

## 研究论文

# 果蝇羊浆膜细胞形态发生所需的Rho信号通路组分的RNAi筛选

李秋月<sup>1</sup> 张兆轩<sup>1</sup> 吕志一<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>中国海洋大学, 海洋生命学院, 青岛 266000; <sup>2</sup>中国海洋大学, 海洋生物多样性与进化研究所, 青岛 266000)

**摘要** 细胞形态的形成与维持与其执行的生物学功能息息相关, 其中微丝作为细胞骨架, 是细胞形态的决定性因素之一。小G蛋白Rho家族是控制微丝的重要信号分子。然而Rho蛋白的不同种类, 以及上游的RhoGEF和RhoGAP如何协同调控细胞形态, 目前还缺乏系统研究。该研究以果蝇的羊浆膜细胞为模型, 通过组织特异性表达RNAi, 对Rho家族及其上游信号分子进行遗传筛选。结果显示, Rho1并未参与到羊浆膜细胞形态发生的过程中, 同属Rho亚家族的RhoL、RhoBTB, Rac亚家族的Mtl, 以及Cdc42是Rho活性的主要来源。通过敲降果蝇的26个RhoGEF和22个RhoGAP, 进一步发现了若干重要的羊浆膜发育调控因子, 其中在羊浆膜组织中敲降RhoGAP19D导致的胚胎死亡率接近100%。该研究通过RNAi遗传筛选, 鉴定出一系列在羊浆膜发育过程中影响微丝的关键因子, 为下一步的研究提供线索。

**关键词** 果蝇; Rho信号; 细胞骨架; 羊浆膜细胞

## An RNAi Screen for Rho Signaling Pathway Components Required for *Drosophila* Amnioserosa Morphogenesis

LI Qiuyue<sup>1</sup>, ZHANG Zhaoxuan<sup>1</sup>, LÜ Zhiyi<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266000, China;<sup>2</sup>Institute of Evolution and Marine Biopersity, Ocean University of China, Qingdao 266000, China)

**Abstract** The formation and maintenance of cell morphology is closely related to the biological functions it performs, of which F-actin, as the cytoskeleton, are one of the determinants of cell morphology. The Rho family of small G proteins is an important signalling molecule that controls F-actin organization. However, the different species of Rho proteins, and how the upstream RhoGEF and RhoGAP synergistically regulate cell morphology, have not been systematically investigated. In this study, a genetic screen for the Rho family and its upstream signaling molecules was performed by tissue-specific expression of RNAi using *Drosophila* amnioserosa cells as a model. The results showed that Rho1 was not involved in the morphogenesis of amnioserosa cells, and that RhoL and RhoBTB of the same Rho subfamily, Mtl of the Rac subfamily and Cdc42 were the main sources of Rho activity. Several important regulators of amnioserosa development were further identified by knocking down 26 RhoGEF

收稿日期: 2023-04-27 接受日期: 2023-05-22

国家自然科学基金(批准号: 32070786)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0532-82031732, E-mail: lvzhiyi@ouc.edu.cn

Received: April 27, 2023 Accepted: May 22, 2023

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32070786)

\*Corresponding author. Tel: +86-532-82031732, E-mail: lvzhiyi@ouc.edu.cn

and 22 RhoGAP in *Drosophila*, with knockdown of RhoGAP19D in amnioserosa tissue leading to near 100% lethality. In this study, a series of key factors affecting F-actin during amnioserosa development were identified through RNAi genetic screening, providing clues for further studies.

**Keywords** *Drosophila*; Rho signaling; cytoskeleton; amnioserosa

细胞作为生命的基本单元,呈现出丰富的形态多样性,如:上皮细胞具有柱状、立方或扁平的细胞形态;巨噬细胞具有大量片状伪足;红细胞呈两面微凹的圆盘形等。细胞的形态与其生理功能息息相关。在病理状况下,细胞往往会出现异常的形态,如上皮细胞来源的癌细胞失去了其特有的形态,呈现出圆形和椭球形<sup>[1]</sup>。在组织或胚胎发育的不同阶段,细胞的形态呈现出动态变化。因此对细胞形态发生机理的研究,将有助于人们理解疾病发生和胚胎发育的机理。细胞形态的维持和动态变化由来源于胞内、外作用于细胞膜上的各种因素(包括:细胞内部细胞骨架系统产生的力、细胞之间或者细胞与胞外基质黏附的力、细胞的渗透压等)所调控<sup>[2]</sup>。

分布在细胞膜下的细胞骨架微丝(F-actin),在细胞形态发生与维持过程中起到重要作用<sup>[3]</sup>。Rho信号是调控微丝动态变化的重要因素之一<sup>[4]</sup>。Rho蛋白利用简单的生物化学策略来控制复杂的细胞学过程:它们在两种不同的构象中相互转化,当与GTP结合时,Rho蛋白则处于“活性”状态,可以和靶蛋白结合,激活下游蛋白,包括微丝成核因子Arp2/3上游的Scar/WASp、微丝成核与延伸因子Formin等。而当GTP被具有GTP酶活性的Rho蛋白催化变成GDP时,Rho蛋白则呈现出“非活性”状态。Rho蛋白两种状态的转变分别受其激活及灭活因子的精准调控。其中Rho蛋白鸟苷酸交换因子(Rho guanine nucleotide exchange factors, RhoGEF)促使Rho·GDP转变为Rho·GTP,是Rho蛋白的激活因子;RhoGTP酶激活蛋白(Rho GTPase activating protein, RhoGAP)则使Rho·GTP加速转变为Rho·GDP,是Rho蛋白的灭活因子<sup>[5]</sup>。特异的RhoGEF/GAP之间相互协调,通过控制Rho活性来调节微丝的装配从而建立及维持细胞的某种形态,这是胚胎发育过程中细胞形态变化的重要调控机制。

目前已有的报道多集中在单个RhoGEF/GAP调控Rho蛋白的机制,比如细胞黏附连接形成过程中ELMO/DOCK作为RhoGEF对Rho的上调<sup>[5]</sup>、果蝇胚胎细胞膜在胞化时期内陷受到RhoGEF2的调控<sup>[6]</sup>等。然而,在细胞形态发生过程中,往往是多个Rho-

GEF/GAP同时精细调控各个Rho蛋白的活性和亚细胞定位<sup>[7]</sup>。这些RhoGE/GAP之间如何通过相互协调来驱动细胞的形态发生,目前尚未被阐明。

果蝇羊浆膜(amnioserosa)是位于果蝇胚胎背侧表面由200个左右上皮细胞构成的组织,其对果蝇胚胎发育至关重要。原肠作用之前,羊浆膜细胞与其他上皮细胞一样,均为柱状上皮。随着原肠运动,羊浆膜细胞逐渐特化,并在形态上发生剧烈变化。具体表现为:从柱状上皮细胞变为狭长的菱状上皮细胞,最后变为扁平的鳞状<sup>[8]</sup>。在一系列形变过程中,羊浆膜组织细胞数量保持不变,即并未伴随细胞分裂或凋亡。因此,羊浆膜细胞是研究细胞形态维持与动态变化的理想模型。

本研究以果蝇羊浆膜为模型,采取组织特异性RNA干扰,探究了Rho信号通路对羊浆膜细胞形态维持与变化的作用,筛选到了在羊浆膜组织中维持正常细胞形态的Rho蛋白及其上游的RhoGEF和RhoGAP。为进一步研究Rho信号网络在羊浆膜细胞形态发生过程中的机理提供了重要的线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 果蝇品系

本研究中的果蝇品系c381-Gal4(BDSC3734)和GAP19D-GFP(BDSC78314)来自于美国Bloomington果蝇中心(Bloomington *Drosophila* Stock Center, BDSC),RNA干扰品系果蝇多数购自清华果蝇中心(Tsinghua Fly Center, THFC),少量购自BDSC,见下表1。大部分RNA干扰品系为纯合子,即来自父母的同源染色体都含有UAS-RNAi元件。少部分RNA干扰品系为杂合子,即只有一条同源染色体含有UAS-RNAi元件,另一条染色体为平衡子。通过是否有平衡子,可以判断该株系是纯合体或者杂合体。

### 1.2 药品与试剂

鼠抗Dlg抗体(编号4F3)购自Hybridoma Bank公司;Myosin重链抗体(Zipper)为自制抗体;细胞核染料DAPI、Phalloidin-alexa 488和荧光二抗购自美国ThermoFisher Scientific公司;其他化学试剂均购自

表1 本研究用到的RNAi株系列表  
Table 1 List of RNAi lines used in this study

基因名字 Gene name	号码 CG number	来源 Source	基因名字 Gene name	号码 CG number	来源 Source
<i>cdep</i>	CG31536	THU1999	<i>GAP1A</i>	CG40494	THU3556
<i>CG30440</i>	CG30440	THU2007	<i>cv-c</i>	CG34389	BDSC64030
<i>cyst</i>	CG10188	THU1114	<i>cv-c</i>	CG34389	BDSC6443
<i>cyst</i>	CG10188	THU3895	<i>racGAP84C</i>	CG2595	BDSC77172
<i>exn</i>	CG42665	THU5007	<i>GAP54D</i>	CG6477	BDSC31144
<i>exn</i>	CG42665	THU0738	<i>GAP54D</i>	CG6477	BDSC54051
<i>mbc</i>	CG10379	TH02182.N	<i>GAP54D</i>	CG6477	BDSC54459
<i>PDZ-GEF</i>	CG9491	THU0466	<i>GAP54D</i>	CG6477	BDSC6440
<i>PDZ-GEF</i>	CG9491	THU2013	<i>GAP54D</i>	CG6477	BDSC6441
<i>pebble</i>	CG8114	THU2981	<i>GAP68F</i>	CG6811	THU4321
<i>GEF2</i>	CG9635	THU2012	<i>GAP71E</i>	CG32149	THU0863
<i>GEF2</i>	CG9635	THU3659	<i>GAP1A</i>	CG40494	THU0745
<i>GEF3</i>	CG43976	THU4019	<i>GAP92B</i>	CG4755	THU0746
<i>GEF3</i>	CG43976	THU1894	<i>CG8948</i>	CG8948	TH201500458.S
<i>GEF4</i>	CG8606	THU4949	<i>graf</i>	CG8948	TH201500458.S
<i>GEF64C</i>	CG32239	TH05316.N	<i>GAP93B</i>	CG3421	THU1656
<i>rtGEF</i>	CG10043	THU1139	<i>GAP93B</i>	CG3421	THU1998
<i>sif</i>	CG34418	THU3976	<i>GAP5A</i>	CG3208	THU1995
<i>zir</i>	CG11376	THU2843	<i>GAP5A</i>	CG3208	TH201500753.S
<i>CG15611</i>	CG43976	BDSC31158	<i>rho1</i>	CG8416	THU2814
<i>CG42674</i>	CG42674	BDSC31166	<i>rho1</i>	CG8416	THU3565
<i>CG42674</i>	CG42674	BDSC34943	<i>rac1</i>	CG2248	TH201501180.S
<i>CG43102</i>	CG43102	BDSC62371	<i>rac1</i>	CG2248	THU1493
<i>CG8557</i>	CG8557	BDSC28754	<i>rac2</i>	CG8556	TH201501064.S
<i>CG8557</i>	CG8557	BDSC32341	<i>cdc42</i>	CG12530	THU1713
<i>pura</i>	CG33275	BDSC31221	<i>cdc42</i>	CG12530	THU5427
<i>pura</i>	CG33275	BDSC58270	<i>mtl</i>	CG5588	TH02177.N
<i>step</i>	CG11628	BDSC32374	<i>mtl</i>	CG5588	THU1711
<i>ziz</i>	CG42533	BDSC54817	<i>mtl</i>	CG5588	THU3024
<i>unc-89</i>	CG33519	THU1346	<i>RhoBTB</i>	CG5701	TH01577.N
<i>vav</i>	CG7893	THU5232	<i>RhoBTB</i>	CG5701	TH02181.N
<i>spg</i>	CG31048	THU1581	<i>RhoBTB</i>	CG5701	THU0862
<i>trio</i>	CG18214	THU2820	<i>cdc42</i>	CG12530	THU2859
<i>trio</i>	CG18214	THU5494	<i>cdc42</i>	CG12530	TH201501053.S
<i>trio</i>	CG18214	THU2820	<i>miro</i>	CG5410	THU2781
<i>sos</i>	CG7793	THU3521	<i>RhoL</i>	CG9366	THU0971
<i>sos</i>	CG7793	THU5743	<i>RhoL</i>	CG9366	TH201501066.S
<i>sos</i>	CG7793	TH201500996.S	<i>RhoL</i>	CG9366	THU5181
<i>cdGAPr</i>	CG42533	THU3779	<i>WASp</i>	CG1520	TH02180.N
<i>orcl</i>	CG3573	THU3699	<i>WASp</i>	CG1520	THU1741
<i>GAP100F</i>	CG1976	THU1138	<i>WASp</i>	CG1520	THU2125
<i>GAP102A</i>	CG42316	THU0780	<i>WASp</i>	CG1520	TH201500962.S
<i>GAP15B</i>	CG4937	THU4927	<i>daam</i>	CG14622	THU3967
<i>GAP16F</i>	CG7122	THU4940	<i>daam</i>	CG14622	TH201500351.S
<i>GAP16F</i>	CG7122	THU4940	<i>dia</i>	CG1768	THU0408
<i>GAP18B</i>	CG42274	THU5363	<i>fhos</i>	CG42610	THU5026
<i>GAP19D</i>	CG1412	THU0814	<i>capu</i>	CG3399	BDSC32922

中国医药集团有限公司。

### 1.3 仪器

恒温恒湿培养箱(LHS-50SC)购自上海齐欣科学仪器有限公司;激光共聚焦荧光显微镜(LSM900)购自Carl Zeiss公司;体视显微镜(SZ51)购自Evident公司。

### 1.4 方法

**1.4.1 果蝇杂交** 选取c381-Gal4处女果蝇大约50只,与相应的UAS-RNAi雄果蝇50只放到自制笼子(为长90 mm、直径60 mm的透明亚克力管子,一端用金属网封口,另一端用苹果汁琼胶培养基皿覆盖)里。将其放在25 °C培养箱中培养。

**1.4.2 胚胎收取与固定** 将果蝇麻醉后,倒入笼子,在笼子上部放上涂抹酵母膏的苹果汁盘子,按照需要的时期收取胚胎。将带有胚胎的苹果汁盘子取下,用50%的次氯酸钠溶液处理2 min,去掉绒毛膜,用自来水冲洗干净,转移至装有5 mL 4% PFA-PBS溶液和5 mL庚烷的血清瓶中,放置在翘班摇床摇动固定20 min。之后,将下层4% PFA溶液吸出,加入5 mL无水甲醇。振荡30 s,吸出胚胎,用甲醇反复漂洗,存放在-20 °C。苹果汁盘子制作方法:35 g琼脂加入到1 500 mL水中,121 °C高温高压灭菌20 min;另取50 g白糖及500 mL苹果汁加入到烧杯水浴加热到60 °C,将苹果汁与65 °C的琼脂溶液混合,加入15 mL 15%的尼泊金无水乙醇溶液混匀,倒入6 cm直径的培养盘中。放凉备用。

**1.4.3 生物信息学分析** 从uniprot网站(<https://www.uniprot.org/>)下载目的基因氨基酸序列,使用MEGA软件构建系统进化树,使用DNAMAN软件进行序列比对并将比对结果可视化。

**1.4.4 致死率数据统计** 本研究以果蝇受精卵孵出幼虫代表成活、受精卵未孵化出幼虫代表卵死亡为标准,统计致死率。将杂交雌雄果蝇放入果蝇笼子上涂抹酵母的苹果汁盘子。果蝇产卵后取下盘子,发育24~36 h后统计苹果汁盘子上果蝇卵的发育情况。死亡率以 $[\text{死亡卵}/(\text{成活卵}+\text{死亡卵})]\times 100\%$ 计算。

**1.4.5 免疫荧光染色** 收集固定的胚胎,去掉样品中的甲醇后加入PBST(在PBS中加入0.1% Tween20)润洗3次,复水15 min。在含有5% BSA的PBST中室温封闭30 min。按如下比例加入一抗(Dlg 1:100, Zipper 1:1 000)到PBST中,4 °C条件下孵育过夜。用PBST润洗3次,再用PBST洗3次,每次洗15 min。以

1:500的比例加入二抗,避光室温孵育1 h。用PBST润洗3次之后,再用PBST避光洗3次,每次15 min。加入DAPI,染色3 min, PBST润洗3次。在载玻片中央加一滴封片剂,轻轻用针把胚胎排列在封片剂中,盖上盖玻片,避光放置24 h。

**1.4.6 显微成像** 固定好的样品放置在显微镜下,用LSM900激光共聚焦扫描显微镜拍摄,镜头选用40×油镜,数值孔径为1.4。图像通过Fiji软件处理。

**1.4.7 统计学分析** 本研究数据用均值±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。实验组与对照组两组间比较采用重复测量数据的方差分析,两组间比较,方差齐,则采用 $t$ 检验,方差不齐,则采用近似 $t$ 检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

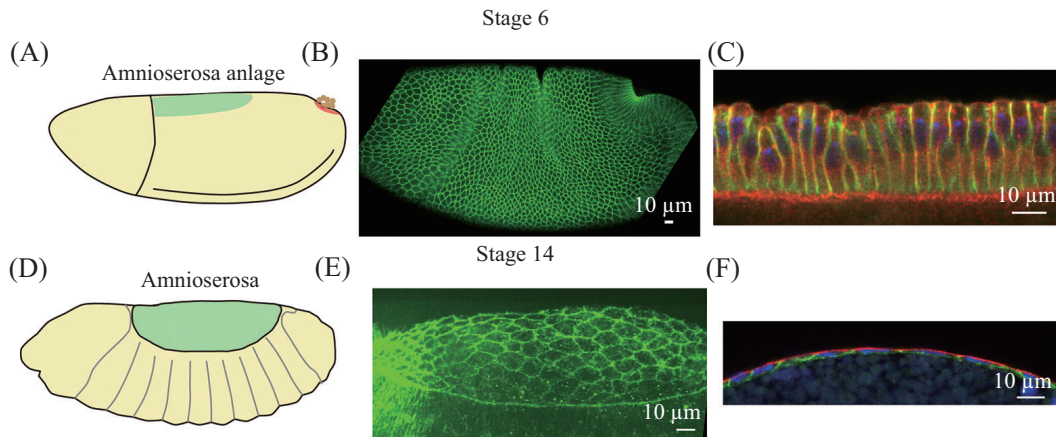
## 2 结果

### 2.1 微丝是羊浆膜细胞维持形态的必要因素

果蝇羊浆膜细胞经历了剧烈形变(图1)。激光共聚焦图像显示,受精3 h后(stage 6),胚胎背侧的羊浆膜前体细胞为柱状上皮细胞;受精后10 h(stage 14),羊浆膜分化成熟,为鳞状上皮细胞。

微丝是决定细胞形态的关键因素之一。在细胞内,微丝的装配受到严格的调控。其中Formin蛋白家族和Arp2/3复合体是最为常见的两类调控因子<sup>[9]</sup>。果蝇的Formin基因包括*dia*(diaphanous)、*frl*(formin-like)、*DAAM*(dishevelled associated activator of morphogenesis)、*capu*(cappuccino)、*fhos*(formin homology 2 domain containing)、*form3*(formin 3)<sup>[10]</sup>(表2)。我们利用UAS-Gal4系统,在羊浆膜组织中特异敲降除了Form3以外的Fromin家族各成员。羊浆膜发育缺陷往往引起胚胎发育停滞或发育缺陷,最终导致胚胎未发生孵化而死亡。因此,我们首先通过统计胚胎的孵化状况计算了胚胎的死亡率。结果表明,羊浆膜特异敲降*dia*、*frl*、*capu*以及*DAAM*均导致胚胎死亡率显著提升,其中*DAAM*敲降导致的死亡率高达80%左右(图2)。*fhos*敲降与对照组相比未出现死亡率的显著差异。由于*fhos*的RNAi株系为杂合子,通过遗传操作进行组织特异性敲降时仅在50%的胚胎中引起敲降。因此,无法排除羊浆膜中*fhos*的表达对果蝇胚胎发育的贡献。

Arp2/3复合物介导了网状微丝网络的形成。其自身活性需要WASp激活<sup>[11]</sup>。利用上述同样的方法在羊浆膜组织中特异敲降WASp也导致胚胎死亡率



A~C: 果蝇胚胎在受精后3 h(stage 6)。D~F: 果蝇胚胎在受精后10 h(stage 14)。A: 果蝇胚胎模式图, 胚胎开始原肠运动, 胚胎背部细胞已经特化成羊浆膜前体细胞(绿色表示)。B: 胚胎侧面俯视图。微丝染色展示细胞轮廓。C: 胚胎切面观, 羊浆膜前体细胞为柱状上皮细胞, 红色: 微丝; 绿色: Dlg(标记细胞膜); 蓝色: DAPI。D: 受精后10 h的果蝇胚胎模式图, 绿色表示发育成熟的羊浆膜组织。E: 胚胎侧面俯视图。微丝染色展示细胞轮廓。背部细胞已经变成大而薄的鳞状上皮细胞。F: 切面观, 羊浆膜细胞为扁平鳞状细胞, 红色: 微丝; 绿色: Dlg; 蓝色: DAPI。

A-C: *Drosophila* embryo at stage 6, 3 h after fertilization. D-F: *Drosophila* embryo at stage 14, 10 h after fertilization. A: the scheme of *Drosophila* embryo at the onset of gastrulation. The cells located most dorsally are determined as amnioserosa anlage (marked in green). B: the surface view of the embryo at stage 6. F-actin staining is the outline of the cells. C: cross-section shows the amnioserosa anlage cells are columnar. F-actin in red, Dlg in green, DAPI in blue. D: the scheme of *Drosophila* embryo at 10 h after fertilization. The mature amnioserosa cells are marked in green. E: the surface view of the *Drosophila* embryo. The differentiated amnioserosa cells are flattened and squamous. F-actin staining outlines the cells. F: cross-section at the sagittal plan of amnioserosa cells which are flattened and squamous, F-actin in red, Dlg in green, DAPI in blue.

图1 果蝇胚胎羊浆膜细胞形态

Fig.1 The morphology of amnioserosa cells in *Drosophila* embryo

表2 果蝇Formin基因家族

Table 2 The Formin gene family in *Drosophila*

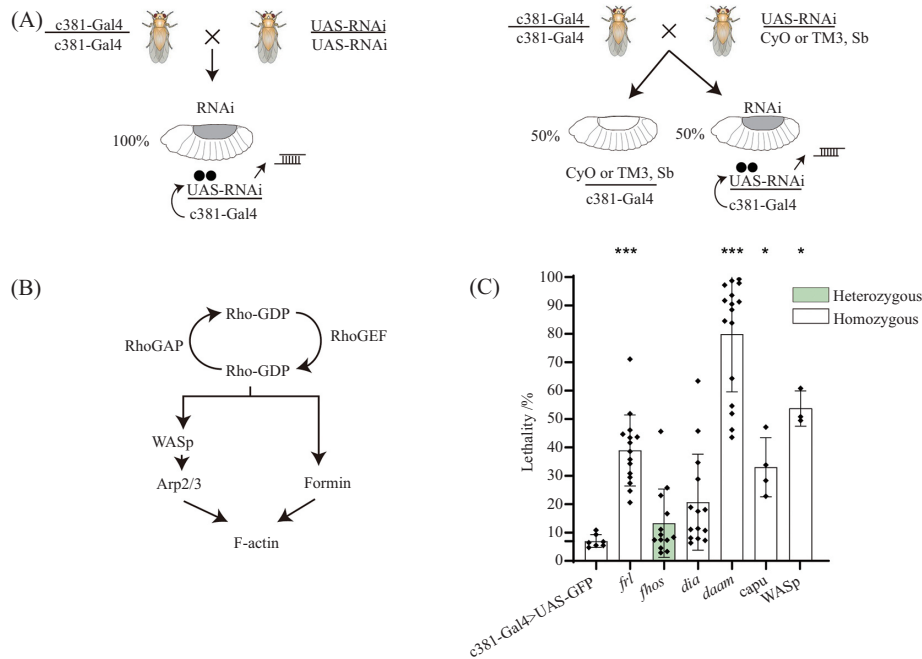
基因 Gene	别称 Known as	CG编号 CG number
Diaphanous	<i>dia</i>	CG1768
Formin-like	<i>frl</i>	CG18214
Dishevelled associated activator of morphogenesis	<i>DAAM</i>	CG14622
Cappuccino	<i>capu</i>	CG3399
Formin homology 2 domain containing	<i>fhos</i>	CG42665
Fromin 3	<i>form3</i>	CG33556

显著提升(图2)。

## 2.2 Rho蛋白家族的不同成员对羊浆膜发育的贡献不同

果蝇基因组编码9个Rho蛋白<sup>[12]</sup>。系统发生分析显示其进化关系如图3A所示。其中Miro与其他成员亲缘关系较远, RhoU次之。Rho1、RhoL和RhoBTB被归入一个分枝, 形成Rho亚家族; Rac1、Rac2和Mlt(mig-2-like)被归入一个分枝, 形成Rac亚家族; Cdc42与Rac亚家族亲缘关系更近。为了检测Rho蛋白家族的不同成员通过调控羊浆膜组织对果蝇胚胎发育的贡献, 我们在羊浆膜组织中特异敲降

了8个编码Rho蛋白的基因表达, 并检测了胚胎的死亡率。结果显示, 除Rho1和miro之外, 其余6个编码Rho蛋白的基因敲降均导致胚胎死亡率显著增加(图3B)。其中, 与Rho1亲缘关系较近的RhoL和RhoBTB敲降的胚胎致死率分别达到40%和60%; *mtl*敲降胚胎致死率高达90%, *rac1*和*rac2*敲降胚胎致死率均在20%到30%之间; *cdc42*敲降导致约有50%的胚胎无法孵化发育到幼虫。令人意外的是, *Rho1*敲降胚胎死亡率与对照组无显著差异, 且3个独立的*Rho1* RNAi株系结果一致, 提示*Rho1*极有可能不参与羊浆膜的形态的调控。*miro*编码线粒体Rho蛋白<sup>[13]</sup>, 羊浆

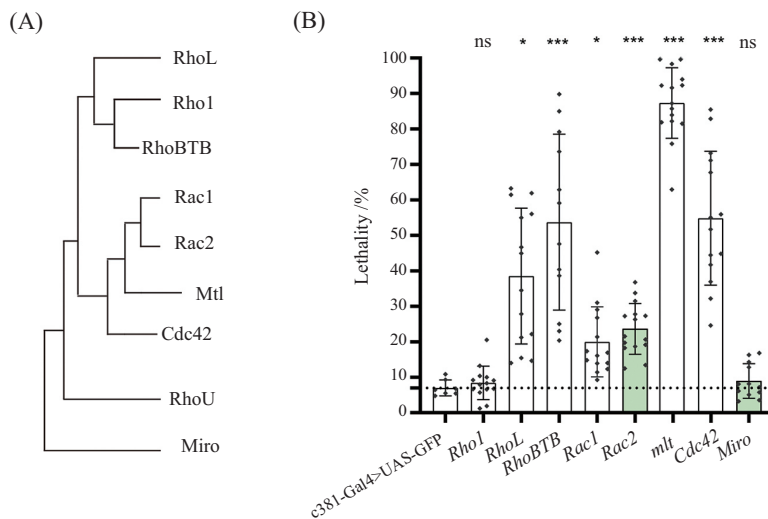


A: 果蝇杂交示意图。左边代表RNAi株系为纯合子, 100%的F1胚胎羊浆膜产生了具有RNA干扰的转录产物。右边代表RNAi株系为杂合子, 只有50%的F1胚胎羊浆膜产生了具有RNA干扰的转录产物, 另外50%的胚胎无RNAi。亲代果蝇可以通过平衡染色体上的显性突变标志(第二条染色体的CyO以及第三条染色体的TM3, Sb)来进行分辨。B: Rho信号通路调节微丝示意图。C: 在羊浆膜特异性敲降对应基因后, 胚胎致死率的统计。绿色代表杂合子品系, 白色代表纯合子品系。\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 与c381-Gal4>UAS-GFP组相比。

A: the scheme of *Drosophila* crosses. The left panel presents the RNAi homozygotes, which produce 100% F1 embryos containing RNA interference. The right panel presents the RNAi heterozygotes. Half of the F1 embryos contain RNA interference and the other half not. The parents are distinguished by the presence or absence of balancer (CyO for the second and TM3, Sb for the third chromosome). B: the scheme of Rho pathway regulating F-actin. C: quantification of lethality of the embryo expressing RNAi against the indicated genes in amnioserosa tissue. The heterozygous embryos are in green and the homozygous embryos are in white. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared with the c381-Gal4>UAS-GFP group.

图2 Formin和WASp在羊浆膜中敲降导致胚胎死亡

Fig.2 Knockdown of Formin and WASp in amnioserosa leads to embryonic lethality



A: 果蝇Rho蛋白家族系统发生树。B: 在羊浆膜组织中特异性敲降Rho家族基因。统计后代胚胎致死情况, 致死情况用致死率(lethality)表示。绿色代表杂合子品系, 白色代表纯合子品系。ns代表无显著性差异, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 与c381-Gal4>UAS-GFP组比较。

A: the phylogenetic tree of Rho family in *Drosophila*. B: quantification of lethality of the embryo expressing RNAi against Rho family genes in amnioserosa tissue. The heterozygous embryos are in green and the homozygous embryos are in white. ns means no significance, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared with c381-Gal4>UAS-GFP group.

图3 Rho蛋白在羊浆膜发育过程中的贡献

Fig.3 The contribution of Rho proteins in amnioserosa development

膜组织特异性敲降*miro*胚胎致死率与对照组无显著差异。然而, 实验中*miro*的RNAi为杂合子株系, 仅能在50%的胚胎中引起敲降。因而, 此处无法排除羊浆膜中Miro对果蝇胚胎发育的贡献。

### 2.3 RhoGEF/GAP在羊浆膜发育过程中的作用

如前文所述, 羊浆膜组织特异性敲降微丝调控因子及Rho蛋白家族成员均可导致果蝇胚胎死亡率显著增加。Rho信号的时空分布受到RhoGEF和RhoGAP的精确调控<sup>[3]</sup>。接下来, 我们针对果蝇的26个RhoGEF(表3)和22个RhoGAP(表4)分别进行羊浆膜组织特异性敲降, 并统计了相应基因敲降胚胎致死率。结果显示*cysts*、*CG30440*、*RhoGEF3*、*exn*、*RhoGEF64C*、*sif*、*pebble*、*sos*、*CG15611*、*CG8557*以及*pura*的等11个基因敲降均显著增加了胚胎的死亡率(图4A)。其中*CG8557*敲降导致胚胎

死亡率高达70%左右。其余16个*RhoGEF*基因的羊浆膜组织特异性敲降并未显著影响胚胎的死亡率。其中,*PDZ-GEF*、*RhoGEF64C*、*spg*以及*vav*均为杂合体RNAi株系。在这种情况下, 理论上50%的胚胎没有RNAi元件。尤其是*RhoGEF64C*敲降实验中胚胎致死率也显著高于对照组实验。因此我们极可能低估了这些RhoGEF在羊浆膜中的表达对胚胎发育过程的贡献。

接下来, 选取了基因敲降引起胚胎死亡率增加的*RhoGEF3*和*CG30440*以及胚胎死亡率未出现显著差异的*cdep*、*RtGEF*和*PDZ-GEF*共5个株系。固定胚胎并通过肌球蛋白(myosin)重链(Zipper)的免疫荧光染色检测了相应基因敲降胚胎背部早期肌球蛋白网络在羊浆膜细胞中的表达(图4B)。免疫荧光染色结果显示, 在基因敲降未出现胚胎死亡率显著变化

表3 果蝇的RhoGEF  
Table 3 The RhoGEF in *Drosophila*

基因标志 Gene symbol	名称 Gene name	别称 Known as	CG编号 CG number
<i>CG15611</i>	<i>CG15611</i>	/	CG15611
<i>CG30440</i>	<i>CG30440</i>	/	CG30440
<i>CG42674</i>	<i>CG42674</i>	/	CG42674
<i>CG43102</i>	<i>CG43102</i>	/	CG43102
<i>CG8557</i>	<i>CG8557</i>	/	CG8557
<i>cdep</i>	Chondrocyte-derived ezrin-like domain containing protein	/	CG31536
<i>cyst</i>	<i>cysts</i>	<i>Dp114RhoGEF</i>	CG10188
<i>exn</i>	<i>ephexin</i>	/	CG42665
<i>mbc</i>	<i>myoblast city</i>	<i>Su(rac)1, Dock180</i>	CG10379
<i>pbl</i>	<i>pebble</i>	<i>ECT2</i>	CG8114
<i>PDZ-GEF</i>	PDZ domain-containing guanine nucleotide exchange factor	<i>Gef26, dizzy, l(2)k13720, dzy, GEF</i>	CG9491
<i>pura</i>	<i>puratrophin-1-like</i>	/	CG33275
<i>RhoGEF2</i>	<i>Rho guanine nucleotide exchange factor 2</i>	<i>DRhoGEF2, (2)04291,</i>	CG9635
<i>RhoGEF3</i>	<i>Rho guanine nucleotide exchange factor 3</i>	/	CG43976
<i>RhoGEF4</i>	<i>Rho guanine nucleotide exchange factor 4</i>	/	CG8606
<i>RhoGEF64C</i>	<i>Rho guanine nucleotide exchange factor at 64C</i>	<i>Gef64C</i>	CG32239
<i>RtGEF</i>	<i>Rho-type guanine nucleotide exchange factor</i>	<i>dpix, pix, β-PIX</i>	CG10043
<i>sif</i>	<i>still life</i>	<i>Dm_3L:26493, lincRNA.447</i>	CG34418
<i>sos</i>	<i>son of sevenless</i>	<i>l(2)br24, l(2)34Ea, E(sev)2A,</i>	CG7793
<i>spg</i>	<i>sponge</i>	<i>mat(3)6</i>	CG31048
<i>step</i>	<i>steppke</i>	<i>GRP1, General receptor for phosphoinositide 1, general receptor for phosphoinositides-1</i>	CG11628
<i>trio</i>	<i>trio</i>	<i>l(3)S036810, l(3)S095914, M89</i>	CG18214
<i>Unc-89</i>	<i>Unc-89</i>	<i>obscurin, BEST: HL01080, obs</i>	CG33519
<i>vav</i>	<i>Vav guanine nucleotide exchange factor</i>	<i>DroVav</i>	CG7893
<i>zir</i>	<i>zizimin-related</i>	/	CG11376
<i>ziz</i>	<i>zizimin</i>	/	CG42533

表4 果蝇的RhoGAP  
Table 4 The RhoGAP in *Drosophila*

基因标志 Gene symbol	名称 Gene name	别称 Known as	CG编号 CG number
<i>cdGAPr</i>	<i>Cd GTPase activating protein-related</i>	<i>GAP, d-CdGAPr</i>	CG42533
CG8948	CG8948	/	CG8948
<i>conu</i>	<i>Conundrum</i>	/	CG17082
<i>cv-c</i>	<i>Crossveinless c</i>	<i>RhoGAP88C</i>	CG34389
<i>Graf</i>	<i>GTPase regulator associated with FAK</i>	/	CG8948
<i>ocrl</i>	<i>Oculocerebrorenal syndrome of Lowe</i>	<i>EG:86E4.5, dOCRL</i>	CG3573
<i>RacGAP84C</i>	<i>Protein at 84C</i>	<i>rnRacGAP</i>	CG2595
<i>RhoGAP100F</i>	<i>RhoGTPase activating protein at 100F</i>	<i>Syd-1</i>	CG1976
<i>RhoGAP102A</i>	<i>Rho GTPase activating protein at 102A</i>	<i>BP1050, Dm_4:1183</i>	CG42316
<i>RhoGAP15B</i>	<i>Rho GTPase activating protein at 15B</i>	/	CG4937
<i>RhoGAP16F</i>	<i>Rho GTPase activating protein at 16F</i>	/	CG7122
<i>RhoGAP18B</i>	<i>Rho GTPase activating protein at 18B</i>	<i>White rabbit, whir</i>	CG42274
<i>RhoGAP19D</i>	<i>Rho GTPase activating protein at 19D</i>	/	CG1412
<i>RhoGAP1A</i>	<i>Rho GTPase activating Protein at 1A</i>	<i>EG:23E12.2, EG:23E12.5</i>	CG40494
<i>RhoGAP54D</i>	<i>Rho GTPase activating protein at 54D</i>	/	CG6477
<i>RhoGAP5A</i>	<i>Rho GTPase activating protein at 5A</i>	/	CG3208
<i>RhoGAP68F</i>	<i>Rho GTPase activating protein at 68F</i>	/	CG6811
<i>RhoGAP71E</i>	<i>Rho GTPase activating protein at 71E</i>	<i>C-GAP, l(3)j6B9, Cumberland-GAP</i>	CG32149
<i>RhoGAP92B</i>	<i>Rho GTPase activating protein at 92B</i>	/	CG4755
<i>RhoGAP93B</i>	<i>Rho GTPase activating protein at 93B</i>	<i>CrGAP</i>	CG3421
<i>RhoGAPp190</i>	<i>Rho GTPase activating protein at 190</i>	<i>p190RhoGAP</i>	CG32555
<i>tum</i>	<i>Tumbleweed racGAP50C</i>	<i>acGAP, RacGAP</i>	CG13345

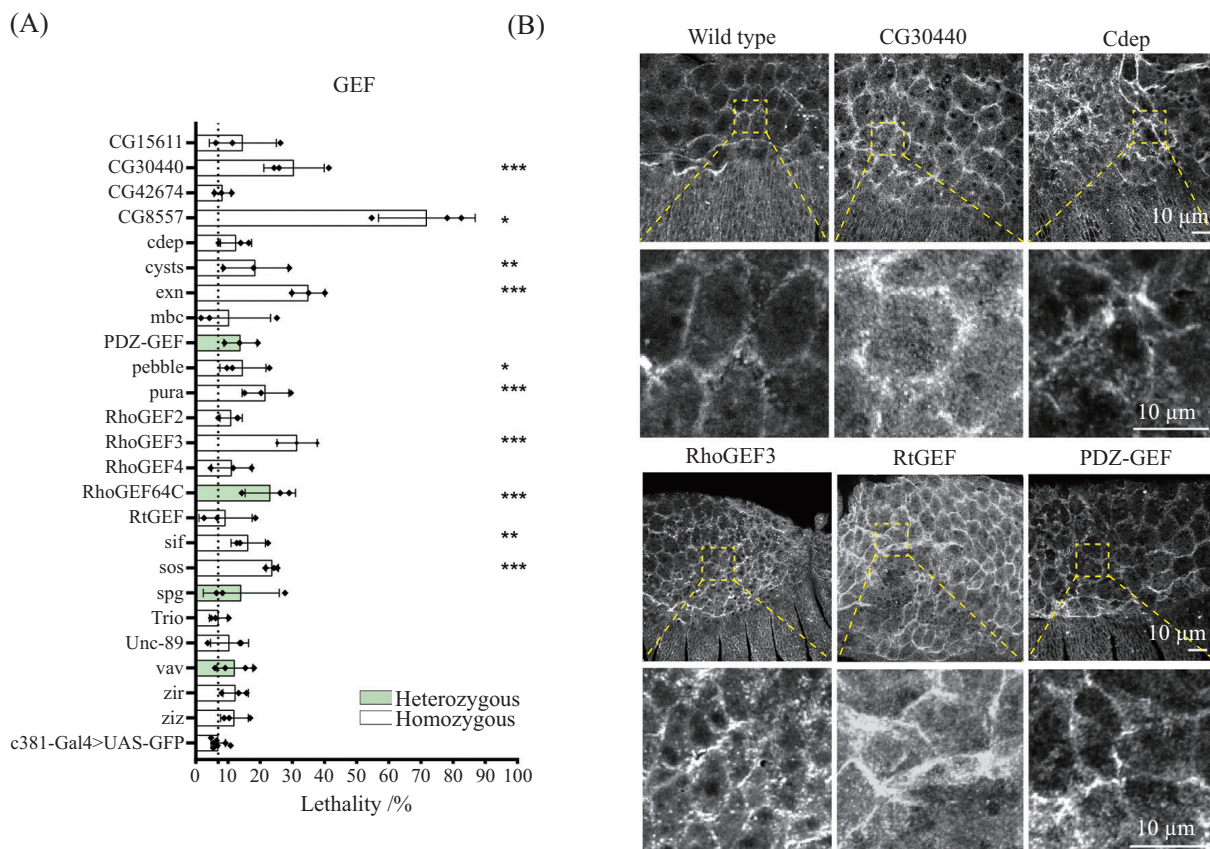
的实验组胚胎中,羊浆膜细胞的肌球蛋白网络与野生型的胚胎有明显差别。其中敲降*cdep*和*PDZ-GEF*导致羊浆膜细胞边界的肌球蛋白变得模糊、破碎,出现不连续的现象,与敲降*RhoGEF3*表型类似;敲降*PDZ-GEF*导致羊浆膜细胞变大;而敲降*CG30440*和*RtGEF*后肌球蛋白在羊浆膜细胞的边界堆积,并且细胞形状相对对照组变得更圆(图4B)。

接下来我们在羊浆膜组织中特异性敲降了果蝇RhoGAP的22个家族成员,并监测了胚胎的死亡率。结果显示,*cdGAPr*、*graf*、*RhoGAP1A*、*RhoGAP16F*、*RhoGAP18B*、*RhoGAP19D*、*RhoGAP68F*、*RhoGAP71E*、*RhoGAPp190*、*RhoGAP93B*、*RhoGAP100F*、*cv-c*和*CG10426*等13个基因敲降均显著增加了胚胎的死亡率(图4A)。其中*RhoGAP19D*缺失的胚胎致死率接近100%。上述实验中*cdGAPr*、*RhoGAP15B*、*RhoGAP16F*、*RhoGAP18B*以及*RhoGAP68F*均为杂合体RNAi株系。在这种情况下,理论上50%的胚胎没有RNAi元件。即便如此,*cdGAPr*、*RhoGAP16F*、*RhoGAP18B*以及*RhoGAP68F*这5个RhoGAP基因的敲

降均导致胚胎死亡率显著增加。以上数据显示通过RhoGAP在羊浆膜中的表达来下调Rho活性对胚胎发育至关重要。

最后,选取了基因敲降引起胚胎死亡率显著增加的*cdGAPr*、*RhoGAP1A*、*RhoGAP19D*和*RhoGAP100F*,以及胚胎死亡率未出现显著差异的*RhoGAP92B*共5个株系。固定基因敲降胚胎,并通过肌球蛋白(myosin)重链(Zipper)的免疫荧光染色检测了相应基因敲降胚胎背部早期肌球蛋白网络在羊浆膜细胞中的表达(图5B)。在*RhoGAP92B*基因敲降胚胎中,Zipper免疫荧光染色与野生型胚胎非常类似;加之该基因敲降胚胎致死率无明显变化,提示*RhoGAP92B*很可能不参与羊浆膜细胞中的Rho信号调控。在*cdGAPr*、*RhoGAP1A*、*RhoGAP19D*和*RhoGAP100F*基因敲降胚胎中,与野生型胚胎相比较,Zipper免疫荧光染色明显增加。与野生型中Zipper免疫荧光染色信号大多分布于细胞膜附近相比较,基因敲降胚胎中细胞边界以及细胞质内Zipper免疫荧光染色型号均明显增加。尤其值得注意的





A: 在羊浆膜组织中特异性敲降RhoGEF基因。统计后代胚胎致死情况, 致死情况用致死率(lethality)表示。绿色代表杂合子品系, 白色代表纯合子品系。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 与c381-Gal4>UAS-GFP组比较。B: 部分RNAi胚胎的羊浆膜细胞的激光共聚焦图片。

A: quantification of lethality of the embryo expressing RNAi against the RhoGEF genes in amnioserosa tissue. The heterozygous embryos are in green and the homozygous embryos are in white. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared with c381-Gal4>UAS-GFP group. B: cofocal images show the abnormal morphology of amnioserosa.

图4 RhoGEF蛋白在羊浆膜组织中的作用  
Fig.4 The role of RhoGEF in amnioserosa tissue

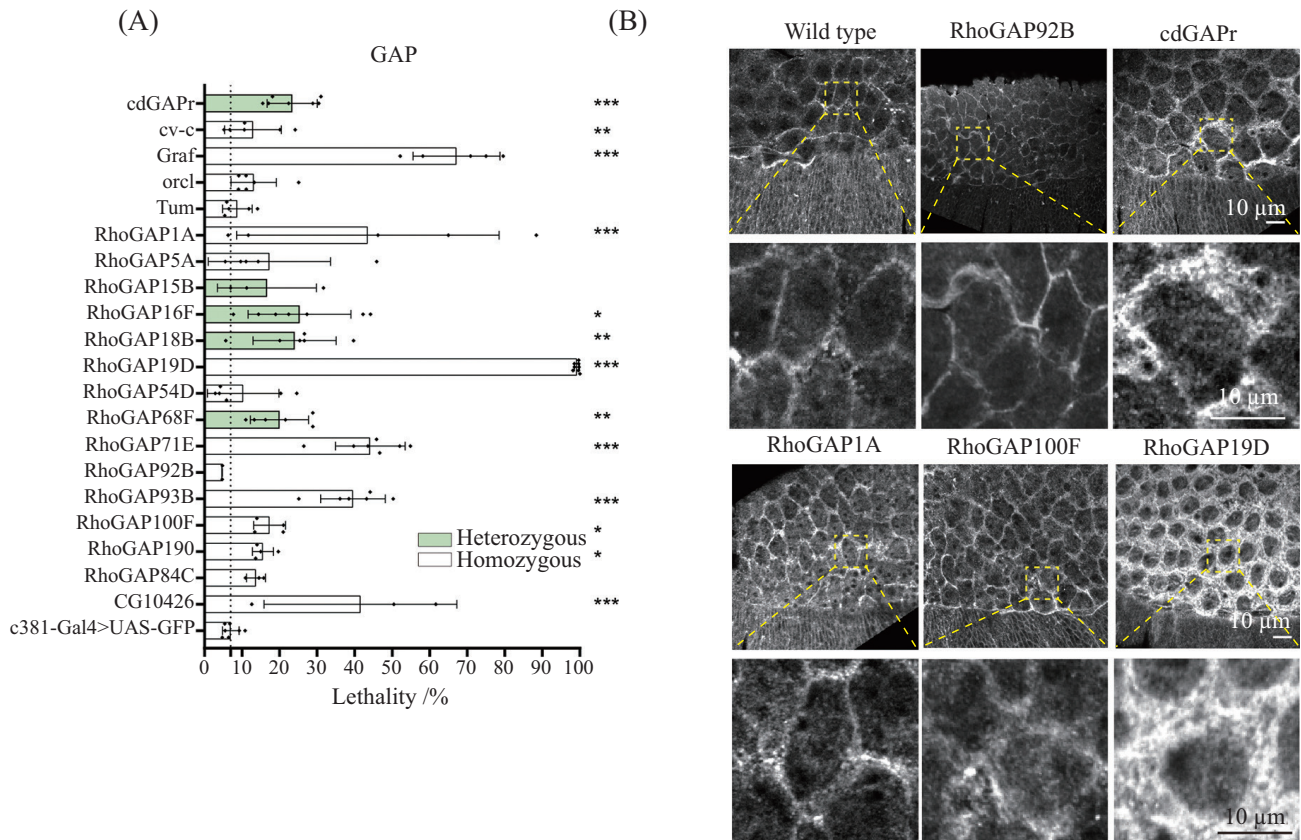
是, 在*RhoGAP19D*羊浆膜组织敲降的胚胎里, 与野生型胚胎相比, 细胞质中Zipper免疫荧光染色信号出现积累; 且与野生型细胞横切面呈现狭长六边形不同, *RhoGAP19D*敲降的羊浆膜细胞横切面呈现接近规则六边形。这很可能是*RhoGAP19D*的缺失, 导致肌球蛋白积累增多引起细胞内肌动-肌球蛋白网络(actomyosin network)收缩力增加。这与RhoGAP通过下调Rho信号通路而下调细胞内肌动-肌球蛋白网络收缩力的普遍功能相一致。

### 3 讨论

在动物胚胎发育的过程中, 细胞形态的维持与动态调控对于细胞实现其生理功能尤为重要。在果蝇胚胎发育的过程中, 位于背部的表皮细胞在原肠胚早期形成羊浆膜前体细胞<sup>[14]</sup>。在胚轴延长的过程中, 羊浆膜细胞变成狭长的菱形细胞, 并被延长的胚

轴覆盖; 随着胚胎体节形成、体节回缩, 羊浆膜细胞再次暴露在胚胎背部表面并逐渐变成呈六边形的扁平的鳞状上皮细胞; 随后与外胚层细胞共同介导胚胎背部闭合的过程, 羊浆膜细胞随之凋亡; 胚胎发育进入头部及器官形成阶段并发育成1龄幼虫并孵化。在整个过程中羊浆膜发生剧烈形变: 从柱状上皮细胞到狭长的菱形细胞再到扁平的鳞状上皮细胞最终发生凋亡。报道显示, 干扰羊浆膜细胞形变导致胚轴延长或回缩障碍<sup>[15-16]</sup>。羊浆膜细胞脉冲式收缩是胚胎背部闭合的主要驱动力<sup>[17-18]</sup>。

微丝作为细胞骨架的重要组成部分, 对细胞形态的维持与动态调控至关重要。微丝由球状肌动蛋白单体(G-actin)聚合而成纤维状肌动蛋白(F-actin)。Formin家族蛋白和Arp2/3是微丝的成核因子, 通过调节纤维状肌动蛋白的聚合和解聚影响细胞形变及细胞的物理属性。Formin家族蛋白Dia、DAAM、



A: 在羊浆膜组织中特异性敲降RhoGAP基因。统计后代胚胎致死情况,致死情况用致死率(lethality)表示。绿色代表杂合子品系,白色代表纯合子品系。 $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$ ,与c381-Gal4>UAS-GFP组比较。B: 部分RNAi胚胎的羊浆膜细胞的激光共聚焦图片。

A: quantification of lethality of the embryo expressing RNAi against the RhoGAP genes in amnioserosa tissue. The heterozygous embryos are in green and the homozygous embryos are in white.  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$  compared with c381-Gal4>UAS-GFP group. B: cofocal images show the abnormal morphology of amnioserosa.

图5 RhoGAP蛋白在羊浆膜组织中的作用

Fig.5 The role of RhoGAP in amnioserosa tissue

FHOS、Frl、Form3以及Capu均被检测到在羊浆膜细胞中有表达<sup>[19]</sup>,其中Frl通过聚合本底水平的肌动蛋白网络调控羊浆膜细胞的形变<sup>[20]</sup>。本研究发现羊浆膜组织特异性敲降Formin家族基因引起胚胎发育障碍导致死亡率显著升高,与文献报道一致,证明羊浆膜细胞形变对胚胎发育具有重要贡献。其中在羊浆膜组织中敲降DAAM造成了胚胎高达80%的致死率,说明DAAM除了在气管发育过程中<sup>[21]</sup>,也在羊浆膜发育中起到重要作用。本研究还发现羊浆膜组织特异性敲降Arp2/3导致胚胎死亡率显著上升,提示分枝状微丝对羊浆膜功能的贡献。具体的分子生物学机制需要进一步研究。

Formin家族和Arp2/3复合体的活性都受到Rho信号的精确调控,目前广泛接受的观点是Rho亚家族激活Formin<sup>[22]</sup>,而Cdc42和Rac亚家族激活Arp2/3<sup>[23]</sup>。Rho家族蛋白在人类中有20个,均可以在

果蝇中找到其同源基因。前人报道干扰羊浆膜组织两侧的表皮中Rho1的表达,可以阻止果蝇胚胎的背部闭合<sup>[24]</sup>;这很可能是由于影响了两侧表皮细胞延长造成背部闭合障碍导致的<sup>[17]</sup>。虽然有报道显示,Rho1抑制剂可部分影响羊浆膜中微丝的组装<sup>[20]</sup>。然而本研究发现,在羊浆膜组织中特异敲降Rho对胚胎成活率无显著影响,暗示羊浆膜组织中的Rho1对胚胎发育的功能很可能微乎其微。在我们的筛选中,Rho亚家族的RhoL、RhoBTB,Rac亚家族的Mtl以及Cdc42(Cdc42亚家族的唯一成员)是Rho蛋白活性的主要贡献者。

RhoGEF/GAP是Rho信号网络中对Rho蛋白活性进行精细调控的关键因子。RhoGEF和RhoGAP各自的数目均比Rho蛋白多,保证了Rho蛋白活性快速的时空变化。有证据表明在同一个细胞中不同的RhoGEF精准激活位于不同亚细胞区域的Rho信号协

调完成细胞形变的过程从而保证胚胎发育的顺利进行<sup>[25]</sup>。在本研究中,通过在羊浆膜中组织特异性对单个RhoGEF/GAP进行逐一敲降,筛选到一系列通过影响羊浆膜发育而导致胚胎致死的基因。提示不同的RhoGEF/GAP极有可能协同精准调控羊浆膜细胞骨架的动态来影响羊浆膜细胞形变以及细胞和组织的物理属性,从而保证胚胎发育的顺利进行。其中,值得注意的是RhoGAP19D羊浆膜敲降胚胎致死率达到100%,且羊浆膜细胞边界出现了大量的肌动-肌球蛋白网络的堆积,细胞俯面观呈近似六边形,暗示羊浆膜组织处在高度张力之下<sup>[2]</sup>。最近有研究指出,RhoGAP19D是Cdc42的灭活因子,在卵巢发育过程中起到关键作用<sup>[26]</sup>。未来通过在羊浆膜组织中的研究揭示其具体的分子机制,并探讨该调控机制在不同组织中的普遍意义。

总之,本研究通过羊浆膜组织特异性的RNA干扰,首先确认羊浆膜细胞中微丝成核因子Formin家族蛋白和Arp2/3对胚胎发育具有重要贡献;其次发现RhoL、RhoBTB、Mtl以及Cdc42是羊浆膜Rho蛋白活性的主要贡献者;最后着眼于Rho蛋白上游调控因子RhoGEF和RhoGAP,筛选得到11个RhoGEF和13个RhoGAP基因在羊浆膜组织中发挥着极其重要的功能且对胚胎发育具有重要贡献,并通过免疫荧光染色初步监测了部分RhoGEF/GAP基因敲降对羊浆膜细胞形态以及肌球蛋白网络结构的影响。本研究为探究RhoGEF/GAP蛋白如何通过精准调节Rho信号通路,调控细胞形变保证胚胎发育正常进行这一基础问题提供了方向。

### 参考文献 (References)

- [1] SAILEM H Z, BAKAL C. Identification of clinically predictive metagenes that encode components of a network coupling cell shape to transcription by image-omics [J]. *Genome Res*, 2017, 27(2): 196-207.
- [2] LECUIT T, LENNE P F. Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(8): 633-44.
- [3] HODGE R G, RIDLEY A J. Regulating Rho GTPases and their regulators [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17(8): 496-510.
- [4] 韩佳寅, 易艳, 梁爱华, 等. Rho/ROCK信号通路研究进展[J]. *药学报* (HAN J Y, YI Y, LIANG A H. Research progress of Rho/ROCK signal pathway [J]. *Acta Pharm Sin*), 2016, 51(6): 853-9.
- [5] TORET C P, COLLINS C, NELSON W J. An Elmo-Dock complex locally controls Rho GTPases and actin remodeling during cadherin-mediated adhesion [J]. *J Cell Biol*, 2014, 207(5): 577-87.
- [6] GROSSHANS J, WENZL C, HERZ H M, et al. RhoGEF2 and the formin Dia control the formation of the furrow canal by directed actin assembly during *Drosophila* cellularisation [J]. *Development*, 2005, 132(5): 1009-20.
- [7] MULLER P M, RADEMACHER J, BAGSHAW R D, et al. Systems analysis of RhoGEF and RhoGAP regulatory proteins reveals spatially organized RAC1 signalling from integrin adhesions [J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(4): 498-511.
- [8] POPE K L, HARRIS T J. Control of cell flattening and junctional remodeling during squamous epithelial morphogenesis in *Drosophila* [J]. *Development*, 2008, 135(13): 2227-38.
- [9] POLLARD T D. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins [J]. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2007, 36: 451-77.
- [10] BOGDAN S, SCHULTZ J, GROSSHANS J. Formin' cellular structures: physiological roles of Diaphanous (Dia) in actin dynamics [J]. *Commun Integr Biol*, 2013, 6(6): e27634.
- [11] ZALLEN J A, COHEN Y, HUDSON A M, et al. SCAR is a primary regulator of Arp2/3-dependent morphological events in *Drosophila* [J]. *J Cell Biol*, 2002, 156(4): 689-701.
- [12] ROJAS A M, FUENTES G, RAUSELL A, et al. The Ras protein superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids [J]. *J Cell Biol*, 2012, 196(2): 189-201.
- [13] GUO X, MACLEOD G T, WELLINGTON A, et al. The GTPase dMiro is required for axonal transport of mitochondria to *Drosophila* synapses [J]. *Neuron*, 2005, 47(3): 379-93.
- [14] RUSCH J, LEVINE M. Regulation of a dpp target gene in the *Drosophila* embryo [J]. *Development*, 1997, 124(2): 303-11.
- [15] SCHOCK F, PERRIMON N. Cellular processes associated with germ band retraction in *Drosophila* [J]. *Dev Biol*, 2002, 248(1): 29-39.
- [16] MCCLEERY W T, VELDHUIS J, BENNETT M E, et al. Elongated cells drive morphogenesis in a surface-wrapped finite-element model of germband retraction [J]. *Biophys J*, 2019, 117(1): 157-69.
- [17] LÜ Z, ZHANG N, ZHANG X, et al. The lateral epidermis actively counteracts pulling by the amnioserosa during dorsal closure [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 865397.
- [18] SOLON J, KAYA-COPUR A, COLOMBELLI J, et al. Pulsed forces timed by a ratchet-like mechanism drive directed tissue movement during dorsal closure [J]. *Cell*, 2009, 137(7): 1331-42.
- [19] TOTH K, FOLDI I, MIHALY J. A comparative study of the role of formins in *Drosophila* embryonic dorsal closure [J]. *Cells*, 2022, 11(9): 1539.
- [20] DEHAPIOT B, CLEMENT R, ALEGOT H, et al. Assembly of a persistent apical actin network by the formin Frl/Fmnl tunes epithelial cell deformability [J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(7): 791-802.
- [21] MATUSEK T, DJIANE A, JANKOVICS F, et al. The *Drosophila* formin DAAM regulates the tracheal cuticle pattern through organizing the actin cytoskeleton [J]. *Development*, 2006, 133(5): 957-66.
- [22] BREITSPRECHER D, GOODE B L. Formins at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2013, 126(Pt 1): 1-7.
- [23] GOLEY E D, WELCH M D. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(10): 87-98.

- 713-26.
- [24] KIEHART D P, CRAWFORD J M, ARISTOTELOUS A, et al. Cell sheet morphogenesis: dorsal closure in *Drosophila melanogaster* as a model system [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2017, 33: 169-202.
- [25] GARCIA DE LAS BAYONAS A, PHILIPPE J M, LELLOUCH A C, et al. Distinct RhoGEFs activate apical and junctional contractility under control of G proteins during epithelial morphogenesis [J]. *Curr Biol*, 2019, 29(20): 3370-85,e7.
- [26] FIC W, BASTOCK R, RAIMONDI F, et al. RhoGAP19D inhibits Cdc42 laterally to control epithelial cell shape and prevent invasion [J]. *J Cell Biol*, 2021, 220(4): e202009116.