的稳定相互作用^[18]。

3 微丝相关信号通路

微丝的组装与解聚会受到许多信号通路的影响, 同时微丝也参与调控许多信号通路, 微丝的动态变化通过这些信号通路直接或间接地影响着多种细胞内的生命活动。

Rho/ROCK信号通路是调控细胞增殖和组织分化的重要信号通路之一, 在胞内各种信号的刺激下, 通过激酶级联反应, 参与了细胞迁移、黏附、应力纤维的形成与延伸、伪足的形成等微丝介导的生物学过程^[19]。例如, Rho可以通过mDia(diaphanous re-

lated formin)促进G-actin组装成F-actin, 而且ROCK1可以通过影响下游的LIMK(LIM domain kinase)导致cofilin被磷酸化, 从而抑制F-actin的解聚, 促使应力纤维的形成^[20]。在气道平滑肌中, ROCK也可以活化PAK与CDC42, 进一步调节肌动蛋白的聚合与微丝的收缩^[21](图2A)。另外有研究发现, 许多Rho GTP酶都可以通过调控其下游的蛋白RIT1(Ras like without CAAX 1)^[22]或者TGF- β /Smad信号通路^[23], 进而影响微丝的动态组装。

MAPK信号通路是信号从细胞表面传递到细胞核内的重要传递者之一, MAPK信号通路可以通过引起微丝的重排, 从而作为多种信号的传递中心, 调节细胞生命活动。胞外机械信号可以使p38-MAPK通路激活, 导致热休克蛋白HSPB1(HSP25/27)的磷酸化, 使HSPB1在微丝中聚集, 影响肌动蛋白的重塑以及细胞迁移^[24]。在间充质细胞向骨骼肌细胞分化时, 肌动蛋白组装如果受到抑制, 则会通过减少p38 MAPK的磷酸化来阻止分化过程^[25]。ERK也可以促使ARP2/3聚集到细胞前端, 加快肌动蛋白聚合的速率, 在细胞运动中为细胞前端的伪足的维持提供动力^[26](图2A)。

PI3K/AKT信号通路是生命体内调控代谢、生长、增殖、转录以及蛋白质合成等多种细胞功能的信号通路之一。它也可以通过调控微丝, 影响细胞迁移, 在迁移的细胞中, PI3K与其活化产物PI(3,4,5)P3作用于RacGEFs(Rac鸟嘌呤交换因子)激活Rac, 使得活化后的Rac蛋白富集在细胞迁移的方向, 并进一步加强PI3K与WASP的活性, 促使actin聚合从而促进细胞迁移^[27], 并且AKT同时也可以激活PAK促使myosin聚合(图2B)。RAB35-p85/PI3K可以使actin移动到细胞前端, 参与形成与迁移有关的突起状结构, 对细胞迁移非常重要^[28]。PI3K与Rho/ROCK可以抑制黏着斑激酶FAK的磷酸化, 从而使得细胞黏着斑消失、肌动蛋白应力纤维生成, 进而抑制RPE细胞的迁移^[29]。

经典的Wnt/ β -catenin信号通路中关键蛋白APC(adenomatous polyposis coli tumor suppressor)也可以调节微丝网络, APC在结直肠肿瘤细胞中存在着截短突变, 从而可以激活Asef(Rac1特异性鸟嘌呤核苷酸交换因子)影响正常的微丝结构, 导致细胞迁移异常, 促进腺瘤形成及恶性肿瘤的发展(图2C)^[30]。而非经典的Wnt/ Ca^{2+} 信号通路也与微丝有着密切关

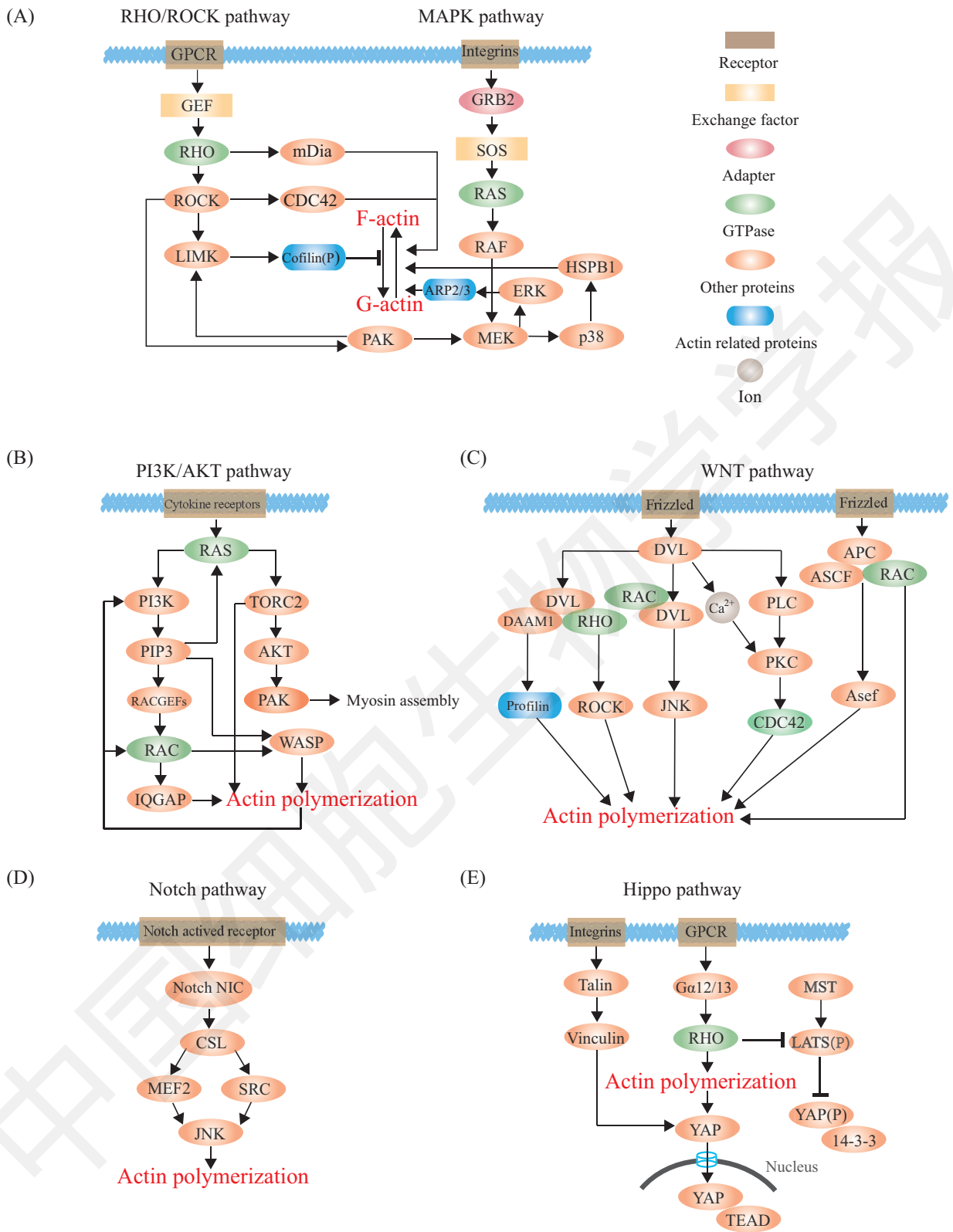


图2 微丝相关信号通路
 Fig.2 Actin-related signaling pathways

系, 在前列腺癌细胞中, 下调CaMKII(钙调蛋白依赖性蛋白激酶)引起微丝的重塑, 导致丝状伪足变长, 细胞运动能力降低^[31]。无论是经典的和非经典的

Wnt信号通路, 均可以通过DVL(dishevelled)蛋白影响Rho/ROCK信号通路引起微丝的重塑, 进而诱导损伤后轴突生长(图2C)^[32]。

Notch信号通路主要是通过相邻细胞之间的通讯而调控细胞发育、决定细胞命运、影响器官形成和形态发生等,在接收到相邻细胞的信号后,靶细胞中的Notch信号通路可以通过作用于细胞内的CSL(suppressor of hairless, DNA binding protein),进而作用于MEF2(myocyte enhancer factor 2)与SRC(SRC proto-oncogene),最终激活JNK来调节微丝的组装(图2D)。

Hippo信号通路是生物体内器官大小和体积的主要调控通路之一,目前有研究显示,微丝是Hippo信号传导的关键介质,细胞内与紧密连接相关的微丝可以负向调节YAP活性,而与黏着斑相关的应力纤维则可以促进YAP核内富集^[33]。该研究通过GPCR或通过局部黏连的机械刺激激活Rho GTP酶促进肌动蛋白装配与YAP核定位(图2E)。应力纤维还可以通过改变细胞形态来调节YAP蛋白的磷酸化^[34]。YAP蛋白也可以反过来影响微丝的稳定性,有研究显示,YAP可以促进ARHGAP29(Rho GTP酶活化蛋白29)的表达而抑制RhoA-LIMK-cofilin通路,使微丝结构不稳定,而且YAP的过度表达会导致微丝组装稳态发生改变,引起细胞骨架重排,从而促进细胞迁移^[35]。

4 微丝的主要功能

微丝与其相关调控蛋白等构成的细胞内复杂的细胞骨架网络,参与生命体内绝大部分生物行为。微丝在细胞形态的维持与改变、细胞运动与迁移、细胞核中信号转导等方面发挥着重要的作用,同时也参与组织形态发生与个体发育及相关疾病的发生发展过程。

4.1 微丝对细胞行为的调控

4.1.1 微丝与细胞形态 细胞形态的精确控制改变是细胞迁移、分裂、分化和组织形态发生的关键。在动物细胞中,细胞形状变化主要由细胞皮层驱动,细胞皮层是直接位于质膜下方的一层薄微丝网络,微丝产生的力在细胞皮层中产生张力,导致细胞形态发生改变^[36]。微丝的长度、极性以及空间结构都是影响细胞皮层组织与维持的关键因素,细胞接收到外界信号刺激时,可以通过myosin II调节胞内微丝的分布,使皮层肌动蛋白发生翻转而产生收缩张力,此时formin被招募到该区域内结合在微丝上使微丝发生结构变化,导致细胞形态发生变化

从而继续传递胞外信号^[37]。另外,细胞皮层张力也是导致细胞极性的主要原因之一,在果蝇神经细胞中,myosin II使得胞内肌动蛋白不对称分布,细胞皮层内的微丝通过PKN(protein kinase N)使极性蛋白INSC(incuteable)富集于细胞顶端,从而导致细胞极性的产生^[38]。

ERM蛋白通过磷酸化活化后,连接细胞质膜与微丝,这是维持细胞极性所必需的,同时ERM蛋白也可以把微绒毛尖端与细胞顶部用微丝连接起来,通过与PI(4,5)P2和定位于细胞顶部的ezrin激酶LOK(lymphocyte-oriented kinase)、SLK(ste20-like kinase)相互作用从而构成稳定的微绒毛结构^[39]。微丝还在许多细胞类型中与胞吞胞吐密切相关,皮层肌动蛋白与肌球蛋白控制细胞形态改变的同时也为囊泡提供支架,而且,在胞吞胞吐过程中,肌球蛋白网络为囊泡的运动提供动力,同时也可以作为屏障阻挡一些蛋白的通过,反过来调节胞吞胞吐。当刺激胞吞胞吐作用或化学信号诱导的微丝解聚破坏了这种屏障时,肌球蛋白网络会发生重塑进而促进囊泡内容物的进入或排出^[40-41]。

4.1.2 微丝与细胞运动/迁移 在细胞运动过程中,微丝是构成运动细胞板状伪足最主要的结构骨架,并且黏着带与黏着斑是细胞外基质与细胞中微丝所形成的应力纤维的物理连接。多根微丝的协同聚合可以产生一个细胞表面突出的作用力,驱动细胞前缘处质膜的延伸形成伪足,促进细胞的运动。

微丝与其相关蛋白的相互作用是细胞中主要产生力的主要方式之一,主要是通过myosin II沿着微丝滑动的过程中微丝网络的动态改变所产生的机械力来形成细胞运动的推动力,这对于细胞迁移特别重要,并且也可以改变细胞形状^[42]。Rho蛋白可以通过ROCK抑制myosin磷酸酶的活性,从而稳定myosin II,引起迁移细胞中的细胞尾部的收缩^[43]。另外,在细胞迁移中,肌动蛋白会沿着迁移的轨迹在细胞内发生流动,这种肌动蛋白的流动被确定为细胞极性的关键调节剂。这表明,各种观察到的细胞迁移模式是基于微丝结构的连续动态变化的体现^[44]。

4.1.3 微丝与细胞核 越来越多的证据表明,微丝存在于细胞核内,并参与调控许多细胞核的生物学过程,包括转录调控、染色质重塑、DNA修复、pre-mRNA修饰与运输及核内外信号转导等^[45-47]。细胞核内微丝浓度主要受importin9和exportin6调

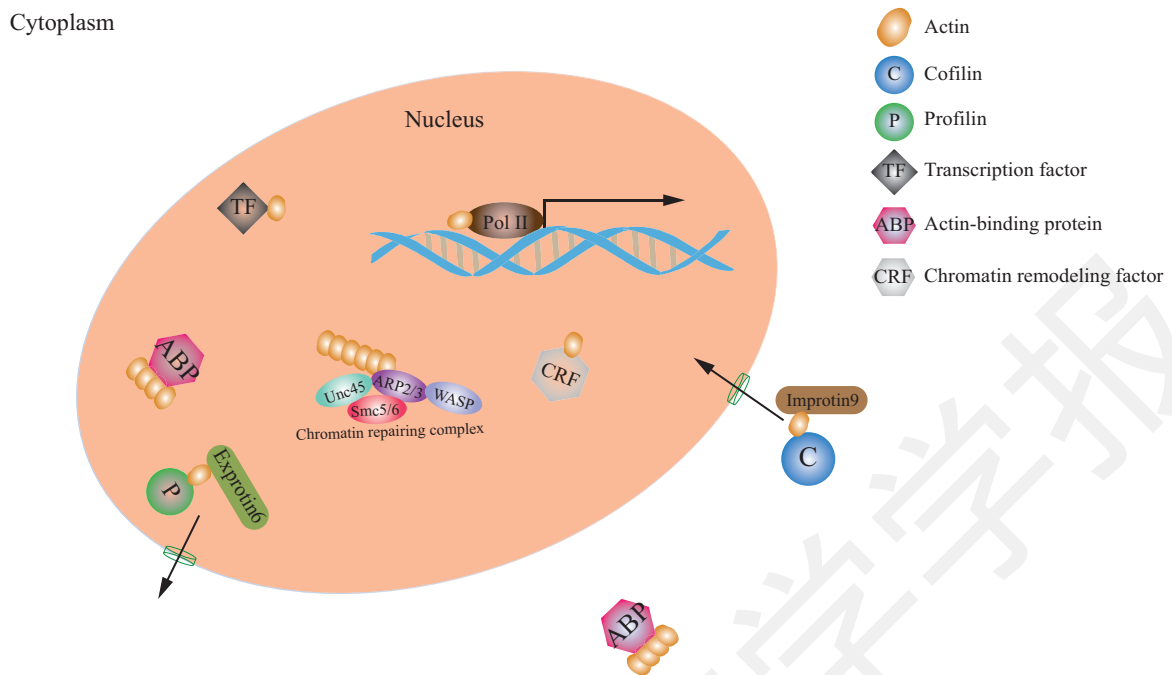


图3 肌动蛋白在细胞核内的功能
Fig.3 Functions of actin in nucleus

控, 其中exportin6把profilin-actin多聚体运输到细胞质中, 相反地, importin9把胞质中的cofilin-actin转运到细胞核内。同时, 核内存在多于30种的微丝结合蛋白参与调节G-actin和F-actin之间的动态转化。核内微丝通过不同的存在形式和不同的浓度, 参与并影响了许多核内生物学事件。比如, 在转录延伸过程中, 微丝分别与RNA聚合酶复合物的C-端结构域、异构核糖核蛋白(hnRNPs)、组蛋白乙酰转移酶PCAF结合。另外, 人们发现, 微丝存在于多种染色体重塑复合物(如BAF、INO80和SWR1复合物)和组蛋白修饰复合物(NuA4和HDACs)中(图3)。

另外, 微丝通过结合转录调控因子而影响其转录活性^[45]。在细胞核中, G-actin、WASP和ARP2/3被招募到受损染色质处参与同源定向修复^[46]。同时, ARP2/3被SMC5/6(structural maintenance of chromosomes 5/6)和肌球蛋白活化剂UNC45(unc-45 myosin chaperone)招募到染色质修复位点, 组装F-actin构成染色质修复复合物, 参与DNA修复^[47](图3)。

4.1.4 微丝在细胞内的其他功能 微丝在细胞内还有许多其他功能。在胞质分裂过程中, myosin II可以通过将微丝拉在一起而产生收缩, 从而形成胞质分裂环, 将母细胞分成两个子细胞。微丝的动态组装可以同钙黏蛋白(cadherin)与连环蛋白(catenin)

复合物通过多种途径调控细胞之间的通讯连接^[48-50], 微丝同样在细胞内本身可以作为感应外界机械力的传感器, 通过改变自身及相关蛋白的构象对细胞所受到的机械力做出相应的反应, 引起胞内相应信号转导^[51]。近期有研究发现, 肌动蛋白可以和细胞膜上糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定蛋白结合影响其扩散, 而在以前温度被认为是影响细胞表面蛋白扩散的主要因素。在细胞中当肌动蛋白成核剂formin被抑制时, GPI锚定蛋白的扩散才变得主要与温度有关, 然而抑制肌动蛋白成核剂Arp2/3的活性则没有太大影响^[52]。并且微丝在胞内物质转运分泌到胞外的过程中作用于内质网、高尔基体等常见细胞器上, 产生相应的作用力, 促进膜泡运动^[53]。微丝还在细胞自噬中起到了重要作用^[54], 有研究观察到微丝与重要的自噬标记物有共定位^[55-56], 并且细胞自噬与肌动蛋白的动态组装也密切相关, 当控制肌动蛋白动态组装的蛋白表达降低时, 将会阻止自噬体形成^[57]。

4.2 微丝在个体发育和疾病中的作用

4.2.1 微丝与发育 生物从受精卵发育成成熟个体是一个复杂的演变过程, 其中包括细胞分裂、迁移、分化、凋亡及组织与器官的形成等, 微丝在这些过程中都发挥重要作用。在早期胚胎细胞中, 细胞极性是胚胎发育过程中一个重要的驱动因素, 胚

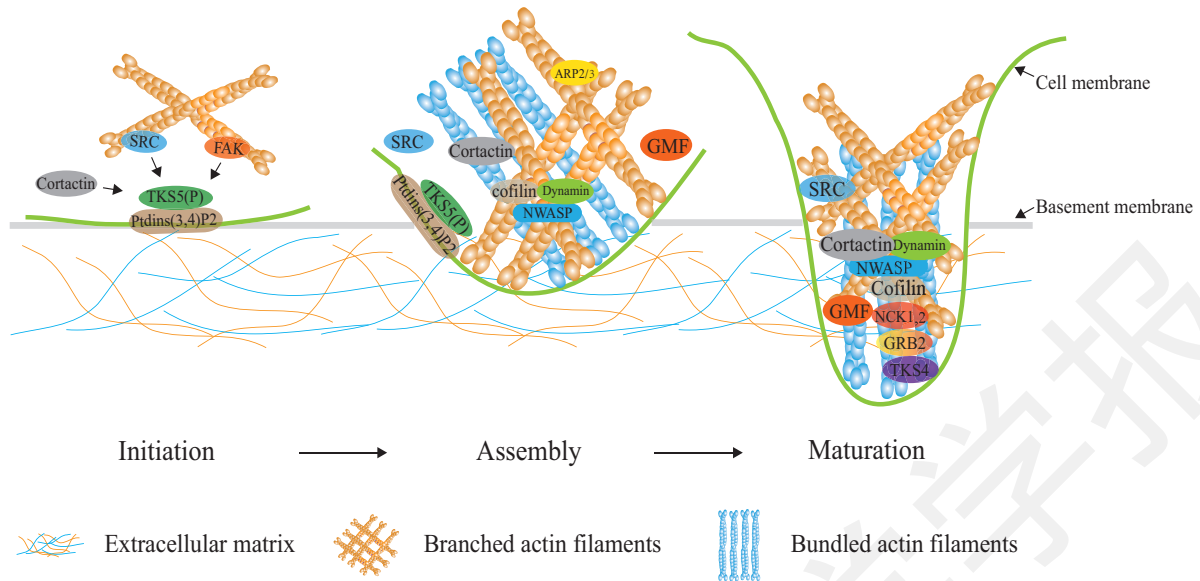


图4 侵入性伪足示意图

Fig.4 The schematic diagram of invadopodia

胎细胞的极性可以分为细胞质极性和表面极性, 当用细胞松弛素D(微丝抑制剂)处理胚胎细胞时, 细胞的表面极性被抑制, 当细胞松弛素D与nocadazol(微管抑制剂)一同使用时, 细胞的细胞质极性被抑制, 说明微丝乃至整个细胞骨架系统在胚胎细胞的极性形成中起着重要作用, 当微丝被抑制组装导致细胞的极性分布紊乱时, 将会影响桑椹胚的分化, 从而严重影响胚胎发育^[58]。在哺乳动物卵母细胞成熟与卵细胞受精的过程中, 减数分裂器的定位、减数分裂器位置形态转变、极体的形成、第二极体的形成、受精锥的形成等步骤都高度依赖于完整的微丝网络^[59-61]。在伤口的愈合过程中, 需要肌动蛋白及其调节蛋白介导的内吞作用来修复伤口边缘加以闭合伤口^[62]。

在器官形成的过程中, 肌动蛋白单体或者微丝也起到了重要作用。例如在中枢神经系统的发育和衰老过程中, actin所参与的信号通路对髓鞘膜的维持非常重要^[63]。在小鼠胚胎心室隔膜和瓣膜形成过程中, 内皮细胞和血管平滑肌细胞的标志物SMA(smooth muscle α -actin)同促进胚胎细胞定向分化的纤连蛋白(fibronectin)及其受体在时间与空间上均有表达相关性, 而且在小鼠肺部发育中也有类似现象^[64]。在心血管发育中, Jagged1-Notch相互作用可通过诱导内皮与间充质相互转化而参与心内膜垫形成。Notch通过激活其主要效应物CSL而直接诱

导SMA的表达, 活化血管平滑肌细胞中的 α -actin^[65]。在果蝇翅膀背腹分区的分化发育过程中, Notch信号通路通过影响肌动蛋白结合蛋白capulet来调节F-actin的组装, 在边界细胞中形成大量的特异微丝, 在分区上形成明显的隔离带^[66]。而在果蝇机体发育过程中, 加帽蛋白CPA/CPB异二聚体可以通过抑制Hippo信号通路下游效应因子Yorkie的活性来抑制果蝇翅膀的错误生长^[67], 而且加帽蛋白的缺失会造成F-actin的生成紊乱, 诱导果蝇成虫盘的过度生长^[68]。

4.2.2 微丝与疾病 微丝几乎参与所有细胞活动, 微丝发生异常变化可能会导致许多人类疾病和肿瘤的发生。研究发现, 在骨关节炎(osteoarthritis, OA)病人的软骨细胞中, 微丝分布更为散乱无序, 细胞的形态也发生了明显变化, 因此认为微丝组装紊乱是导致骨关节炎的原因之一^[69]。

在肿瘤细胞中, 侵入性伪足(invadopodia)是一种基于肌动蛋白的细胞膜表面突起性结构, 可以在局部分泌蛋白酶降解细胞外基质, 使得肿瘤细胞能够穿透基底膜^[70-71](图4)。与片状伪足不同, 侵入性伪足的前端除了有丰富的分支状F-actin外, 还有大量特有的蛋白, 在形成初期, 细胞膜上的磷酸肌醇PtdIns(3,4)P2与磷酸化的酪氨酸激酶底物TKS5会招募附近的皮层肌动蛋白(cortactin)、SRC和黏着斑激酶(FAK); 接着侵入性伪足膜表面能够释放降解细胞外基质(ECM)的酶, 同时cortactin与胶质成熟因子

(glial maturation factor, GMF)会把附近的肌动蛋白单体及微丝聚集过来,由cofilin、发动蛋白(dynamin)以及NWASP快速地切割重组微丝,促使在此区域形成特定的紧密微丝网络,由分支状微丝负责支撑伪足的结构,束状微丝在NCK1/2(NCK adaptor protein 1/2)、GRB2(growth factor receptor bound protein 2)与TKS4(tyrosine kinase substrate with four SH3 domains)的帮助下继续向前延伸,形成稳定的伪足结构^[72-73]。在乳腺癌中,肌动蛋白相关蛋白ARP2与WAVE2(WASP family verproline-homologous protein 2)有共表达现象,影响微丝的结构,使伪足增多,细胞运动能力增强,与乳腺浸润性导管癌细胞的侵袭性密切相关,因此可以作为浸润性乳腺癌预后检测的指标之一^[74]。微丝成束蛋白fascin被抑制后,能够阻断丝状伪足的生成^[75],让肿瘤细胞的细胞核运动和变形能力降低^[76],从而抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭。在肿瘤细胞中,actin和actin相关蛋白在细胞核中积累,可能通过调节基因表达影响上皮-间充质或间充质-上皮转变,这是影响癌症转移的另一个可能因素^[77]。最近发现,actin相关蛋白与外泌体之间的关系密切,有研究显示,微丝骨架调节蛋白cortactin可以促进外泌体分泌。癌细胞中cortactin的敲低或过表达会导致外泌体分泌的相应减少或增加,cortactin被敲低时,同样会抑制肿瘤细胞的侵袭能力^[73]。

5 微丝相关研究的展望

迄今为止,微丝结构、功能以及与其他细胞内组分的相互关系已经有了许多研究,但仍有很多问题亟待解决。比如,微丝在细胞皮层内形成的网络结构为细胞形态变化提供张力,在细胞内可以形成应力纤维,这两种不同类型的网络使微丝在细胞功能中发挥不同作用,但是这两种网络之间的转化和调控的具体机制还不清楚。对于微丝在发育和疾病中作用的研究,多关注在微丝本身的功能,而高度动态的微丝介导的不同形式的网络结构(如细胞皮层的张力硬度变化、应力纤维的结构变化)在发育和疾病中有什么作用呢?近年来,物理力学在生物学行为中被发现发挥重要作用,那微丝伪足是否可以感受或形成力?细胞外环境的硬度是否影响皮层内的微丝骨架构象和功能呢?因此,结合新技术新方法,进一步研究微丝的动态调节和分子调控机制,

有助于我们阐明微丝的功能。比如,利用CRISPR/Cas9基因编辑技术可以在细胞或整体动物水平敲除微丝及其相关蛋白,为微丝功能的研究提供了简单高效的方法。例如:可以建立高通量功能基因组学的CRISPR/Cas9文库^[78],寻找特定生物学事件中调控微丝的关键蛋白;可以用CRISPR/Cas系统对活细胞内actin或其相关蛋白在基因组上的位置进行动态成像^[79],观察微丝在核内对染色体的调控;通过最新的CRISPR-GO技术^[80],把actin或actin相关蛋白的DNA片段放置在细胞核中的新位置上,改变它们的运作方式,或许可以找到微丝及相关蛋白的一些新的组合功能。

近年来,由于科学的快速发展,科学家们已经能在实验室利用细胞培育、分化、自组装成各种类似人体组织的3D结构,制造出肝脏、胰脏、胃、心脏和肾脏等在内的各种类器官(organoid)。基于类器官的技术,通过荧光标记actin并结合显微技术,我们可以在体外研究微丝在整体器官水平的功能和分子调控机制^[81]。

随着显微镜技术的应用发展,我们也可以更清晰地观察微丝及其相互作用蛋白的超微结构。有学者发现,利用结构化照明显微镜(structured illumination microscopy)可以通过对核孔和肌动蛋白细胞骨架成像来观察哺乳动物细胞结构,发现了细胞中myosin IIA和F-actin之间精确的相互作用模式,并且获得了数十个时间点的双色4D超分辨率图像^[82]。同时,利用基于荧光观察的随机光学重建显微镜STORM(stochastic optical reconstruction microscopy)可以观察细胞中的单根微丝的三维超微结构。有研究在片状细胞突起中观察到两个垂直分离的微丝网络层,具有完全不同的组织结构^[83],而且另外有研究通过STORM观察到加帽蛋白adducin与actin在细胞内共定位,血影收缩蛋白(spectrin)与actin和adducin形成了交替的周期性结构,是神经细胞生长与突触结构稳定非常重要的因素之一^[84]。也有学者利用全内角反射荧光显微镜TIRF(total internal reflection fluorescence microscope)对微丝的聚合进行了实时观测,精确计算了微丝正极与负极上actin单体的结合/解离速度常数^[85],并且通过光电关联显微镜CLEM(correlative light and electron microscopy) 3D断层扫描重建,清楚地揭示了微管和密集的微丝网络之间复杂的相互作用,这些特征在相应的2D电子

显微镜图像中几乎不可见。

除了实验方法和显微技术外, 数学与计算机的方法也可以运用在微丝的网络构建研究中, 对于微丝组装而成的不同的几何动态网络构建, 以及微丝在不同细胞部位的未知功能推测, 数学建模将是有效的手段之一, 对不同时间与空间的微丝结构进行算法拟合, 能够更精准地研究微丝尚未发现的结构和功能, 甚至能结合显微镜技术预测细胞内一段微丝的未来走向趋势。例如, 可以用数学模型来预测微丝的重组模式^[86], 或者在裂殖酵母内吞行为过程中构建微丝的动力学模型^[87]等, 这些都能帮助研究者更快捷方便地研究微丝。

参考文献 (References)

- 1 Small JV, Stradal T, Vignall E, Rottner K. The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol* 2002; 12(3): 112-20.
- 2 Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments *Cell* 2003; 112(4): 453-65.
- 3 Bamburg JR, Wiggan ONP. ADF/cofilin and actin dynamics in disease. *Trends Cell Biol* 2002; 12(12): 598-605.
- 4 Kim S, Kwon J. Actin cytoskeletal rearrangement and dysfunction due to activation of the receptor for advanced glycation end products is inhibited by thymosin beta 4. *J Physiol* 2015; 593(8): 1873-86.
- 5 Suarez C, Carroll RT, Burke TA, Christensen JR, Bestul AJ, Sees JA, *et al.* Profilin regulates F-actin network homeostasis by favoring formin over Arp2/3 complex. *Dev Cell* 2015; 32(1): 43-53.
- 6 Dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, *et al.* Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev* 2003; 83(2): 433-73.
- 7 Xue B, Leyrat C, Grimes JM, Robinson RC. Structural basis of thymosin- β 4/profilin exchange leading to actin filament polymerization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(43): 4596-605.
- 8 Mullins RD, Heuser JA, Pollard TD. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(11): 6181-6.
- 9 Farina F, Gaillard J, Guérin C, Couté Y, Sillibourne J, Blanchoin L, *et al.* The centrosome is an actin-organizing center. *Nat Cell Biol* 2016; 18: 65-75.
- 10 Loisel TP, Boujemaa R, Pantaloni D, *et al.* Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* 1999; 401(6753): 613-6.
- 11 Skau CT, Courson DS, Bestul AJ, Carlier MF. Actin filament bundling by fimbrin is important for endocytosis, cytokinesis, and polarization in fission yeast. *J Biol Chem* 2011; 286: 26964-977.
- 12 Bamburg JR, Wiggan OP. ADF/cofilin and actin dynamics in disease. *Trends Cell Biol* 2003; 12(12): 598-605.
- 13 Zhang C, Zhang W, Lu Y, Yan X, Yan X, Zhu X, *et al.* NudC regulates actin dynamics and ciliogenesis by stabilizing cofilin 1. *Cell Res* 2015; 26: 239-53.
- 14 Richards TA, Cavaliersmith T. Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes. *Nature* 2005; 436(7054): 1113-8.
- 15 Fagarasanu A, Rachubinski RA. Orchestrating organelle inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Microbiol* 2007; 10(6): 528-38.
- 16 Reyman AC, Blanchoin L. Actin network architecture can determine myosin motor activity. *Science* 2012; 336(6086): 1310-4.
- 17 Solinet S, Mahmud K, Stewman SF, Ben El Kadhi K, Decelle B, Talje L, *et al.* The actin-binding ERM protein moesin binds to and stabilizes microtubules at the cell cortex. *J Cell Biol* 2013; 202(2): 251-60.
- 18 Aoki K, Maeda F, Nagasako T, Mochizuki Y, Uchida S, Ikenouchi J. A RhoA and Rnd3 cycle regulates actin reassembly during membrane blebbing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016; 113(13): E1863-71.
- 19 Wojciak-Stothard B, Ridley AJ. Rho GTPases and the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol* 2002; 39(4): 187-99.
- 20 Amano M, Nakayama M, Kaibuchi K. Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton* 2010; 67(9): 545-54.
- 21 Zhang W, Bhetwal BP, Gunst SJ. Rho Kinase (ROCK) collaborates with pak to regulate actin polymerization and contraction in airway smooth muscle. *J Physiol* 2018; 596(16): 3617-35.
- 22 Meyer Zum Buschenfelde U, Brandenstein LI, von Elsner L, Flato K, Holling T, Zenker M, *et al.* RIT1 controls actin dynamics via complex formation with RAC1/CDC42 and PAK1. *PLoS Genet* 2018; 14(5): e1007370.
- 23 Livitsanou M, Vasilaki E, Stourmaras C, Kardassis D. Modulation of TGF β /Smad signaling by the small GTPase RhoB. *Cell Signal* 2018; 48: 54-63.
- 24 Hoffman L, Jensen CC, Yoshigi M, Beckerle M. Mechanical signals activate p38 MAPK pathway-dependent reinforcement of actin via mechanosensitive HspB1. *Mol Biol Cell* 2017; 28(20): 2661-75.
- 25 Himangshu S, Atul K, Jina B, Gogoi PK, Jaganathan BG. Inhibition of actin polymerization decreases osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through p38 MAPK pathway. *J Biomed Sci* 2013; 20(1): 71.
- 26 Mendoza MC, Vilela M, Juarez JE, Blenis J, Danuser G. ERK reinforces actin polymerization to power persistent edge protrusion during motility. *Sci Signal* 2015; 8(377): ra47.
- 27 Ballestrem C, Wehrlechner B, Hinz B, Imhof BA. Actin-dependent lamellipodia formation and microtubule-dependent tail retraction control-directed cell migration. *Mol Biol Cell* 2000; 11(9): 2999-3012.
- 28 Corallino S, Malinverno C, Neumann B, Tischer C, Palamidessi A, Frittoli E, *et al.* Author correction: A RAB35-p85/PI3K axis controls oscillatory apical protrusions required for efficient chemotactic migration. *Nat Commun* 2018; 9(1): 1475.
- 29 Aguilar-Solis ED, Lee-Rivera I, Álvarez-Arce A, López E, López-Colomé AM. FAK phosphorylation plays a central role in thrombin-induced RPE cell migration. *Cell Signal* 2017; 36: 56-66.
- 30 Akiyama T, Kawasaki Y. Wnt signalling and the actin cytoskel-

- eton. *Oncogene* 2006; 25(57): 7538-44.
- 31 Wang Q, Symes AJ, Kane CA, Freeman A, Naricula M, Munson P, *et al.* A novel role for Wnt/Ca²⁺ signaling in actin cytoskeleton remodeling and cell motility in prostate cancer. *PLoS One* 2010; 5(5): e10456.
- 32 Garcia AL, Udeh A, Kalahasty K, Hackam AS. A growing field: The regulation of axonal regeneration by Wnt signaling. *Neu Reg Res* 2018; 13(1): 43-52.
- 33 Seo J, Kim J. Regulation of Hippo signaling by actin remodeling. *BMB Rep* 2018; 51(3): 151-56.
- 34 Wada K, Itoga K, Okano T, Yonemura S, Sasaki H. Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development* 2011; 138(18): 3907-14.
- 35 Qiao Y, Chen J, Lim YB, Finch-Edmondson ML, Seshachalam VP, Qin L, *et al.* YAP regulates actin dynamics through ARHGAP29 and promotes metastasis. *Cell Rep* 2017; 19(8): 1495-1502.
- 36 Chugh P, Paluch EK. The actin cortex at a glance. *J Cell Sci* 2018; 131(14): jcs186254.
- 37 Fritzsche M, Erlenkämper C, Moendarbary E, Charras G, Kruse K. Actin kinetics shapes cortical network structure and mechanics. *Sci Adv* 2016; 2(4): e1501337.
- 38 Tsankova A, Pham TT, Garcia DS, Otte F, Cabernard C. Cell polarity regulates biased myosin activity and dynamics during asymmetric cell division via *Drosophila* Rho kinase and Protein Kinase N. *Dev Cell* 2017; 42(2): 143-55.
- 39 Pelaseyed T, Bretscher A. Regulation of actin-based apical structures on epithelial cells. *J Cell Sci* 2018; 131(20): jcs221853.
- 40 Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* 2009; 78: 857-902.
- 41 Li P, Bademosi AT, Luo J, Meunier FA. Actin remodeling in regulated exocytosis: Toward a mesoscopic View. *Trends Cell Biol* 2018; 28(9): 685-97.
- 42 Svitkina T. The actin cytoskeleton and actin-based motility. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2018; 10(1): a018267.
- 43 Ren XD, Kiosses WB, Schwartz MA. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J* 1999; 18(3): 578-85.
- 44 Callan-Jones AC, Voituriez R. Actin flows in cell migration: from locomotion and polarity to trajectories. *Curr Opin Cell Biol* 2016; 38: 12-7.
- 45 Misu S, Takebayashi M, Miyamoto K. Nuclear actin in development and transcriptional reprogramming. *Frontier in Genetics* 2017; 8: 27.
- 46 Schrank BR, Aparicio T, Li Y, Chang W, Chait BT, Gundersen GG, *et al.* Nuclear ARP2/3 drives DNA break clustering for homology-directed repair. *Nature* 2018; 559(7712): 61-6.
- 47 Caridi CP, D'Agostino C, Ryu T, Zapotoczny G, Delabaere L, Li X, *et al.* Nuclear F-actin and myosins drive relocalization of heterochromatic breaks. *Nature* 2018; 559(7712): 54-60.
- 48 Vasioukhin V, Bauer C, Yin M, Fuchs E. Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell* 2000; 100(2): 209-19.
- 49 Ivanov AI, Hunt D, Utech M, Nusrat A, Parkos CA. Differential roles for actin polymerization and a Myosin II Motor in assembly of the epithelial apical junctional complex. *Mol Biol Cell* 2005; 16(6): 2636-50.
- 50 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(12): 379-82.
- 51 Galkin VE, Orlova A, Egelman EH. Actin filaments as tension sensors. *Curr Biol* 2012; 22(3): 96-101.
- 52 Saha S, Lee IH, Polley A, Groves JT, Rao M, Mayor S. Diffusion of GPI-anchored proteins is influenced by the activity of dynamic cortical actin. *Mol Biol Cell* 2015; 26(22): 4033-45.
- 53 Gurel PS, Hatch AL, Higgs HN. Connecting the cytoskeleton to the endoplasmic reticulum and Golgi. *Curr Biol* 2014; 24(14): R660-72.
- 54 Kast DJ, Dominguez R. The cytoskeleton-autophagy connection. *Curr Biol* 2017; 27(8): R318-26.
- 55 Aguilera MO, Berón W, Colombo MI. The actin cytoskeleton participates in the early events of autophagosome formation upon starvation induced autophagy. *Autophagy* 2012; 8(11): 1590-1603.
- 56 Reggiori F, Monastyrska I, Shintani T, Klionsky DJ. The actin cytoskeleton is required for selective types of autophagy, but not nonspecific autophagy, in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 2005; 16(12): 5843-56.
- 57 Zhuo C, Ji Y, Chen Z, Kitazato K, Xiang Y, Zhong M, *et al.* Proteomics analysis of autophagy-deficient Atg7^{-/-}MEFs reveals a close relationship between F-actin and autophagy. *Biochem Biophys Res Com* 2013; 437(3): 482-8.
- 58 Bavister BD. *The mammalian preimplantation embryo*. Springer: Boston, 1987.
- 59 DiMaggio AJ Jr, Lonergan TA, Stewart-Savage J. Cortical granule exocytosis in hamster eggs requires microfilaments. *Mol Reprod Dev* 1997; 47(3): 334-40.
- 60 Terada Y, Simerly C, Schatten G. Microfilament stabilization by jasplakinolide arrests oocyte maturation, cortical granule exocytosis, sperm incorporation cone resorption, and cell-cycle progression, but not DNA replication, during fertilization in mice. *Mol Reprod Dev* 2000; 56(1): 89-98.
- 61 Liang CG, Su YQ, Fan HY, Schatten H, Sun QY. Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: Roles of mitogen-activated protein kinase. *Mol Endocrinol* 2007; 21(9): 2037-55.
- 62 Matsubayashi Y, Coulson-Gilmer C, Millard TH. Endocytosis-dependent coordination of multiple actin regulators is required for wound healing. *J Cell Biol* 2015; 210(3): 419-33.
- 63 Seixas AI, Azevedo MM, Paes de Faria J, Fernandes D, Mendes Pinto I, Relvas JB. Evolvability of the actin cytoskeleton in oligodendrocytes during central nervous system development and aging. *Cell Mol Life Sci* 2019; 76(1): 1-11.
- 64 Roman J, McDonald JA. Expression of fibronectin, the integrin alpha 5, and alpha-smooth muscle actin in heart and lung development. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 6(5): 472-80.
- 65 Nosedá M, Fu YX, Niessen K, Wong F, Chang L, McLean G, *et al.* Smooth muscle α -Actin is a direct target of Notch/CSL. *Circ Res* 2006; 98(12): 1468-70.
- 66 Major RJ, Irvine KD. Influence of Notch on dorsoventral compartmentalization and actin organization in the *Drosophila* wing. *Development* 2005; 132(17): 3823-33.
- 67 Fernández BG, Gaspar P, Brás Pereira C, Jezowska B, Rebelo SR, Janody F. Actin-capping protein and the hippo pathway regulate

- F-actin and tissue growth in drosophila. *Development* 2011; 138(11): 2337-46.
- 68 Sansores-Garcia L, Bossuyt W, Wada K, Yonemura S, Tao C, Sasaki H, *et al.* Modulating F-actin organization induces organ growth by affecting the Hippo pathway. *EMBO J* 2014; 30(12): 2325-35.
- 69 Kouri JB, Lavalle C. Do chondrocytes undergo “activation” and “transdifferentiation” during the pathogenesis of osteoarthritis? A review of the ultrastructural and immunohistochemical evidence. *Histol Histopathol* 2006; 21(7): 793-802.
- 70 Nürnberg A, Kitzing T, Grosse R. Nucleating actin for invasion. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(3): 177-87.
- 71 Hoshino D, Branch KM, Weaver AM. Signaling inputs to invadopodia and podosomes. *J Cell Sci* 2013; 126(14): 2979-89.
- 72 Sung BH, Zhu X, Kaverina I, Weaver AM. Cortactin controls cell motility and lamellipodial dynamics by regulating ECM secretion. *Curr Biol* 2011; 21(17): 1460-69.
- 73 Sinha S, Hoshino D, Hong NH, Kirkbride KC, Grega-Larson NE, Seiki M, *et al.* Cortactin promotes exosome secretion by controlling branched actin dynamics. *J Cell Biol* 2016; 214(2): 197-213.
- 74 Iwaya K, Norio K, Mukai K. Coexpression of Arp2 and WAVE2 predicts poor outcome in invasive breast carcinoma. *Mod Pathol* 2007; 20(3): 339-43.
- 75 Huang FK, Han S, Xing B, Huang J, Liu B, Bordeleau F, *et al.* Targeted inhibition of fascin function blocks tumour invasion and metastatic colonization. *Nat Commun* 2015; 6: 7465.
- 76 Jayo A, Malboubi M, Antoku S, Chang W, Ortiz-Zapater E, Groen C, *et al.* Fascin regulates nuclear movement and deformation in migrating cells. *Dev Cell* 2016; 38(4): 371-83.
- 77 Izdebska M, Zielińska W, Grzanka D, Gagat M. The role of actin dynamics and atin-binding proteins expression in epithelial-to-mesenchymal transition and its association with cancer progression and evaluation of possible therapeutic targets. *Biomed Res Int* 2018; 2018: 4578373.
- 78 Zhou Y, Zhu S, Cai C, Yuan P, Li C, Huang Y, *et al.* High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. *Nature* 2014; 509(7501): 487-91.
- 79 Chen B, Gilbert LA, Cimini BA, Schnitzbauer J, Zhang W, Li GW, *et al.* Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell* 2013; 155(7): 1479-91.
- 80 Wang H, Xu X, Nguyen CM, Liu Y, Gao Y, Lin X, *et al.* CRISPR-mediated programmable 3D genome positioning and nuclear organization. *Cell* 2018; 175(5): 1405-17.
- 81 Goldspink DA, Matthews ZJ, Lund EK, Wileman T, Mogensen MM. Immuno-fluorescent labeling of microtubules and centrosomal proteins *in ex vivo* intestinal tissue and 3D *in vitro* intestinal organoids. *J Vis Exp* 2017; (130): e56662.
- 82 York AG, Parekh SH, Dalle ND, Fischer RS, Temprine K, Mione M, *et al.* Resolution doubling in live, multicellular organisms via multifocal structured illumination microscopy. *Nat Methods* 2012; 9(7): 749-54.
- 83 Xu K, Babcock HP, Zhuang X. Dual-objective STORM reveals three-dimensional filament organization in the actin cytoskeleton. *Nat Methods* 2012; 9(2): 185-8.
- 84 Xu K, Zhong G, Zhuang X. Actin, spectrin and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons. *Science* 2013; 339(6118): 452-6.
- 85 Kuhn JR, Pollard TD. Real-time measurements of actin filament polymerization by total internal reflection fluorescence microscopy. *Biophys J* 2005; 88(2): 1387-402.
- 86 Wang JH. Substrate deformation determines actin cytoskeleton reorganization: A mathematical modeling and experimental study. *J Theor Biol* 2000; 202(1): 33-41.
- 87 Berro J, Sirotkin V, Pollard TD. Mathematical modeling of endocytic actin patch kinetics in fission yeast: disassembly requires release of actin filament fragments. *Mol Biol Cell* 2010; 21(16): 2905-15.