

## 目錄

目錄	1
中文摘要	2
英文摘要	4
前言	6
材料與方法	17
結果	26
Mob2、NDR 在 NIH 3T3 細胞株中的表現位置	26
Mob2 與 NDR 影響細胞型態	28
Mob2 / NDR 與 Moesin 的磷酸化	31
降低 Mob2 / NDR 的表達不影響細胞型態與應肌纖維組成	33
討論	35
Mob2 與 NDR 在細胞中的表現位置與功能探討	35
Mob2 / NDR 與細胞型態	37
Mob2 / NDR 參與 Moesin 磷酸化	39
參考文獻	43
圖表目錄	51
圖表說明	53

## 中文摘要

細胞的型態發生對生物體在發育過程及在細胞各自的功能上皆具重要的角色，此過程需要許多蛋白質參與，尤其是極性蛋白及 small GTPase 的參與。老鼠中的 mps-one-binder 2(Mob2)蛋白質屬於 Mob1/phocein domain 蛋白質家族，而從酵母菌、錐蟲到人類，都具有此蛋白家族。由過去研究已知，在發育中的感光細胞中降低 Mob2 的表現量會改變磷酸化 Moesin 及極性蛋白質 Crumbs 的表現位置。在小鼠神經纖維母細胞中，表現 Mob2 可促進神經纖維的形成。這些結果指出，Mob2 在細胞的型態發生上具有重要功能。在其他研究中發現，Mob2 會調控 NDR，絲胺酸 / 蘇胺酸蛋白質激酶的活性。從生化研究中得知，Mob2 會和 NDR 結合並調控 NDR 的磷酸化。在本實驗中，我將探討 Mob2 與 NDR 是否影響微絲蛋白重組及調控細胞型態。我已經利用免疫化學法確定了 Mob2 和 NDR 在 NIH 3T3 細胞株中的表現位置。並由細胞免疫螢光染色結果得知，在細胞中大量表現 Mob2、NDR 以及 Mob2 / NDR 會使細胞形成細長分支。進一步我想得知，Mob2 與 NDR 是否藉由將 Moesin 磷酸化而達到改變細胞型態的結果。由西方點墨法結果得知，大量表現 Mob2 以及 NDR 可增

加磷酸化 Moesin 的量；降低 Mob2 以及 NDR 的表現則減少磷酸化 Moesin 的表現量。因此，我的結論為 NDR/Mob2 可經由將 Moesin 磷酸化的方式達到使細胞形成細長分支的結果。

## 英文摘要

Cell morphogenesis is important for development and cell functions. It is achieved by many protein complexes, especially polarity protein complexes and small GTPase. Mouse mps-one-binder 2 (Mob2) protein belongs to a Mob1/phocein domain protein family conserved in yeast, *Trypanosoma brucei*, and humans. It has been shown that knockdown of Dmob2 expression alters subcellular localization of phosphorylated Moesin and Crumbs in the *Drosophila* photoreceptor cell. In mouse N2A cells, expression of Mob2 promotes neurite outgrowth. Together, these studies suggest that Mob2 protein plays an important role in cellular morphogenesis. Studies further demonstrate that NDR, a serine/threonine kinase regulated Mob2 activity. Biochemical studies demonstrate that Mob2 binds to NDR and regulates its phosphorylation. In this study, I investigate whether Mob2 and NDR participate in organizing actin cytoskeleton and modulate cell morphology. I have characterized the subcellular localization of Mob2 and NDR in NIH 3T3 cells. Over-expression of Mob2, NDR or NDR/Mob2 in NIH 3T3 cells causes cellular process formation. Further, I investigate whether Mob2 and NDR alter cell morphology through regulates Moesin phosphorylation. Our results demonstrated that over-expression of Mob2, NDR or NDR/Mob2 increase the level of phosphorylated Moesin, whereas, down-regulation of Mob2 or NDR decrease the level of phosphorylated Moesin. Hence, I

conclude that NDR/Mob2 could promote cellular process formation through induce Moesin phosphorylation.

## 前言

### 微絲蛋白的動態與重組參與細胞型態發生

高等生物由許多不同型態的細胞組成，這些細胞因其功能不同而有不同的細胞形狀，例如神經細胞為了有效率的將神經傳導物質傳遞給身體周邊組織，因此發育出單一且長的軸突，神經細胞同樣具有許多樹突，使其可與其他細胞連結成複雜的網路並溝通訊息；而表皮細胞的功能為在身體外層形成保護的屏障，所以分化出頂層及下層 (apico-basal) 並形成緊密排列的細胞層，且有特化的 cell junctions 可控制物質的進出。因此，依據各種不同的功能，細胞藉由活化不同的訊息路徑使細胞不對稱生長，此稱為細胞極性 (cell polarity) (Iden and Collard, 2008)。極性細胞具有兩個特色：調控分子 (regulatory molecules) 在細胞的兩側形成不對稱分佈；具極性的細胞骨架 (特別是 actin 與 microtubules) 沿著極性的軸組成 (Li and Gundersen, 2008)。細胞極性的生成由極性蛋白調控，極性蛋白可與外在或內在的極性因子 (polarity cues) 作用，而影響細胞型態發生。極性蛋白質例如有 partitioning defective (PAR)、Crumbs、Scribble，這些分子可能一起作用或各自拮抗以維持細胞的不對稱性生長，極性蛋白分子在演化上具有保留性，雖然一開始的研究是在果蠅及線蟲中，但這些蛋白在哺乳類動物中至少都有一個同源基因 (Goldstein and Macara,

2007; Assemat *et al.*, 2008; Humbert *et al.*, 2006)。

過去研究中已對極性分子的下游調控有一些了解，極性蛋白質接收極性因子活化後，可活化 small GTPase 使細胞骨架中的微絲蛋白可重塑 (remodeling)，進行改變細胞型態 (Iden and Collard, 2008)。

Small GTPase 中與細胞型態最有相關的為 Rho (Ras homologous) 蛋白質家族，此蛋白質家族以影響細胞骨架、胞膜傳遞 (membrane trafficking) 與細胞附著等方式來調控細胞極性生成與細胞移行。多數 Rho GTPase 作用於細胞膜上，藉由影響 membrane-associated actin cytoskeleton 以改變細胞型態。在 Rho GTPase 中被研究最多的為 Rho A、Rac1 與 Cdc42，在哺乳動物中此蛋白質家族可藉由促使微絲蛋白 (actin) 在細胞膜附近聚合形成束狀的纖維或樹枝狀的網路，而使細胞膜產生突出或延伸 (protrusion or extension)，例如板狀偽足 (lamellipodia)、絲狀偽足 (filopodia)、偽足 (pseudopodia) 與微絨毛 (microvilli) 等 (Ridley, 2006)。

### 板狀偽足

板狀偽足是可在移行細胞的前緣被觀察到的板狀突出構造，含有網狀的肌動蛋白絲 (actin filament)，被認為是細胞移行過程中使細胞前進的動力。Rho GTPase 中的 Cdc42 與 Rac 皆可在細胞前緣被活化，若被抑制則會減少板狀偽足的延伸。當 Cdc 42 活化時可與

Wiskott-Aldrich syndrome protein ( WASP ) 作用，尤其是 N-WASP，而活化 Arp2/3 複合體，使肌動蛋白絲以 70° 延伸出分支，形成網狀結構。活化的 Rac 則可與 WAVE 複合體作用，活化 Arp2/3 使網狀肌動蛋白絲形成 ( Ridley, 2006 )。帶 ATP 的微絲蛋白單體 ( ATP-G-actin ) 可在肌動蛋白絲的正端，也就是細胞膜方向，不斷加入新的 actin 單體，使肌動蛋白絲具方向性的延伸而使細胞前進。

### 絲狀偽足

絲狀偽足是指狀 ( finger-like ) 的細胞膜突出構造，含有平行的束狀的肌動蛋白絲，被認為可感應外在環境的訊息而影響細胞移動方向。帶 ATP 的微絲蛋白單體同樣可在絲狀偽足的肌動蛋白絲正端加入新的 actin 單體，而在負端不斷的有帶 ADP 的 actin 單體 ( ADP-G-actin ) 掉落，此兩者的動態平衡決定了細胞移動的速度和方向。Cdc42 被認為與絲狀偽足的形成最相關，Cdc42 可藉由活化 Dia2 以形成絲狀偽足，但仍有文獻指出在 fibroblastoid cells 中不表達 Cdc42 依然可使絲狀偽足形成，但在細胞中的 RhoA/RhoF、RhoD 以及 Wrch1 也可使細胞形成絲狀偽足，也許可取代 Cdc42 的功能。

### 微絨毛

微絨毛為在細胞膜邊緣的小突起構造，含有平行的束狀肌動蛋白絲，可在許多細胞表面被發現，例如小腸細胞。已知



Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) 蛋白質參與微絨毛形成，而 Rho 與 Rac 則可互相拮抗調控 ERM 的活性。

細胞的極性與型態發生對生物體在發育及功能上皆具重要角色，因此探討細胞中是藉由何種分子間的訊息傳遞參與細胞極性與型態發生，了解形成細胞型態的分子機制也相對重要。

### **Mob2 可調控細胞型態**

果蠅的感光細胞是具高度極性分化的細胞。每個果蠅的複眼中包括約 750 個小眼，每個小眼中有 8 個感光細胞，每個感光細胞間有 ZA (zonula adherens) junction，又以 ZA junction 分為頂面 (apical domain) 及底側面 (baso-lateral domain)，其中頂面又分為 stalk membrane 與 actin-rich 的 rhabdomere，由過去文獻已知其中有兩個極性蛋白質參與頂面的形成，Crumbs 與 Moesin。在發育完全的果蠅感光細胞中，Crumbs 表達於 stalk membrane；磷酸化 Moesin 則位於 rhabdomere base。除了 Crumbs 與 Moesin，過去在我們實驗室中也發現果蠅中的 Mob2 (Dmob2) 同樣也對感光細胞的型態發生具重要性。在正常發育完全的果蠅小眼在外型呈六角型排列，但在 Dmob2 不表達情況下，小眼排列變的不規則，小眼間的剛毛也不規則出現。而在 75% 蛹期的果蠅感光細胞中，正常情況下感光細胞呈梯型，但在

Dmob2 不表達情況下，感光細胞形狀失去規則且 rhabdomere 會變寬或消失。Dmob2 除了影響感光細胞發育外，也會影響極性蛋白質 Crumbs 和磷酸化 Moesin 的表達位置，在 Dmob2 降低表現情況下，Crumbs 由 stalk membrane 擴散到 rhabdomere base；磷酸化 Moesin 則由 rhabdomere base 擴散到細胞質中 (Liu *et al.*, 2009)。因此可得知，Dmob2 不只對感光細胞型態發生具重要性，也會影響一些極性蛋白質在感光細胞中的表達位置。

Mob2 蛋白質屬於 Mob 蛋白質家族，Mob 的全名為 Mps One Binder (Luca and Winly, 1998)，此蛋白質家族最早是在酵母菌中被發現，而從酵母菌、錐蟲到人類，都具有此蛋白家族，在酵母菌中有 Mob1 和 Mob2；在果蠅中有 Dmob1、Dmob2、Dmob3、Dmob4；在小鼠及人類中則有 Mob1a、Mob1b、Mob1\_2A、Mob1\_2B、Mob1\_2C、Mob2 六個蛋白。

小鼠 *mob2* 全長 705 個核苷酸，在蛋白序列上包含有一個 Mob1 / Phocein domain，Mob 蛋白質家族中的所有蛋白皆具有此 domain (圖一)。Phocein 為一個 26kDa 的蛋白質，和 Mob 蛋白質家族中的蛋白在序列上具有相似性，表現於 Hela cell 的高基氏體與小腦神經細胞 Purkinje cell 的細胞本體及樹突尤其是樹突脊 (dendritic spine) 中 (Baillat *et al.*, 2001)。由目前已知會與 Phocein 共同作用的蛋白質功

能推測 Phocein 在樹突脊中可能參與在胞吞作用（與 Dynamin-1 共同作用）、胞膜傳遞（與 Eps15 和 NDPK 一起作用）、訊息傳導（與 Striatin 共同作用）中（Baillat *et al.*, 2002; Bailly and Castets, 2007）。

雖然目前對 Mob 的研究包括酵母菌及果蠅中，但在酵母菌中的研究仍是最多。此蛋白質家族在酵母菌中包含 Mob1 和 Mob2，最早被定義的則是 Mob1，以 yeast-two hybrid 方式尋找與 Mps1 共同作用蛋白時被發現的。Mob1 已知與細胞週期調控及維持染色體套數正確有關，Mob1 發生缺失的酵母菌無法完成細胞分裂，會停留在細胞核分裂末期並形成長的紡錘絲（Luca *et al.*, 1998）。Mob2 則被認為與細胞極性的形成相關，在行出芽生殖的 *Schizosaccharomyces cerevisiae* 酵母菌株中，Mob2 會先聚集在芽要長出的地方，接著移到 bud neck 最後移到子細胞的核中，在此過程中，Mob2 與 Cbk1 共同作用以調控細胞極性形成與活化子細胞基因表達。而在具雙極性的 *Schizosaccharomyces pombe* 酵母菌株中將 Mob2 去除，則細胞會失去極性而呈現圓形，在此過程中同時會改變細胞骨架中微絲蛋白 (actin) 的組合（Colman-Lerner *et al.*, 2001; Hou *et al.*, 2003）。在我們實驗室過去已知在 N2A 小鼠神經纖維母細胞中，大量表現 Mob2 可促進神經纖維的形成，而在低血清刺激神經纖維形成情況下降低 Mob2 表現

量則可避免神經纖維的形成。這些結果指出，Mob2 在細胞的型態發生上具有重要功能。

## **NDR 受 Mob 活化並參與細胞生長與型態發生**

目前已知與 Mob 有交互作用的蛋白為 NDR ( nuclear Dbf2-related) 蛋白質家族，NDR 為激酶 ( kinase ) 蛋白質，依其 activation segment 的胺基酸序列分類也屬於 AGC ( protein kinase A/PKG/PKC-like ) 激酶蛋白家族的一部分。NDR 蛋白質在各物種間具高度同源，在 *Schizosaccharomyces cerevisie* 中有 Dbf2p，Dbf20p 及 Cbk1p；在 *Schizosaccharomyces pombe* 中有 Sid2p 及 Orb6p；在果蠅中有 Tricornered，Lats / Warts，哺乳類動物中有 NDR1，NDR2，LATS1 與 LATS2。此激酶家族在蛋白質序列具高度保留性，在功能上也相似，主要參與在細胞型態發生及細胞凋亡及增生上 ( Hergovich *et al.*, 2006 ) 。

在蛋白結構上，NDR 在 N 端有 S100B/hMOB1 association (SMA) domain，是 Mob 和 NDR 作用的位置 ( Bichsel *et al.*, 2004; Millward *et al.*, 1998 )，此區域包含許多鹼性疏水性帶正電的胺基酸，可和表面帶負電的 Mob 相互作用；在中間區域具有 activation segment，上面包含一個可自我磷酸化的位點 (人類的 NDR1 為 Ser281)；C 端則

有 hydrophobic motif, 含有一個磷酸化位點 (人類的 NDR1 為 Thr444) (Manning *et al.*, 2002; Colman-Lerner *et al.*, 2001) 。NDR 在胺基酸序列上包含三個可磷酸化位點, 受上游激酶 (Ste20-like kinase) 將之磷酸化而具有活性, 受去磷酸化酵素作用使之失去活性, Mob 則為 NDR 的 co-activator, 當 Mob 與 NDR 結合後, 可使位於 activation segment 的磷酸化位點自我磷酸化。

關於 NDR 的功能, 在 *Schizosaccharomyces cerevisiae* 中, Mob1 與 Dbf2 共同作用調控細胞有絲分裂及細胞質分裂; Mob2 與 Cbk1 共同作用調控細胞型態 (Colman-Lerner *et al.*, 2001) 。果蠅中的 Tricornered 可與 Dmob1-4 作用 (He *et al.*, 2005) , Tricornered 可控制周邊感覺神經中神經纖維的分枝生長 (Emoto *et al.*, 2004) ; Lats/Warts 則是參與在 Hippo pathway 中, Hippo 屬於 Ste20-like protein , 可活化 Lats/Warts, 控制細胞增生及凋亡。哺乳動物中的 NDR1 和 NDR2 皆可與 hMob1A/B/2 作用, NDR1 的功能為參與中心體複製, 且已知 NDR1 的 cDNA 可補償果蠅 Tricornered 的缺失 (He *et al.*, 2005) ; NDR2 則是參與在神經纖維的生長及分化, 且由免疫沉降實驗已知 NDR2 與 actin 間有物理上的作用關係 (Stork *et al.*, 2004) 。而在實驗室過去研究發現, 在果蠅感光細胞中表達不具酵素催化活性 (kinase-dead) 的 Tricornered, 會降低連接細胞膜和細胞骨架中微絲蛋

白的磷酸化 Moesin 蛋白質在感光細胞中的表現量。

## **Moesin 在細胞型態形成上扮演重要角色**

過去研究中已知 Moesin 可藉由影響肌動蛋白絲重組而可改變細胞型態。Moesin ( membrane-organizing extension spike protein ) 為一個可與細胞膜上蛋白 ( 如 CD44、PIP<sub>2</sub> ) 結合並連接細胞骨架中微絲蛋白的輔助性蛋白 ( adaptor protein ) ，屬於 ERM 蛋白家族的一員。此蛋白家族包括 Ezrin、Radixin 以及 Moesin ( Algrain *et al.*, 1993; Franck *et al.*, 1993; Tsukita *et al.*, 1994 ) 。在植物及真菌界中沒有 ERM 蛋白，且此三個同源基因只存在於哺乳動物中，在果蠅中只有 Moesin 一個蛋白質。果蠅 Moesin 與哺乳動物 Moesin 一樣缺少 C 端的 polyproline 區域，此區域只存在於哺乳動物的 Ezrin 及 Radixin 中，故果蠅中 ERM 蛋白命名為 Moesin 或 Moesin-like ( McCartney, 1996 ) 。哺乳動物中的 ERM 在胺基酸序列上具高度的相似性 ( identity ) ，在 N 端約有 85% 的相似，在 C 端約有 70% 相似( Tsukita and Yonemura, 1999 ) 。

ERM 在 N 端有 FERM domain ( Four point one ERM domain ) ，在活化狀態時可與細胞膜上的蛋白結合，在 FERM domain 後面為  $\alpha$ -helical domain，最後是 C 端有微絲蛋白結合區域 ( Filamentous-actin

binding site)。Moesin 在未被活化時，C 端的微絲蛋白結合區域與 N 端帶負電荷的區域結合，使 C 端無法與 F-actin 結合，N 端也無法與細胞膜上蛋白結合，呈現自我抑制 (self-inhibition) 狀態 (Bretscher *et al.*, 2002; Pearson *et al.*, 2000; Taukita *et al.*, 1997)。當接收訊號，如 Rho-kinase 路徑將位於微絲蛋白結合區域重要且保留的 Threonine (Ezrin 的 T567, Rdxin 的 T564, Moesin 的 T558) 磷酸化後 (Nakamura *et al.*, 1995; Matsui *et al.*, 1998; Pietromonaco *et al.*, 1998)，會降低 N 端和 C 端間的親和力並改變蛋白的構型，露出可和細胞膜上蛋白結合的 N 端及可和 F-actin 結合的 C 端微絲蛋白結合區域 (Matsui *et al.*, 1998)，使微絲蛋白可發生重組。ERM 蛋白藉由將微絲蛋白聚集形成的肌動蛋白絲重組的方式參與細胞在形態發生上的過程，如微絨毛的形成、果蠅胚胎極性的決定 (Polesello *et al.*, 2002) 等。

在本實驗中，我們發現一個可能會使微絲蛋白重組進而影響細胞型態的分子機制。在細胞免疫螢光染色結果中觀察到，在細胞株中大量表達 Mob2、NDR1、NDR2 或 Mob2 和 NDR1/2 一起大量表達皆會使細胞型態產生改變，而此結果可能是經由調控 Moesin 蛋白質的磷酸化而造成的。經由西方點墨法結果可得知大量表達 Mob2、NDR1、

NDR2 或 Mob2 和 NDR1/2 一起大量表達皆會增加磷酸化 Moesin 的量；  
而使用核酸干擾降低 Mob2 或 NDR1/2 的表達量則會減少磷酸化  
Moesin 的量。因此我們推測 Mob2 與 NDR1/2 可藉由調控 Moesin 磷  
酸化而改變細胞型態。



## 材料與方法

### 一、細胞培養

NIH3T3 細胞株培養在 25cm<sup>2</sup> 的培養皿 (flask) 中。固定每三天繼代培養，每次保留三分之一的細胞數。培養皿置於 37°C 恆溫、5 % 二氧化碳培養箱中，使用 DMEM complete (Dulbecco's Modified Eagle's Medium，包含 1 % non-essential amino acid、1 % penicillin-streptomycin、1 % L-glutamine、10 % fetal bovine serum) 進行細胞培養。

### 二、質體來源

在大量表現實驗中，*mob2* 構築在 pcDNA 3.1 質體，上面帶有 *myc* 及 *his* 做為標記；*ndr1* 及 *ndr2* 構築在 pAcGFP 質體上，質體上帶有 GFP 做為標記。*mob2* shRNA 及 *ndr1/2* shRNA 則購自中研院國家型干擾性核糖核酸核心設施。

### 三、細胞短暫性轉染

#### (i) Lipofectamine / Plus Reagent

在大量表現實驗中，於三公分細胞培養皿中種植  $3 \times 10^5$  細胞數，在核酸干擾降低表現實驗中，於三公分細胞培養皿中種植  $5 \times 10^5$  細胞數，培養在不含 penicillin-streptomycin 的 DMEM complete 中約 16 小時後，進行短暫性轉染。移除舊有 DMEM，用 transfection medium (不

含 penicillin-streptomycin 和 FBS 的 DMEM complete ) 清洗細胞兩次後，放入 800uL transfection medium 靜置。將 1.5ug 質體稀釋在 100uL transfection medium 中，並加入 8 uL plus reagent ( invitrogen ) ，小心的均勻混和後，於室溫靜置 15 分鐘。接著配製 lipofectamine ( invitrogen ) 5 uL 至 100 uL transfection medium 中，與質體稀釋溶液小心均勻混和後，靜置於室溫 15 分鐘。將約 200 uL 的混合液均勻加入三公分細胞培養皿中，放回 37°C 培養箱作用。經過四小時培養後，將培養液移走，加入 1.5mL DMEM，再放回培養箱繼續培養。

#### (ii) Fluorescent Arrest-In transfection Reagent

將細胞在三公分培養皿中培養至 60~80% 滿後，進行短暫性轉染。在轉染之前先將 Fl Arrest-In Reagent 從 4°C 中拿出，在室溫靜置十分鐘以回溫成室溫，將 2ug DNA 稀釋在 50uL transfection medium 中，10uL Fl Arrest-In reagent 稀釋於 50uL transfection medium 中，將兩種溶液均勻混合後靜置於室溫十分鐘。移除舊有 DMEM，用 transfection medium 清洗細胞兩次後，放入 900uL transfection medium，之後加入 DNA/Fl Arrest-In 混合液，於 37°C 培養箱中培養 4 小時後移走培養液，加入 1.5mL DMEM complete，繼續培養。

#### **四、藥物篩選**

在使用核酸干擾降低蛋白表現實驗中，以嘌呤黴素 ( puromycin )

篩選被短暫性轉染的細胞。細胞在短暫性轉染後於 37°C 培養箱中以 DMEM complete 培養 24 小時，之後進行藥物篩選。移除舊有 DMEM，使用含有 3uM 嘌呤黴素 (puromycin) 的 DMEM complete 進行藥物篩選 72 小時後再將細胞收起進行免疫螢光染色或西方點墨法。

## 五、轉型作用

將保存於 -80°C 的勝任細胞 (DH5 $\alpha$ ) 放置於冰上回溶，待回溶後加入適量 DNA，繼續置於冰上二十分鐘，之後以 42°C 熱處理九十秒，再置於冰上五分鐘，加入 800 uL LB，於 37°C 培養箱中以 175rpm 震盪培養四十五分鐘。培養後將菌液離心，去除大部分上清液，以剩餘上清液將菌液回溶後塗抹於含有抗生素的 LB agar plate 上，於 37°C 培養箱中培養 16~18 小時後將 plate 收起。

## 六、小量質體製備

將含有質體的菌體培養於 3 mL 含有抗生素的 TB 或 LB 培養液，於 37°C、175rpm 培養箱中震盪培養 16~18 小時。將培養後菌液以 13000rpm 離心 5 分鐘，去除上清液，加入 150 uL Solution I (25mM Tris-HCl pH8.0、10mM EDTA pH8.0、50mM glucose) 沖散沉澱菌體，加入 300 uL Solution II (0.2N NaOH、1%SDS) 小心的上下翻轉離心管以混合，靜置三至五分鐘，加入 225 uL Solution III (5M Potassium

Acetate 60mL, pH5.5, 11.5mL Glacial Acid, 28.5mL ddH<sub>2</sub>O) 小心上下翻轉離心管混合溶液，在冰上靜置五分鐘，之後以 13000rpm 離心十分鐘，收集上清液。加入 20 uL RNase ( 10mg/mL; Sigma, St. Louis, Mo., USA ) ，於 37°C 水浴槽中作用 5 分鐘，接著加入 600 uL Phenol/Chloroform 並 vortex ，之後以 13000rpm 離心十分鐘，收集最上層液體。加入 2 倍體積 100% EtOH 和 0.1 倍體積的 3M NaOAc ( 24.6g Sodium Acetate anhydrate in ddH<sub>2</sub>O. Adjust the pH to 5.2 with glacial acetic acid for 100mL ) ，混合均勻後置於-20°C 冰箱中 2 小時使 DNA 沉降，之後以 12000rpm 離心 30 分鐘後移除上清液，再加入 70% EOH 沖洗並烘乾，最後以 ddH<sub>2</sub>O 將沉澱的 DNA 回溶。

## 七、大量質體製備

將含有質體的菌體培養於 250 mL 含有抗生素的 TB 或 LB 培養液，於 37°C、175rpm 培養箱中震盪培養 16~18 小時。將菌液轉移至 250 mL 高速離心管中，使用地上型冷凍高速離心機將菌液以 4200 rpm 離心 20 分鐘，去除上清液，加入 5 mL solution I 沖散沉澱菌體，並將菌液轉移至 50 mL 高速離心管中，加入 10 mL solution II 小心上下翻轉數次，加入 7.5 mL solution III，小心上下翻轉數次後置於冰上 5 分鐘，以 14000 rpm 離心 20 分鐘，收集上清液。加入 0.7 倍體積的 isopropanol，置於室溫 10 分鐘後以 10000 rpm 離心 10 分鐘，去除上

清液。以 10 mL TE buffer ( 0.5 mL 1M Tris-HCl, pH8.0; 0.1 mL 0.5M EDTA, pH8.0 for 50mL ) 回溶沉澱物，置於 55°C 水浴槽 5 分鐘，加入 10 mL 冰的 5M LiCl，置於冰上五分鐘，以 4000 rpm 離心 5 分鐘，收集上清液。加入 20 mL isopropanol 並置於冰上 10 分鐘，以 7500 rpm 離心 20 分鐘後以 70 % EtOH 潤洗沉澱物並於烘箱內烘乾。以 0.75 mL TE buffer 回溶沉澱物，置於 55°C 水浴槽 5 分鐘，加入 10 uL RNAaseA ( 10 mg/mL ) 於 37°C 水浴槽作用 15 分鐘，加入 0.75 mL PEG solution ( 13 % PEG, 1.6 M NaCl, 以 0.22um filter 過濾 ) 並強力震盪，置於冰上 overnight。隔天以 13000 rpm 離心 15 分鐘，去除 PEG solution，將沉澱物以 0.75 mL TE buffer 回溶，之後加入一倍體積的 phenol/chloroform，強力震盪後以 13000 rpm 離心 5 分鐘，收集上層液體，重複此步驟四次，再加入一倍體積 chloroform，強力震盪後以 13000 rpm 離心 5 分鐘，收集上層液體。加入兩倍體積 100% EtOH 以及 0.1 倍體積 3M NaOAc，置於-20°C 冰箱兩小時待 DNA 沉降，之後以 13000 rpm 離心 10 分鐘，以 70 % EtOH 潤洗沉澱的 DNA 並烘乾，最後以 ddH<sub>2</sub>O 將沉澱的 DNA 回溶。

## 八、細胞蛋白質萃取

自培養箱中取出細胞後立刻將細胞置於冰上。去除 DMEM 後以 1X PBS 清洗兩次，再以刮勺取下細胞，於 4°C 低溫離心機中以

12000rpm 離心五分鐘，確實移除 1X PBS 後加入含蛋白酶抑制劑的 30 uL cell lysis buffer ( 10mM HEPES、10 mM NaCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub> 及 1m DTT ) 沖散細胞，之後將細胞置於冰上三十分鐘，以 13000rpm 離心三十分鐘後取上清液。萃取出蛋白質直接進行蛋白質電泳分析及西方點墨法。

## 九、蛋白質電泳分析

西方點墨法。使用 10% 之十二烷基硫酸鈉聚丙烯胺凝膠電泳 ( sodium dodecyl sulfate poly-acryamide gel electrophoresis, SDS-PAGE ) 進行蛋白質分析。下膠為 running gel，含 10% acryamind，待其凝固後，再製做上膠 stacking gel，含 5% acryaminde，整體厚度為 0.75mm 之膠體。先將製備好的膠體置於 running buffer 中備用。將細胞萃液之蛋白質利用 Bio-Rad Protein Assay 做蛋白質定量，加入三分之一體積 sample buffer ( 100mM Tris-HCl, pH 6.8、4% SDS、0.2% Bromophenol Blue、20% glycerol )，置於 100°C 乾浴槽中 5 分鐘使其 denature，之後冷卻並離心，將 protein marker ( Prestained Protein Ladder, Fermentas ) 與蛋白質樣本依序注入膠體孔隙中。上層 stacking gel 以 60 伏特通電約三十分鐘，待樣品已通過 stacking gel 集中後，再以 80 伏特跑下層 running gel，將蛋白質以分子量大小進行分離。

## 十、西方點墨法

將聚偏二氟乙烯 ( polyvinylidene difluoride, PVDF ) 膜裁剪至與蛋白質電泳膠同樣大小，短暫置於100% 甲醇中去除疏水性後，去除甲醇，用二次水2分鐘兩次將膜洗淨，再浸入陽極緩衝液II中五分鐘備用。另外再裁剪六片同樣大小的濾紙分別在陽極緩衝液I ( 2片 ) 、陽極緩衝液II ( 1片 ) 、陰極緩衝液 ( 3片 ) 中浸濕，待蛋白質進行電泳分離後，將蛋白質電泳膠取出，去掉stacking gel的部分，準備使用Bio-Rad半乾式轉置組進行轉置 ( Transfer ) 。進行轉置前，先將陽極緩衝液I及陽極緩衝液II浸泡的濾紙置於陽極板上，再依序放上PVDF膜、蛋白質電泳膠及陰極緩衝液浸泡的濾紙，並避免氣泡產生，之後蓋上陰極板及安全蓋，以20伏特的電壓進行轉置三十分鐘。轉置後的PVDF膜浸泡於含5% 脫脂牛奶的PBST緩衝溶液中 ( 含0.2% TritonX-100的1X PBS ) ，在室溫下反應一小時，去除非專一性結合，之後進行一級抗體作用，一級抗體依特地比例稀釋在含2.5% 脫脂牛奶的PBST中，在4°C 中作用over night。隔天以PBST緩衝溶液清洗三次，每次十分鐘，以去除多餘的一級抗體。之後以特定比例稀釋的二級抗體進行作用，於室溫下反應一小時，再經PBST緩衝溶液清洗三次，每次十分鐘，最後以冷光試劑顯色，並在富士冷光影像感應系統下照相。

一級抗體：Rabbit anti-mouse Mob2 ( 1:3000；實驗室自製 )

Rabbit anti-ERM ( 1:1500；cell signaling )

Mouse anti-STK38 ( 1:1000；基因谷 )

Goat anti-phospho-Moesin ( 1:1000；Santa Cruz )

二級抗體:：anti-mouse-HRP ( 1:5000；Jackson ImmunoResearch Lab )

anti-rabbit-HRP( 1:5000；Jackson ImmunoResearch Lab )

Rabbit anti-goat-HRP ( 1:5000；abcam )

## 十一、細胞免疫螢光染色

將細胞置於冰上降溫 20 分鐘後，移除培養液，用 1X PBS 潤洗三次，再以新鮮配置固定液（4% paraformaldehyde / 1X PBS；EMS, Fort Washington, PA., USA）的 PBS 室溫作用 30 分鐘固定細胞後，移走 4% 固定液，以 PBST 清洗三次。將 50uL 的 10% 胎牛血清（於 PBST 中）置於三公分培養皿的上蓋，把有種植細胞的玻片面覆蓋在血清上，在室溫下作用一小時進行非特異性抗體結合（blocking），之後以 PBST 清洗三次。使用特定稀釋比例的一級抗體置於 4°C 作用 12 至 16 小時，以 PBST 清洗三次，以特定稀釋比例（1:200）的二級抗體在室溫下避光作用一小時，以 PBST 清洗三次後以 mounting medium ( 20mL 10X PBS, 100mL glycerol, 4g N-propyl gallate 級 80mL



ddH<sub>2</sub>O, pH8.5) 封片後使用共軛焦顯微鏡 LSM510 ( ZEISS, Germany )

觀察。

一級抗體: Rabbit anti-mouse Mob2 ( 1:300 ; 實驗室自製)

Rabbit anti-phospho-Moesin ( 1:100 ; Santa Cruz)

Mouse anti-STK38 ( 1:100 ; 基因谷 )

Rabbit anti-Myc ( 1:100 ; Santa Cruz )

Phalloidin 標示 F-actin

二級抗體: Donkey anti-mouse-Texas Red ( 1:200 ; invitrogen )

Donkey anti-Goat-Cy5 ( 1:200 ; invitrogen )

Goat anti-Rabbit-Cy5 ( 1:200 ; Jackson ImmunoResearch Lab )

Donkey anti-mouse-647 ( 1:200 ; Jackson ImmunoResearch  
Lab )

SYTOX 標示細胞核

## 結果

### 一、 Mob2、NDR 在 NIH3T3 細胞株中的表現位置：

為了解 Mob2 及 NDR 是否影響微絲蛋白 (actin) 在細胞內的重組，我們選擇了 NIH3T3 細胞株做為實驗對象，此細胞株具有明顯的應激纖維 (stress fiber)，應激纖維由微絲蛋白聚集成肌動蛋白纖維束 (actin filament, F-actin) 後組成，所以我們可藉由細胞免疫螢光染色及螢光顯微鏡或雷射掃描共軛焦顯微鏡觀察細胞內應激纖維的排列組成或細胞型態是否產生改變。

NIH3T3 為老鼠胚胎纖維母細胞 (Swiss mouse embryonic fibroblast cells)，是在 1962 年由兩名科學家使用十七到十九天的老鼠胚胎所建立的細胞株 (Todaro and Green, 1963)。由過去文獻中已知，此細胞株當生長在細胞密度低的情況時，細胞型態為攤平的多角型，並可能具有纖細的分支，分支末端呈現尖細型。當細胞密度高時，細胞在外型上呈現攤平的多角型並且很少具有細長且末端尖細的分支 (Shelden, 1999)。

為了要瞭解 Mob2 及 NDR 在細胞中的表現位置，我們將未經處理的細胞貼附 24 小時後，經過固定進行細胞免疫螢光染色及螢光顯微鏡觀察。藍色螢光標定的是細胞核位置，綠色是鬼筆環肽 (phalloidin) 標示 actin filament，紅色則分別是 Mob2 及 NDR (圖二、

三、四)。

為了能夠探討Mob2的功能，我們實驗室製備了小鼠Mob2抗體。將帶GST的小鼠Mob2全長蛋白質當成抗原，在大腸桿菌中大量表達並純化後，注射進大白兔體內使之產生免疫反應，產生抗小鼠Mob2的抗體，最後收集大白兔血清得到小鼠Mob2多株抗體。

在Mob2的表現位置部份，由細胞免疫螢光染色及雷射共軛焦顯微鏡觀察結果發現，在低倍和高倍視野下皆可觀察到Mob2表現在細胞質中，沒有表現在細胞核內，且在細胞核周圍有較明顯聚集的現象，呈現點狀分布(圖二)。為了確定Mob2抗體的專一性，我們將Mob2抗體與抗原蛋白在進行細胞免疫螢光染色前先做中和作用(pre-absorption)再進行免疫螢光染色，在所有拍攝條件皆相同情況下可看到訊號與實驗組相比有明顯減弱的現象(圖三)，顯示我們自己製備的Mob2抗體可專一的辨識細胞內Mob2蛋白質。

在NDR的表現位置部份，我們所使用的抗體可辨識NDR1與NDR2序列相同的部分(STK38 monoclonal antibody)，因此染色結果可同時觀察到NDR1以及NDR2的表現位置。由染色結果可觀察到NDR同時表現在細胞核及細胞質中，而在一些正在移動的細胞中，NDR會表現在細胞移動的前方(leading edge)(圖四)。過去文獻中指出NDR2蛋白質表現在細胞質及膜上(cytoplasmic /

membranous kinase) (Devroe *et al.*, 2004; Hergovich *et al.*, 2005; Stegert *et al.*, 2005; Stegert *et al.*, 2004) , NDR1 最初被認為是表現在細胞核中的蛋白 (Devroe *et al.*, 2004; Dveroe *et al.*, 2005; Millward *et al.*, 1995) , 但也有一些文獻指出 NDR1 也表現於細胞質中 (Hergovich *et al.*, 2005) 。

## 二、Mob2 與 NDR 影響細胞型態：

接下來我們想要探討 Mob2 與 NDR 是否參與在微絲蛋白的重組。因為微絲蛋白為對細胞型態影響重要的細胞骨架，當微絲蛋白重組時可能使細胞產生型態上的改變，例如使細胞具有板狀偽足、絲狀偽足或微絨毛等，所以我們想要觀察在細胞中大量表達 Mob2 或 NDR1/2 時是否會影響細胞外型。我們在 NIH3T3 細胞株中大量表現 Mob2、NDR 以及 Mob2 / NDR 一起大量表現做為實驗組，以在細胞株中表達 LacZ 做為控制組，觀察細胞在形態上是否產生改變。

由過去文獻中已知，纖維母細胞在貼附過程中，一個小時 F-actin 會聚集形成 dorsal stress fiber 及動態的環型束 (circular bundle) ，在二至三小時環型束會進行重組，在四小時 F-actin 會形成 stress fiber ，形成 stress fiber 的 F-actin 很穩定，不會像環型束階段一樣發生重組，所以細胞在型態上也很穩定 (Senju and Miyata, 2009) 。因此我們在細胞中以短暫性轉染方式大量表現 Mob2 及 NDR 後，先將細胞培養

24 小時，使細胞製造出外生性蛋白質，再以胰蛋白酶將細胞重新懸浮再貼附，讓細胞在大量表現 Mob2 及 NDR 的背景下重新貼附生長，最後以細胞免疫螢光染色及雷射共軛焦顯微鏡觀察細胞在型態上是否產生改變。

由免疫螢光染色結果看到，控制組細胞的型態與原生型的纖維母細胞型態相同，在細胞高密度生長情況下，細胞皆為攤平的型態並且少有纖細的分支形成。但在 Mob2 與 NDR1/2 大量表現的實驗組細胞中，細胞一樣生長在高密度的情況下，有部分比例的細胞在型態上產生改變，細胞具有細長的分支，且分支的末端不是像正常一樣呈尖細型而是呈現平面的點狀，且有的分支上有結點的形成（圖五）。在圖五中，紅色標定的是 Myc，代表的是有 LacZ 或 Mob2 轉染的細胞，綠色是 GFP，代表有被 NDR1 或 NDR2 轉染的細胞，黃色則是 Myc 和 GFP 的重疊圖，代表同時被 NDR1/2 及 Mob2 轉染的細胞。而為了瞭解細胞的型態和控制組相比較是否有顯著差異，所以我們對有多少被短暫性轉染細胞具有分支以及這些分支的數目及長度進行統計分析。統計方式是使用雷射共軛焦顯微鏡拍攝被短暫性轉染的細胞，再計數有多少細胞具有分支以及分支的數目和長度，計算完細胞數目與分支數及長度後以 Excel 進行統計分析。

統計結果顯示，在控制組細胞中約有 30% 的被轉染細胞具有分支，

在實驗組 Mob2 大量表現的細胞中，約有 70 % 的被轉染細胞具有分支，NDR1 和 NDR2 約有 60 %，Mob2 / NDR 一起大量表現的話則約有 70 % ~ 80 % 的被轉染細胞具有分支，顯示 Mob2 和 NDR 的確會使細胞在型態上產生改變，且 Mob2 / NDR 一起大量表現所造成的影響比單獨大量表現有稍微增加分支數目的現象（圖六）。在分支的數目上，把具有分支的細胞區分為具有一個分支或具有超過一個分支，在控制組細胞中，約有 1/3 的被轉染細胞具有超過一個分支，約有 2/3 的被轉染細胞具有一個分支；Mob2 大量表現，Mob2 約有 70% 的細胞具有分支，而其中約有 35% 只有一個或超過一個分支；在 NDR 或 Mob2 / NDR 一起表現的結果也類似，約有 70% 的細胞具有分支，而其中約有 35% 只有一個或超過一個分支（圖七）。和控制組的約 2 / 3 細胞具一個分支相比較可顯示，Mob2 與 NDR 不僅會促使細胞形成分支，且在分支的數目上也會稍微增加。而在分支長度的統計上，我們以共軛焦顯微鏡影像瀏覽軟體（LSM Image Browser; Zeiss）量測分支長度（圖八）後計算每個分支的長度，最後以 Excell 進行統計分析，比較實驗組與控制組在分支平均長度上是否有差異。由統計結果得知，控制組細胞的分支平均長度約為 30um，在 Mob2 及 NDR 大量表現中細胞的分支長度約為控制組的兩倍，為 50~60um（圖九），因此，在細胞中大量表達 Mob2 以及 NDR1/2 會增加分支的長度。綜

合以上統計結果得知，在細胞中大量表現 Mob2 及 NDR1/2 或一起大量表現 Mob2/NDR 可使細胞在型態上發生改變，使細胞產生突出的分支 (membrane protrusion)，且分支的數目比控制組細胞稍微增加，分支的長度和控制組相比較也有增長的情形。

### 三、Mob2 / NDR 與 Moesin 的磷酸化

在觀察到 Mob2 / NDR 會改變細胞的型態後，接下來我們想探討 Mob2 / NDR 是透過調控什麼分子以達到這樣的現象?因為在細胞中主要參與影響細胞型態的細胞骨架為微絲蛋白 (actin)，因此我們推測 Mob2 / NDR 可能藉由調控某個 actin-associated protein 的活性，藉由調控此 actin-associated protein 的活化與否進而影響微絲蛋白的重組然後達到改變細胞型態的目的。而在實驗室先前的研究中發現，在果蠅感光細胞中表達不具酵素催化活性 (kinase-dead) 的 Tricornered (果蠅中 NDR 蛋白家族中的其中一員)，會減少磷酸化 Moesin 這個可連接細胞膜上蛋白質與細胞質中微絲蛋白的輔助性蛋白質在感光細胞中的表現量。因此我們推測：Mob2 / NDR 是藉由將 Moesin 磷酸化，使其具有活性，而影響微絲蛋白的重組，進而使細胞型態產生改變。

於是我們在細胞中短暫性轉染控制組的 LacZ，以及實驗組的

Mob2 或 NDR 或 Mob2 / NDR 一起大量表達，接著收取細胞並萃取細胞中的蛋白質進行西方點墨法，對 p-Moesin 的表現量進行定量，以了解 Mob2 和 NDR 是否可調控 Moesin 磷酸化。

由西方點墨法結果中看到，不管是在 Mob2 和 NDR 單獨大量表達或一起大量表現下皆會使 p-Moesin 的表現量增加，而經過和控制組  $\alpha$ -tubulin 以及 LacZ 正常化後的定量結果，在 Mob2 大量表現下，p-Moesin 的量增加約兩倍，而在 NDR1/2 大量表現及 Mob2 和 NDR 一起大量表達下也有相同結果，p-Moesin 的表現量皆約比控制組增加兩倍（圖十）。所以接下來我們使用核酸干擾方式（shRNA）降低細胞內 Mob2 和 NDR 的表現量，看是否影響 p-Moesin 的表現量。

我們所使用的 shRNA 購自中研院國家型干擾性核糖核酸核心設施，每個基因各有五個 shRNA，所有 shRNA 都構築在 pLKO.1 質體上，質體上不帶 Tag，帶有嘌呤黴素（puromycin）抗藥性基因，因此我們可在細胞培養液中加入嘌呤黴素進行篩選，若細胞有被短暫性轉染，則細胞會製造出嘌呤黴素，就可在含有嘌呤黴素的培養液中存活，反之，沒有被轉染的細胞則會死亡。我們先將未經任何處理的細胞培養於含嘌呤黴素的培養液中二十四小時待細胞穩定貼附生長，將培養液換成含嘌呤黴素的培養液，測試要使用多少濃度及經過多少時間後，細胞會全數死亡。測試後得知，將細胞以 3 $\mu$ M 的嘌呤黴素培



養液進行 72 小時培養後，細胞將全部死亡（圖十一），因此我們將細胞進行短暫性轉染 24 小時後，換成含有嘌呤黴素的培養液進行藥物篩選 72 小時，再收集存活的細胞並萃取細胞內蛋白質進行西方點墨法，先篩選出降低 Mob2 及 NDR 表達量最好的 shRNA 質體，再以此質體進行短暫性轉染和西方點墨法，然後對 p-Moesin 的表現量進行定量。

由西方點墨法及定量結果得知，在 Mob2 降低表現下，核酸干擾使 Mob2 的蛋白表現量下降約 80%，在此情況下 p-Moesin 的表現量下降約 50%（圖十二）；在 NDR 降低表現方面，是將 NDR1 及 NDR2 同時降低表現，由統計結果可看到 NDR1/2 的表現量下降到剩約 17%，在此情況下 p-Moesin 的表現量下降約 80%，約只剩 20%（圖十三）。由西方點墨法結果得知，Mob2 與 NDR 的表現量會影響 p-Moesin 的表現量，因此 Mob2 和 NDR 可調控 Moesin 的活化。

#### **四、降低 Mob2 / NDR 的表達不影響細胞型態與應肌纖維組成**

接下來我們想要瞭解，在細胞中降低 Mob2/NDR 的表現量是否影響細胞型態。因此我們在細胞株中以核酸干擾方式同時降低 Mob2 與 NDR 的表現量，並使用雷射共軛焦顯微鏡觀察細胞型態或應激纖維的組成是否受到影響。由實驗結果（圖十四）可觀察到，經由細

胞免疫螢光染色結果，同時降低 Mob2 與 NDR 的表現量的確可降低 p-Moesin 的表現量，但並未改變細胞型態或應激纖維的組成（圖十五）。

綜合以上實驗結果，細胞內生性 Mob2 表現於細胞質中，並於細胞核周圍有較明顯聚集的現象；內生性 NDR1/2 表現於細胞核與細胞質中。在正常情況下當 NIH 3T3 細胞株生長於高密度狀態時，細胞在外觀上呈現攤平的多角型，少有分支形成，然而當在細胞中大量表達 Mob2 / NDR 時會使細胞即使在高密度情況下仍會形成許多細長分支，且分支的數目與長度皆比控制組多。此外我們發現，當在細胞株中大量表達 Mob2/NDR 會增加 p-Moesin 的表達量；降低 Mob2 或 NDR 則會減少 p-Moesin 的表達量，因此在細胞株中大量表達 Mob2 與 NDR 時，可能是藉由調控 Moesin 這個 actin-associated protein 是否磷酸化，而使細胞內微絲蛋白發生重組，進而改變細胞型態。

## 討論

細胞極性與型態發育對生物體在發育及功能上皆扮演重要角色，當細胞失去對型態發育的調控不僅會使生物體無法正常發育，細胞內細胞骨架的重新分布也可能使細胞具有其他功能，例如爬行，而可能造成腫瘤細胞的轉移。在本研究中，我們研究小鼠 *mob2* 基因，此基因在過去已知在酵母菌中是參與在極性形成上，當失去作用時將使細胞無法具有雙極性；而對果蠅感光細胞在發育中也扮演重要角色，當失去作用時不僅使果蠅感光細胞無法正常發育也會影響極性蛋白的表現位置；而在小鼠神經纖維母細胞中大量表現 *mob2* 則會促使神經纖維產生。因此我們認為 *mob2* 在細胞型態發生上具重要功能，而確定 *mob2* 確實影響細胞型態及探討 *mob2* 是透過調控何種蛋白活性而達到此目的則是本實驗的方向。

### 一、 *Mob2* 與 *NDR* 在細胞中的表現位置與功能探討：

在未經過任何處理的胚胎纖維母細胞中，我們經由實驗結果觀察到，*Mob2* 表現在細胞質中，特別是靠近核的周圍；*NDR* 在細胞質及細胞核中皆有表現，在我們依型態判斷為正在移動的細胞中，*NDR* 會表現在細胞的前緣；除了 *Mob2* 與 *NDR* 的表現位置外，我們也觀察了內生性磷酸化 *Moesin* 在細胞中的表現位置，磷酸化 *Moesin* 是表現於細胞質及細胞膜上。由這樣的結果我們認為 *NDR* 及磷酸化

Moesin 可能在移動的細胞中會一起表現於移行前緣的細胞膜上，雖然在 NIH 3T3 細胞株中 Mob2 沒有觀察到在細胞膜上有表現，但在實驗室其他細胞株中觀察到 Mob2 會表現於細胞膜上。在分化後期具有強力爬行能力的肝細胞株中，觀察到 Mob2 及 NDR 和磷酸化 Moesin 會共同表現於細胞膜上。由表現位置的相同使我們可初步推測此三個蛋白質在功能上可能有互相調控的可能性。且在過去文獻中發現，人類的 MOB 可能會將 NDR 帶到細胞膜上，使 NDR 與它的上游激酶（可將 NDR 的 hydrophobic motif 磷酸化的激酶）接近，讓 NDR 被磷酸化，而 MOB 則可使 NDR 在 kinase segment 的位點被磷酸化，使 NDR 具有完整的活性（Hergovich *et al.*, 2005）。

Mob2 與 Mob 家族中的其他蛋白質在結構上具有 Mob1 / Phocain domain，此 domain 約占 Mob2 全長的三分之二，此部位也被認為可能是真正影響 Mob 蛋白質功能的區域。在實驗室小鼠神經纖維母細胞株中發現，Mob2 參與神經纖維分化；在過去文獻中指出 Phocain 參與小腦 Purkinje cell 神經脊的發育與重塑，因此，Mob2 與 Phocain 在功能上可能有相似之處。除了參與在神經脊的分化外，Phocain 也參與在胞膜傳遞與細胞內的訊息傳導上，Mob 家族中的蛋白質也許也有類似功能。

NDR 表現在細胞核、細胞質以及細胞膜上，過去文獻中指出在

細胞核中的為 NDR1，而 NDR2 則是會表現於細胞質及細胞膜的蛋白質。NDR 在生理上的意義目前在酵母菌和果蠅中了解較多，但分子的調控機制上則是在哺乳類動物中較多，在行出芽的酵母菌 *S. cerevisiae* 中 NDR 參與在 mitotic-exit network (MEN) 中，MEN 開始先活化 small G protein Tem1p，接著活化 Cdc15 蛋白質激酶，再活化 Mob1p / Dbf2p 並使去磷酸化酶 Cdc14p 從細胞核移到細胞質中，最後使細胞完成減數分裂；Mob2p / Cbk1p 在 RAM (regulation of Ace2p activity and cellular morphogenesis) 中可調控 Ace2p 這個 daughter-cell-specific 的 separation gene 的表達。果蠅中的 Lats 參與 hippo pathway，經由 Hpo-Sav-Lats-Dmob-Yki 路徑活化 Diap1 與 cyclin E 等基因以控制細胞凋亡與增生，在哺乳類細胞中也有相對應路徑 (MST1 / 2-WW45-LATS1-hMOB1A)；另一個 NDR 蛋白 Tricorned 的功能為調節 dendritic tiling and branching。在哺乳類中，NDR1 與 centrosome 的複製有關，在細胞中大量表達 NDR1 會使細胞的 centrosome 增加；在培養的 PC-12 以及大腦皮質細胞中大量表現 NDR2 則可促使神經纖維生長及分化。Mob 蛋白質家族可幫助活化 NDR 激酶，可能也參與在這些生理功能上。

## 二、Mob2 / NDR 與細胞型態：

Mob 家族中的蛋白質在過去已被認為是 NDR 激酶的 co-activator，

Mob2 可與 NDR 蛋白質 N 端的 SMA 區域結合，使 NDR 位在活化片段 (activation segment) 的磷酸化位點可自我磷酸化，讓 NDR 具有部分活性。且在過去文獻及實驗室結果中已知 NDR2 與 Mob2 皆會促使細胞分化出神經纖維，因此在此實驗中我們探討了 Mob2、NDR 以及 Mob2 / NDR 共同作用下，在纖維母細胞株中對細胞型態的影響。由實驗統計結果得知，當在細胞中大量表達 Mob2 或 NDR 或兩者一起大量表達，皆會促使細胞在型態上產生變化，使細胞形成細長的分支，而在分支數目上，Mob2 單獨大量表現比 NDR 大量表現有較多的分支形成，當兩者共同大量表現時則會比單獨大量表現有些微增加的現象，但沒有顯著差異。實驗室過去在神經纖維母細胞中大量表現 Mob2 和 NDR 下，大量表現 Mob2 比大量表現 NDR 有更多比例的細胞有神經纖維形成，與本實驗的實驗結果相同。

已知影響細胞型態的細胞骨架為微絲蛋白，微絲蛋白在真核細胞中含量豐富，約占細胞中蛋白總重量的十分之一。微絲蛋白具極性，分正、負端，微絲蛋白單體稱為 G-actin (Globular actin)，平常可與 ATP 或 ADP 結合，ATP 結合於微絲蛋白的負端，與 ATP 結合的微絲蛋白可加入聚集過程，使微絲蛋白單體聚集成螺旋狀的 F-actin，與 ADP 結合的微絲蛋白無法加入聚集的過程，且會從 F-actin 離開，F-actin 結構在 ATP-G-actin 聚集、ADP-G-actin 離開的過程下，最後

在細胞質中會達到動態平衡。也因為微絲蛋白本身具有正負端以及聚集過程中正端的聚集速度較快，使細胞膜可向外突出，讓細胞在外型上發生改變。Mob2 與 NDR 可能藉由調控某些可與 F-actin 有交互作用的蛋白質活性，讓該蛋白可改變 F-actin 的組合，將 F-actin 帶到細胞膜上進而使細胞型態改變。

在過去研究中，NIH 3T3 細胞株生長在高密度時很少形成分支可能是因為 contact-inhibition，然而當在 NIH 3T3 細胞株中大量表現 Ras 可促使細胞形成細長分支，即使細胞生長在高密度情況下仍會形成分支，分支的末端呈現扁平狀，且細胞會往分支形成的分向移動 (Shelden., 1999)。而 Ras 所造成的細胞型態變化與 Rho 蛋白質的活性有密切相關 (Khosravi-Far *et al.*, 1995)。在我們的實驗中，我們沒有觀察細胞的動態生長情形，所以不清楚當細胞大量表達 NDR 與 Mob2 而形成細長分支時，是否也會影響細胞的移行。

### 三、Mob2 / NDR 參與 Moesin 磷酸化：

在過去由果蠅感光細胞研究中已知，當 Mob2 失去活性時會影響極性分子 Crumb 與磷酸化 Moesin 的表現位置，Crumb 會從 stalk 移到 rhabdomere base，p-Moesin 會從 actin-rich 的 rhabdomere base 移到 cytosol，在果蠅感光細胞中表達不具酵素催化活性的 Tricorned 則會降低 p-Moesin 的表現量。在本實驗中，我們利用西方點墨法看到當

大量表現 Mob2、NDR 及 Mob2 / NDR 時可增加 p-Moesin 的表現量；當降低 Mob2 時則會減少 p-Moesin 的量，而在降低 NDR 表現時也可看到同樣減少 p-Moesin 的量，顯示 Mob2 和 NDR 的確參與在 Moesin 的磷酸化過程中。

過去已知 Rho kinase 參與在 ERM 蛋白質家族的磷酸化過程中，而 Moesin 可連接 F-actin 與細胞膜上蛋白質，可能在 Mob2 將 NDR 活化後，NDR 可直接或間接將 Moesin 磷酸化，p-Moesin 的 N 端可與細胞膜上的結合，因此 p-Moesin 可用 C 端與 F-actin 結合並將 F-actin 攜帶到細胞膜上，完成使 F-actin 重組的動作，也使細胞型態發生改變。

而在實驗結果中觀察到，在細胞株中大量表達 Mob2 和 NDR 或使細胞在型態上產生變化，但在細胞株中降低 Mob2 和 NDR 的表現量時並不會影響細胞型態或應激纖維的組成。由過去文獻中得知，在將 *moesin* 基因剔除的小鼠中，小鼠的發育及生長情形並未受到影響，且纖維母細胞仍可擁有正常形狀與形成應激纖維，推測原因可能是因為 Moesin 蛋白質屬於 ERM 蛋白質家族，此蛋白質家族中的蛋白質 (Ezrin、Radixin、Moesin) 在胺基酸序列及功能上皆具有相似角色，所以當 Moesin 降低表現時仍有 Ezrin 與 Radixin 可在功能上扮演補償的作用，使細胞與生物體仍可正常發育與生長 (Doi *et al.*, 1999)。



Mob2 做為 NDR 的 co-activator，可能因為大量表現 Mob2 下可活化細胞質中未被活化的很多 NDR，所以可使大量細胞在型態上發生改變；而大量表現 NDR 時，可能因為細胞質中沒有足夠的 Mob2 使 NDR 活化，所以細胞雖然有細長分支形成，但數目比 Mob2 大量表現略少，或者是 Mob2 也可經由其他路徑改變細胞型態，不一定要與 NDR 合作。但因為 Mob2 大量表現與 NDR 大量表現下皆會增加 p-Moesin 的量；Mob2 降低表現及 NDR 降低表現情況下皆會使 p-Moesin 的表現量減少，因此我認為 Mob2 還是經由將 Moesin 磷酸化而達到改變細胞型態的結果，但不能排除 Mob2 是自己直接將 Moesin 磷酸化或是經由活化其他蛋白而將 Moesin 磷酸化的可能性。此部分實驗可能可經由 pull-down assay 確定小鼠中 Mob2 是否確實與 NDR 間有結合，以及 *in vitro* kinase assay 探討 Mob2 是否可單獨將 Moesin 磷酸化或必須有 NDR 的加入才可以將 Moesin 磷酸化來得到釐清，但 NDR 與 Mob2 不一定是直接將 Moesin 磷酸化，也有可能是間接將 Moesin 磷酸化。此外，在實驗結果中，不論是在細胞型態上的統計結果或西方點墨法對於 p-Moesin 的表現量定量結果，當共同大量表達 NDR/Mob2 時並不會使實驗結果有加乘現象。可能因為 NDR 尚須要另外一個 kinase 將 C 端 hydrophobic motif 磷酸化位點也磷酸化（例如在人類中為 MST）才可完整具有活性，但細胞中 MST

蛋白質的量有限，所以當我們只大量表達 Mob2 或 NDR 時只能達到某部分效果。而在此實驗中我們認為 Moesin 的活性與 NDR 及 Mob2 有關，因為已知 Moesin 在 C 端具有一個可被磷酸化的 threonine，因此可透過將 Moesin 的磷酸化位點改成不可被磷酸化的胺基酸，例如 alanine，於細胞中表達，再經過同樣的實驗步驟，看是否會改變由 NDR 與 Mob2 造成的分支形成結果，來更加確定 NDR/Mob2 與 Moesin 磷酸化間的關係。

## 参考文献

- Algrain, M., Turunen, O., Vaheri, A., Louvard, D., and Arpin, M. (1993). Ezrin contains cytoskeleton and membrane binding domains accounting for its proposed role as a membrane-cytoskeletal linker. *J. Cell Biol.* *120*, 129-139.
- Assemat, E., Bazellieres, E., Pallesi-Pocachard, E., Le Bivic, A., and Massey-Harroche, D. (2008). Polarity complex proteins. *Biochim. Biophys. Acta* *1778*, 614-630.
- Baillat, G., Gaillard, S., Castets, F., and Monneron, A. (2002). Interactions of phocein with nucleoside-diphosphate kinase, Eps15, and Dynamin I. *J. Biol. Chem.* *277*, 18961-18966.
- Baillat, G., Moqrich, A., Castets, F., Baude, A., Bailly, Y., Benmerah, A., and Monneron, A. (2001). Molecular cloning and characterization of phocein, a protein found from the Golgi complex to dendritic spines. *Mol. Biol. Cell* *12*, 663-173..
- Bailly, Y.J., and Castets, F. (2007). Phocein: A potential actor in vesicular trafficking at Purkinje cell dendritic spines. *Cerebellum* *23*,1-9.
- Bichsel, S.J., Tamaskovic, R., Stegert, M.R., and Hemmings, B.A. (2004). Mechanism of activation of NDR (nuclear Dbf2-related) protein kinase by the hMOB1 protein. *J. Biol. Chem.* *279*, 35228-35235.

- Bretscher, A., Edwards, K., and Fehon, R.G. (2002). ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 586-599.
- Bryant, D.M., and Mostov, K.E. (2008). From cells to organs: building polarized tissue. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 887-901.
- Chhabra, E.S., and Higgs, H.N. (2007). The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat. Cell Biol.* 9, 1110-1121.
- Colman-Lerner, A., Chin, T.E., and Brent, R. (2001). Yeast Cbk1 and Mob2 activate daughter-specific genetic programs to induce asymmetric cell fates. *Cell* 107, 739-750.
- Devroe, E., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Silver, P.A. (2004). Human Mob proteins regulate the NDR1 and NDR2 serine-threonine kinases. *J. Biol. Chem.* 279, 24444-24451.
- Devroe, E., Silver, P.A., and Engelman, A. (2005). HIV-1 incorporates and proteolytically processes human NDR1 and NDR2 serine-threonine kinases. *Virology.* 331, 181-189.
- Doi, Y., Itoh, M., Yonemura, S., Ishihara, S., Takano, H., Noda, T., and Tsukita, S. (1999). Normal development of mice and unimpaired cell adhesion/cell motility/actin-based cytoskeleton without compensatory up-regulation of ezrin or radixin in moesin gene knockout. *J. Biol Chem.* 274, 2315-2321.

- Emoto, K., He, Y., Ye, B., Grueber, W.B., Adler, P.N., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2004). Control of dendritic branching and tiling by the Tricornered-kinase/Furry signaling pathway in *Drosophila* sensory neurons. *Cell* *119*,245-256.
- Franck, Z., Gary, R., and Bretscher, A. (1993). Moesin, like ezrin, colocalizes with actin in the cortical cytoskeleton in cultured cells, but its expression is more variable. *J. Cell Sci.* *105*, 219-131.
- Goldstein, B., and Macara, I.G. (2007). The PAR proteins: fundamental players in animal cell polarization. *Dev. Cell.* *13*, 609-622.
- He, Y., Emoto, K., Fang, X., Ren, N., Tian, X., Jan, Y.N., and Adler, P.N. (2005). *Drosophila* Mob family proteins interact with the related tricornered (Trc) and warts (Wts) kinases. *Mol. Biol. Cell* *16*, 4139-4152.
- He, Y., Fang, X., Emoto, K., Jan, Y.N., and Adler, P.N. (2005). The tricornered Ser/Thr protein kinase is regulated by phosphorylation and interacts with furry during *Drosophila* wing hair development. *Mol. Biol. Cell* *16*, 689-700.
- Hergovich, A., Bichsel, S.J., and Hemmings, B.A. (2005). Human NDR kinases are rapidly activated by MOB proteins through recruitment to the plasma membrane and phosphorylation. *Mol. Cell Biol.* *25*, 8259-8272.

- Hergovich, A., Lamla, S., Nigg, E.A., and Hemmings, B.A. (2007).  
Centrosome-associated NDR kinase regulates centrosome duplication.  
*Mol. Cell.* 25, 625-634.
- Hergovich, A., Stegert, M.R., Schmitz, D., and Hemmings, B.A. (2006).  
NDR kinases regulate essential cell processes from yeast to humans.  
*Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 253-264.
- Hou, M.C., Wiley, D.J., Verde, F., and McCollum, D. (2003). Mob2p  
interacts with the protein kinase Orb6p to promote coordination of cell  
polarity with cell cycle progression. *J. Cell Sci.* 116, 125-135.
- Humbert, P.O., Dow, L.E., and Russell, S.M. (2006). The Scribble and Par  
complexes in polarity and migration: friends or foes? *Trends Cell Biol.*  
16, 622-630.
- Iden, S., and Collard, J.G. (2008). Crosstalk between small GTPase and  
polarity proteins in cell polarization. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9,  
846-859.
- Jaffe, A.B., and Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology.  
*Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 247-269.
- Ladwein, M., and Rottner, K. (2008). On the Rho'd: the regulation of  
membrane protrusions by Rho-GTPases. *FEBS Lett.* 18, 2066-2074.
- Li, R., and Gundersen, G.G. (2008). Beyond polymer polarity: how the  
cytoskeleton builds a polarized cell. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9,  
860-873.

- Liu, L.Y., Lin, C.H., and Fan, S.S. (2009). Function of *Drosophila* mob2 in photoreceptor morphogenesis. *Cell Tissue Res.* 338, 377-389.
- Luca, F.C., and Winey, M. (1998). MOB1, an essential yeast gene required for completion of mitosis and maintenance of ploidy. *Mol. Biol. Cell* 9, 29-46.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912-1934.
- Matsui, T., Maeda, M., Doi, Y., Yonemura, S., Amano, M., Kaibuchi, K., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1998). Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J. Cell Biol.* 140, 647-657.
- McCartney, B.M., and Fehon, R.G. (1996). Distinct cellular and subcellular patterns of expression imply distinct functions for the *Drosophila* homologues of moesin and the neurofibromatosis 2 tumor suppressor, merlin. *J. Cell Biol.* 133, 843-852.
- Millward, T., Cron, P., and Hemmings, B.A. (1995). Molecular cloning and characterization of a conserved nuclear serine(threonine) protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92, 5022-5026.
- Millward, T.A., Heizmann, C.W., Schäfer, B.W., and Hemmings, B.A. (1998). Calcium regulation of Ndr protein kinase mediated by S100 calcium-binding proteins. *EMBO* 17, 5913-5922.

- Nakamura, F., Amieva, M.R., and Furthmayr, H. (1995). Phosphorylation of threonine 558 in the carboxyl-terminal actin-binding domain of moesin by thrombin activation of human platelets. *J. Biol. Chem.* *270*, 31377-31385.
- Pearson, M.A., Reczek, D., Bretscher, A., and Karplus, P.A. (2000). Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell* *101*, 259-270.
- Pietromonaco, S.F., Simons, P.C., Altman, A., and Elias, L. (1998). Protein kinase C-theta phosphorylation of moesin in the actin-binding sequence. *J. Biol. Chem.* *273*, 7594-7603.
- Polesello, C., Delon, I., Valenti, P., Ferrer, P., and Payre, F. (2002). Dmoesin controls actin-based cell shape and polarity during *Drosophila melanogaster* oogenesis. *Nat. Cell Biol.* *4*, 782-789.
- Senju, Y., and Miyata, H. (2009). The role of actomyosin contractility in the formation and dynamics of actin bundles during fibroblast spreading. *J. Biochem.* *145*, 137-150.
- Shelden, E. (1999). Major role for active extension in the formation of processes by ras-transformed fibroblasts. *Cell Motil. Cytoskeleton.* *42*, 12-26.



- Stegert, M.R., Hergovich, A., Tamaskovic, R., Bichsel, S.J., and Hemmings, B.A. (2005). Regulation of NDR protein kinase by hydrophobic motif phosphorylation mediated by the mammalian Ste20-like kinase MST3. *Mol. Cell Biol.* 25, 11019-11029.
- Stegert, M.R., Tamaskovic, R., Bichsel, S.J., Hergovich, A., and Hemmings, B.A. (2004). Regulation of NDR2 protein kinase by multi-site phosphorylation and the S100B calcium-binding protein. *J. Biol. Chem.* 279, 23806-23812.
- Stork, O., Zhdanov, A., Kudersky, A., Yoshikawa, T., Obata, K., and Pape, H.C. (2004). Neuronal functions of the novel serine/threonine kinase Ndr2. *J. Biol. Chem.* 279, 45773-45781.
- Todaro, G.J. and Green, H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell Biol.* 17, 299-313.
- Tsukita, S., Oishi, K., Sato, N., Sagara, J., Kawai, A., and Tsukita, S. (1994). ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J. Cell Biol.* 126, 391-401.
- Tsukita, S., and Yonemura, S. (1999). Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *J. Biol Chem.* 274, 34507-34510.

Tsukita, S., Yonemura, S., and Tsukita, S. (1997). ERM proteins: head-to-tail regulation of actin-plasma membrane interaction. *Trends Biochem. Sci.* 22, 53-58.

## 圖表目錄

圖一	小鼠 Mob2 家族中所有蛋白之核苷酸序列 . . . . .	53
圖二	Mob2 在 NIH3T3 細胞株中表現的位置 . . . . .	54
圖三	Mob2 抗體具專一性 . . . . .	55
圖四	NDR 在 NIH3T3 細胞株中表現的位置 . . . . .	56
圖五	Mob2 / NDR 大量表現可造成細胞型態發生改變 . . . . .	57
圖六	Mob2 / NDR 短暫性轉染使細胞具細長分支 . . . . .	58
圖七	Mob2 / NDR 大量表現使分支數目增加 . . . . .	59
圖八	confocal 影像瀏覽軟體測量分支長度 . . . . .	60
圖九	Mob2 / NDR 大量表現使分支長度增加 . . . . .	61
圖十	Mob2 / NDR 大量表現下可增加 p-Moesin 的表現量 . . . . .	62
圖十一	經嘌呤黴素處理後的細胞生存率 . . . . .	63
圖十二	Mob2 降低表現會減少 p-Moesin 表現量 . . . . .	64
圖十三	NDR 降低表現會減少 p-Moesin 表現量 . . . . .	65

圖十四 由免疫螢光染色結果得知降低 Mob2/NDR 表現量會減少

p-Moesin 的表現量 ······ 66

圖十五 降低 Mob2 / NDR 的表現量並不影響細胞型態與應肌纖維組

成 ······ 67

```

Mob1_2A MSNPFLKQVFNKDKTFRPKRKFEPGTQRFELHKRAQASLNAGLDLRLAVQLPPGEDLNDW 60
Mob1_2B MS-IALKQVFNKDKTFRPKRKFEPGTQRFELHKRAQASLNAGVLDLRAAVQLPPGEDQNDW 59
Mob1_2C MA-LCLKQVFAKDKTFRPRRERFEPGTQRFELYKKAQASLKSGLDLRSVVRLPPGESIDDW 59
Mob1A MS---FLFGSRSSKTFFPKKNIPEGSHQYELLKHAEATLGSG-NLRMAVMLPEGEDLNEW 56
Mob1B MS---FLFSSRSSKTFFPKKNIPEGSHQYELLKHAEATLGSG-NLRQAVMLPEGEDLNEW 56
Mob2 -----MDWLMGKSKAKPNGKPAAEEKKVYLEPEHTKSRITDFFKELVVLPREIDLNEW 55
      -----

Mob1_2A VAVHVVDFFNRINLIYGTISDGCTEQSCPVMSGGPKYYRMQDEQRFRKPTALSAPRYMD 120
Mob1_2B VAVHVVDFFNRINLIYGTICEFCTERTCPVMSGGPKYYRMQDDLKYKPTALPAPQYMN 119
Mob1_2C IAVHVVDFFNRINLIYGTMAEHCSESSCPVMAGGPRYYRMQDERQYRRPAKLSAPRYMA 119
Mob1A VAVNTVDFFNQINMLYGTITDFCTEESCPVMSAGPKYYHWADGTNIKKPIKCSAPKYID 116
Mob1B IAVNTVDFFNQINMLYGTITEFCTEASCPVMSAGPRYYHWADGTNIKKPIKCSAPKYID 116
Mob2 LASNTTTFFHHINLQYSTISEFCTGETCQTMAVCN-TQYYYYDER--GKKVKCTAPQYVD 112
      -----

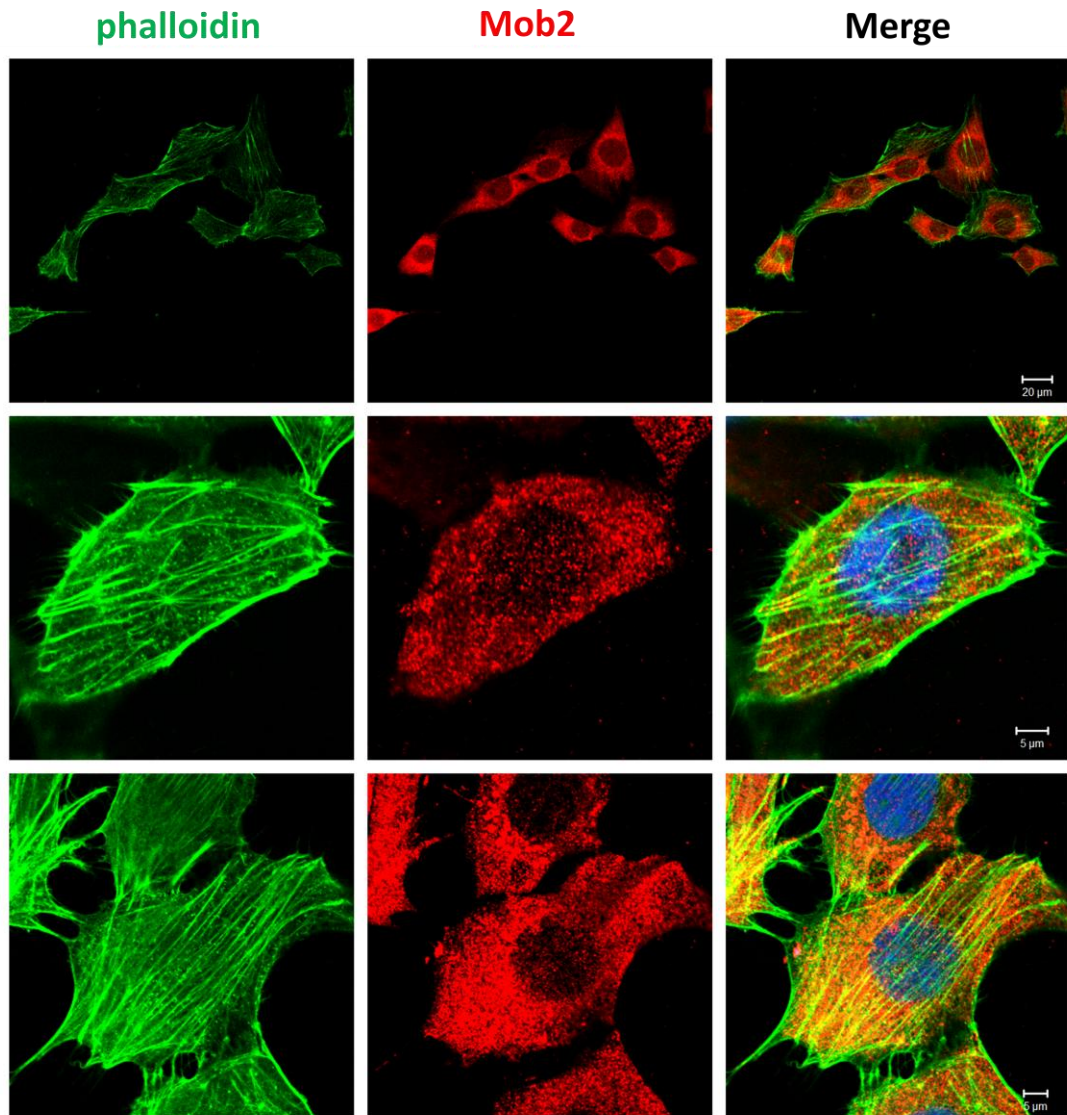
Mob1_2A LLMDWIEVQINNEDIFPPTNVGTPFPKTFLQAVRKILSRLFRVFVHVYIHHFDRIAQMGSE 180
Mob1_2B LLMDWIEVQINNEDIFPPTCVGVPFPKNFLQICKILCRLFRVFVHVYIHHFDRVIVMGAE 179
Mob1_2C LLMDWIEGLINDEDVFPPTRVGVPFPKNFQQVCTKILTRLFRVFVHVYIHHFDSILSMGAE 179
Mob1A YLMTWVQDQLDDETLFPSKIGVPFPKNFMSVAKTILKRLFRVYAHYIHQHFDPVIQLQEE 176
Mob1B YLMTWVQDQLDDETLFPSKIGVPFPKNFMSVAKTILKRLFRVYAHYIHQHFDSVMQLQEE 176
Mob2 FVMSSVQKLVTDEDVFPPTKYGREFSSFESLVKKICKYLFHVLGHIYWAHFKETLALELH 172
      -----

Mob1_2A AHVNTCYKHFYFVTEFNLIDPKLEPLKEMTSRMCH----- 217
Mob1_2B AHVNTCYKHFYFVTEMNLIDRKELEPLKEMTTRMCH----- 216
Mob1_2C AHVNTCYKHFYFIQEFSLVDQRELEPLEMTERICH----- 216
Mob1A AHLNTSFKHFIFVQEFNLIDRRELAPLQELIEKLTSKDR----- 216
Mob1B AHLNTSFKHFIFVQEFNLIDRRELAPLQELIEKLSGKDR----- 216
Mob2 GHLNTLYVHFILFAREFNLLDPRETAVMDDLTEVLCSSPGNSGATGDGANSGASGAQNHV 232
      -----

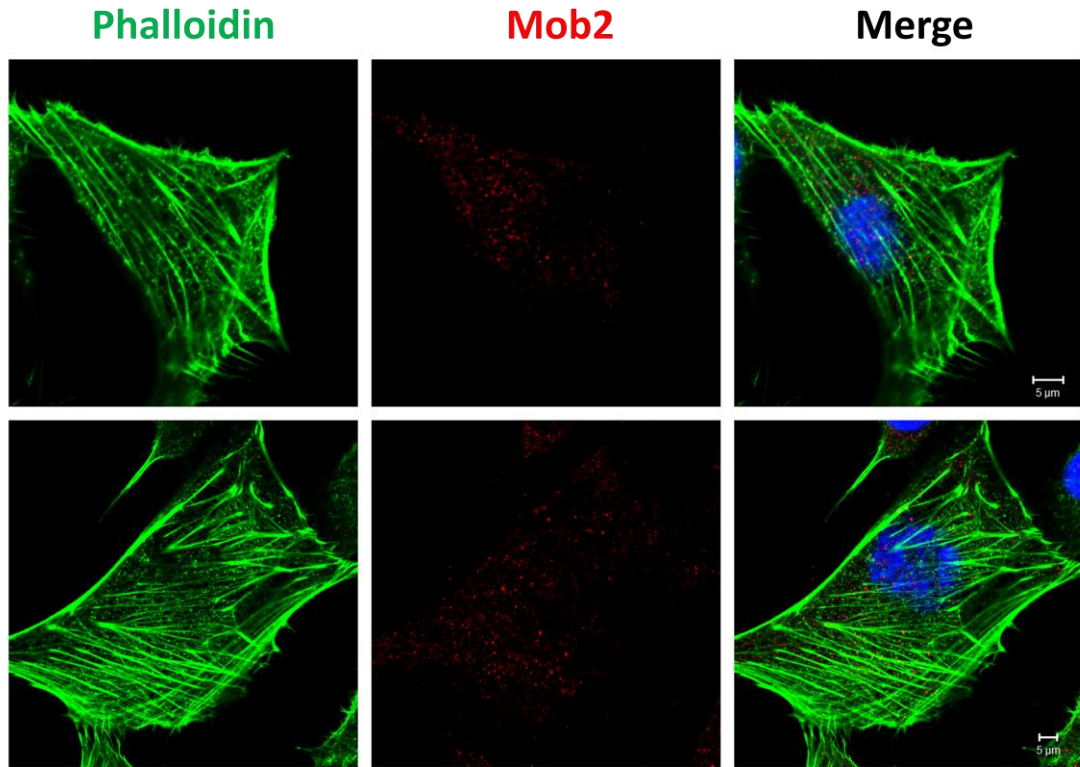
Mob1_2A ---
Mob1_2B ---
Mob1_2C ---
Mob1A ---
Mob1B ---
Mob2 KER 235

```

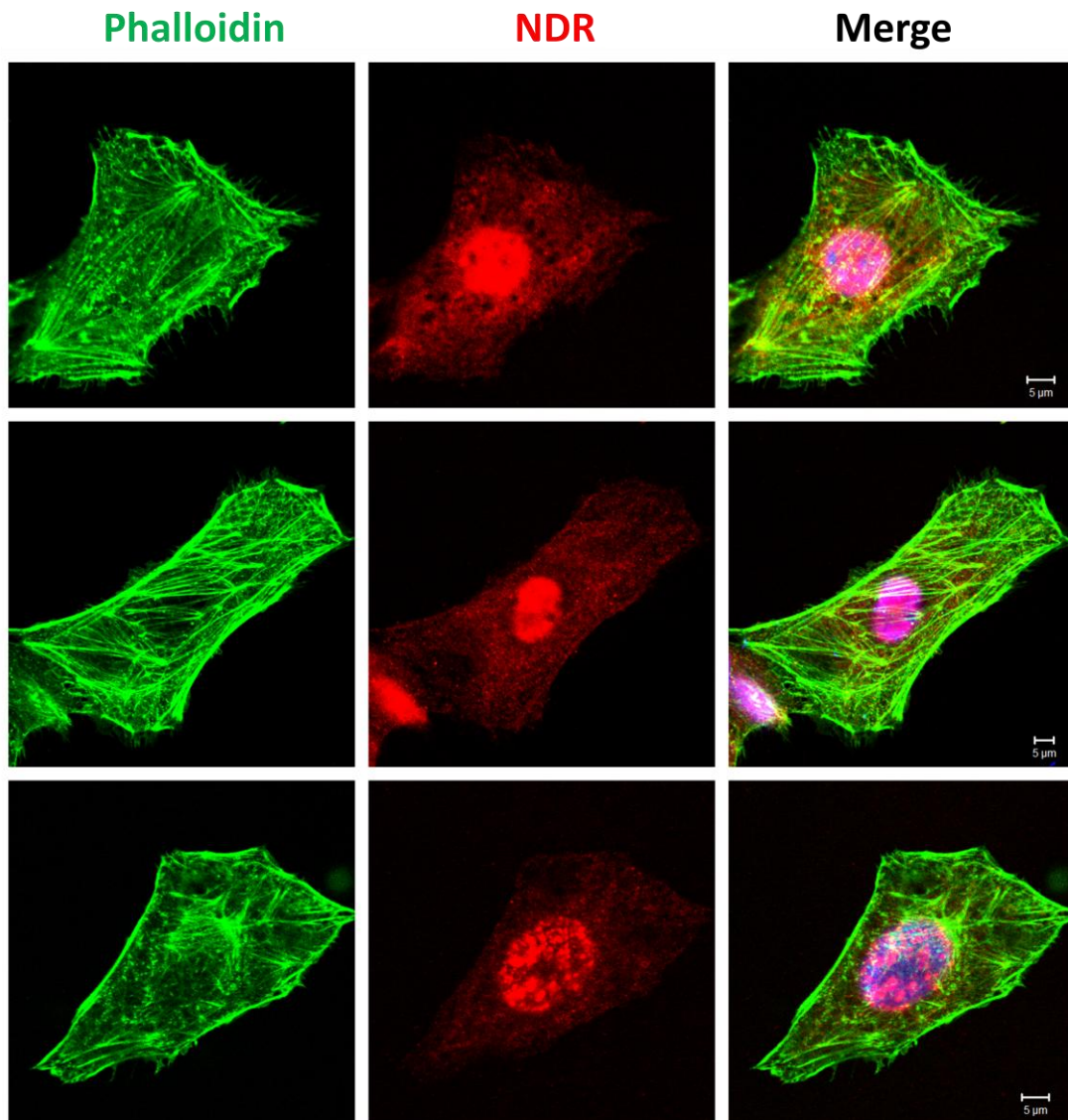
圖一 小鼠 Mob2 家族中所有蛋白之核苷酸序列。小鼠 *mob2* 基因全長為 705 bp，轉譯出 235 個胺基酸。此蛋白家族中所有成員皆具有 Mob1 / Phocin domain ( 綠線標示區域 )。



圖二 Mob2 在 NIH3T3 細胞株中表現的位置。將未經任何處理的細胞在 DMEM 中培養 24 小時後進行免疫螢光染色，螢光染色結果顯示 Mob2 表現於細胞質中。綠色為 phalloidin 標示 F-actin，紅色為 Mob2，藍色為細胞核。

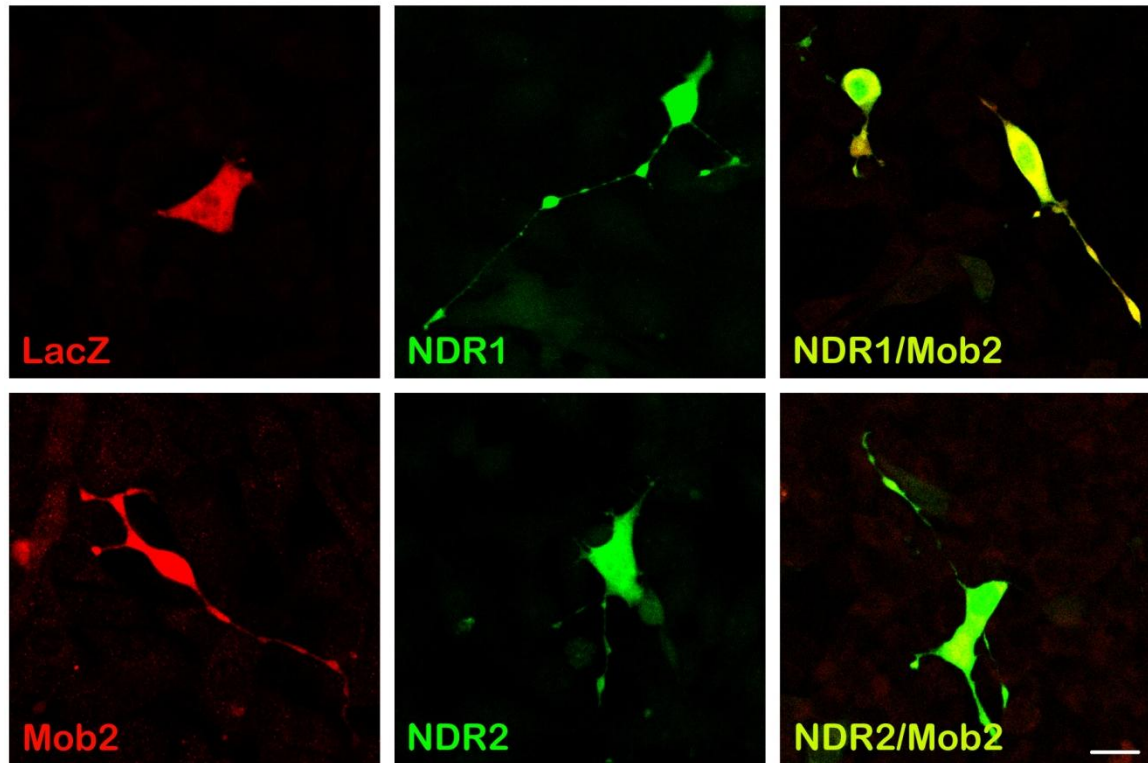


圖三 Mob2 抗體具專一性。將 Mob2 抗體與抗原先經中和作用後再進行免疫螢光染色，Mob2 訊號明顯減弱，顯示抗體具專一性。綠色為 phalloidin 標示 F-actin，紅色為 Mob2，藍色為細胞核。



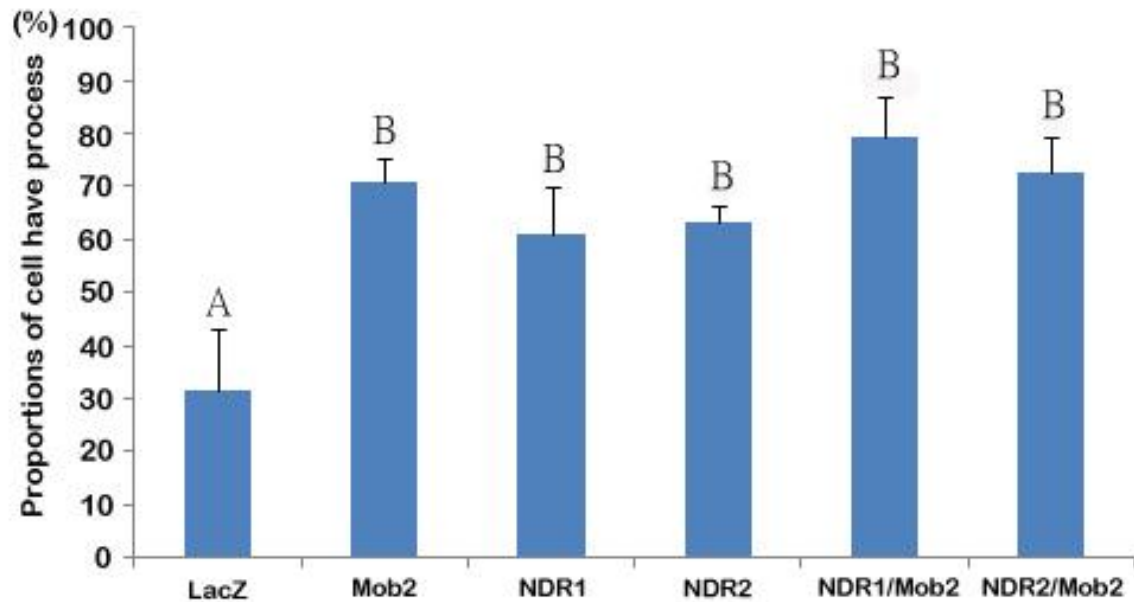
圖四 NDR 在 NIH3T3 細胞株中表現的位置。將未經任何處理的細胞在 DMEM 中培養 24 小時後進行免疫螢光染色，螢光染色結果顯示 NDR 表現於細胞核與細胞質中。綠色為 phalloidin 標示 F-actin，紅色為 NDR，藍色為細胞核。



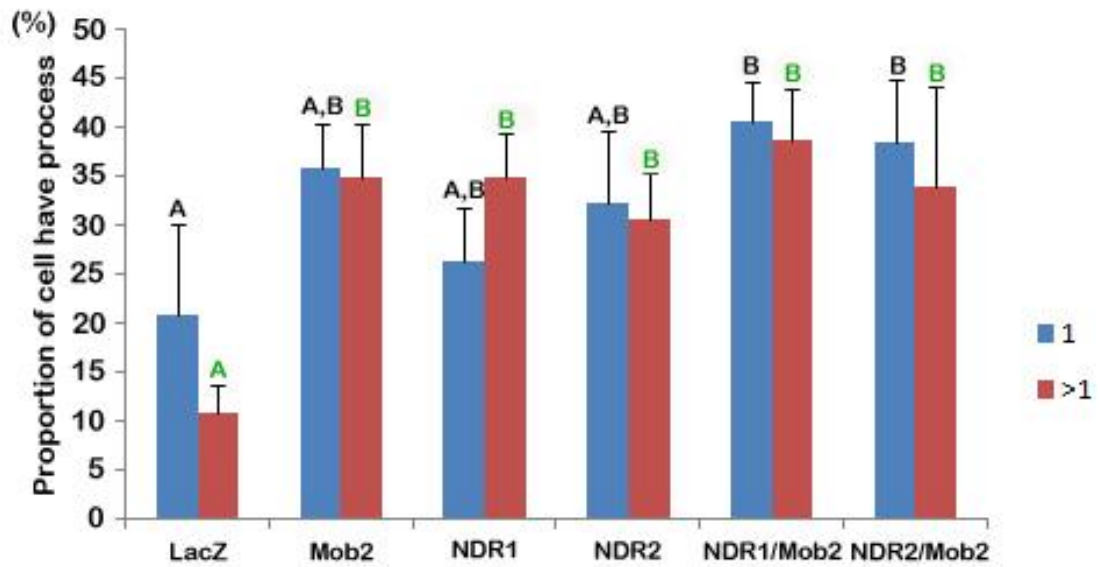


圖五 Mob2 / NDR 大量表現可造成細胞型態發生改變。Mob2 / NDR 大量表現下使細胞產生細長的分支。紅色為 Myc，代表 *mob2* 或控制組的 *lacZ* 大量表現，綠色為 GFP，代表 *NDR1* 或 *NDR2* 大量表達，黃色為紅色和綠色綜合，代表 *mob2* 與 *NDR1/2* 一起大量表達。

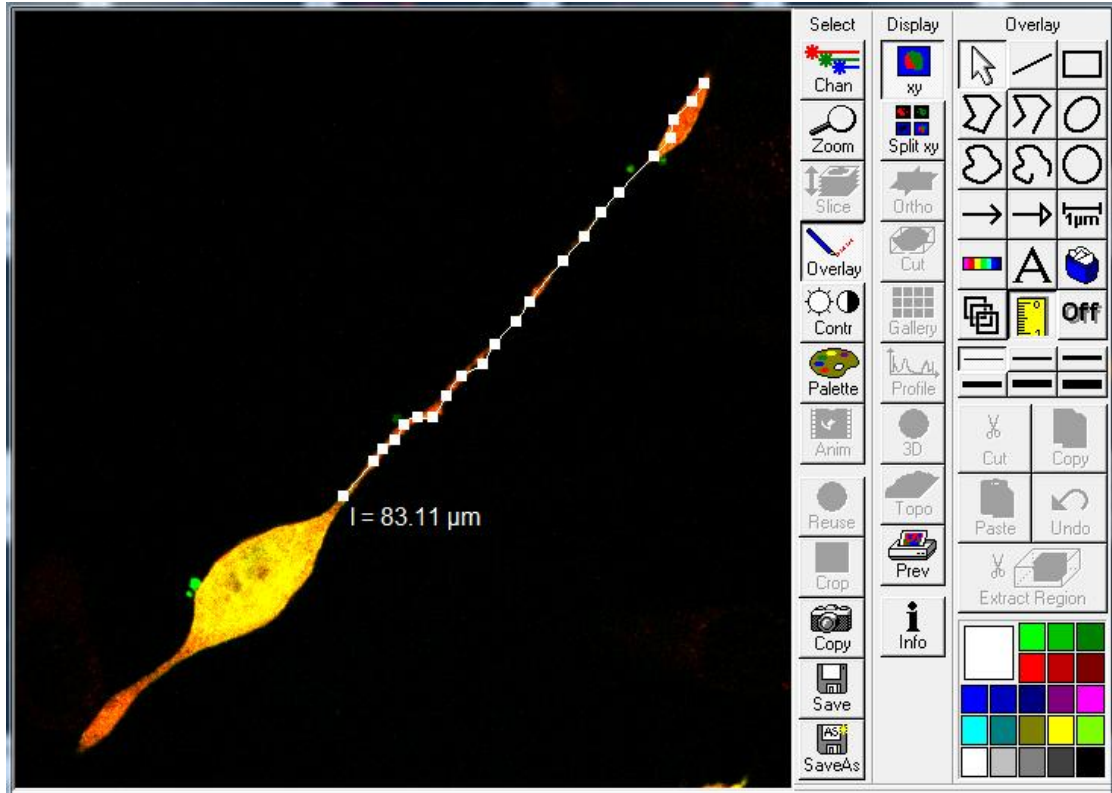
Scale bar = 20  $\mu$  m。



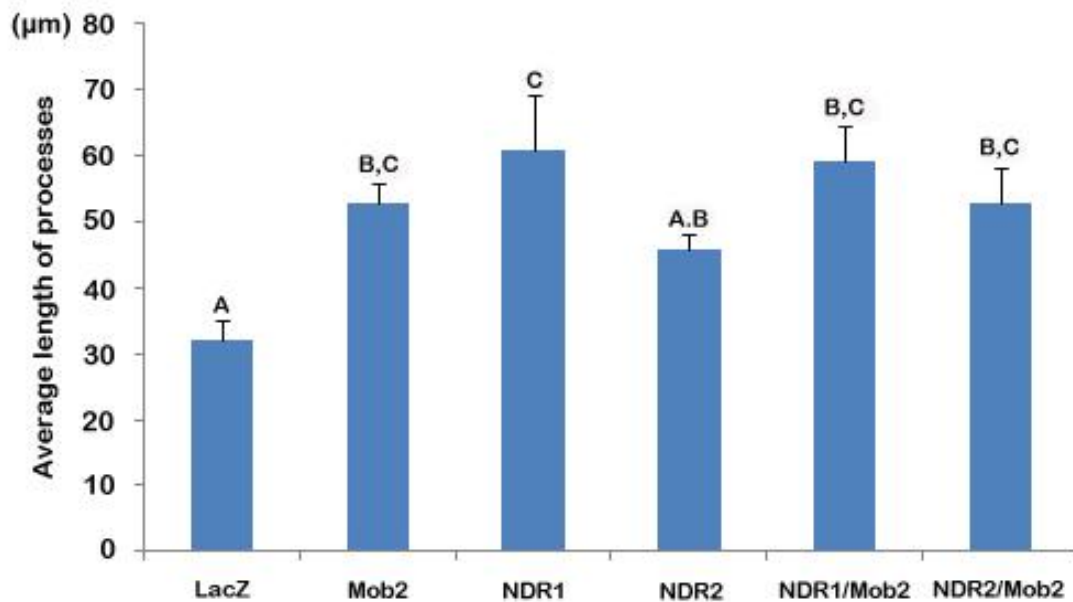
圖六 Mob2 / NDR 短暫性轉染使細胞具細長分支。X 軸顯示細胞經不同質體做短暫性轉染處理，Y 軸顯示具分支細胞的比例。各處理的統計結果為 LacZ:  $31.7 \pm 11.6\%$ ；Mob2:  $70.24 \pm 3.42\%$ ；NDR1:  $61.23 \pm 8.68\%$ ；Mob2 / NDR1:  $79.71 \pm 7.72\%$ ；NDR2:  $61.49 \pm 2.36\%$ ；Mob2 / NDR2:  $75.88 \pm 5\%$ 。各實驗組間與控制組有顯著差異 (Tukey's test, SAS 1985,  $P < 0.0001$ )。



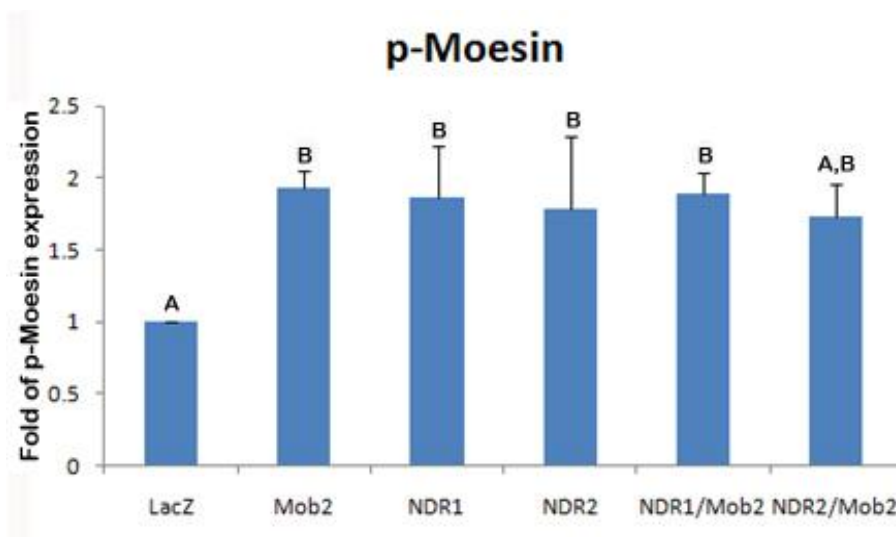
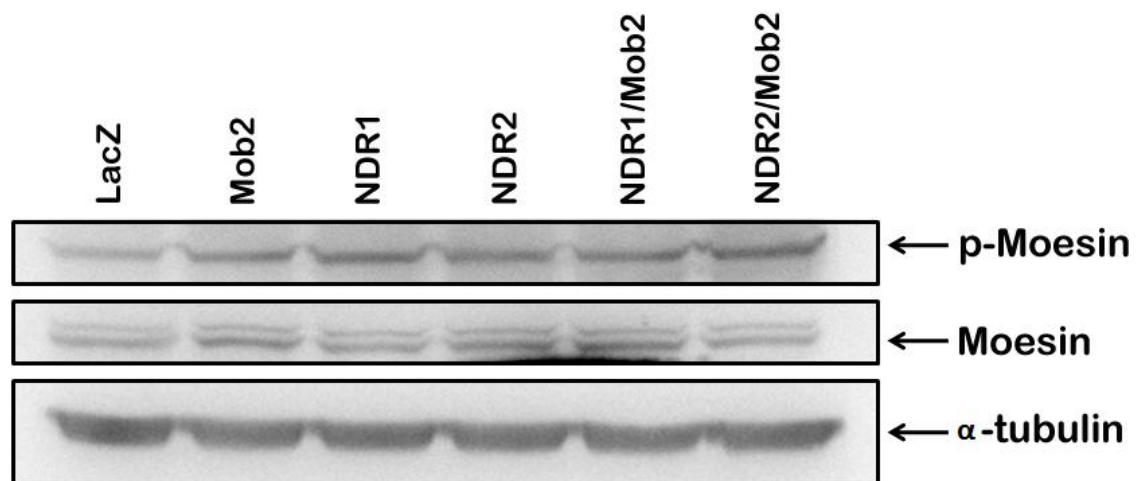
圖七 Mob2 / NDR 大量表現使分支數目增加。X 軸顯示細胞經不同質體做短暫性轉染處理，Y 軸顯示具不同分支數目細胞的比例。



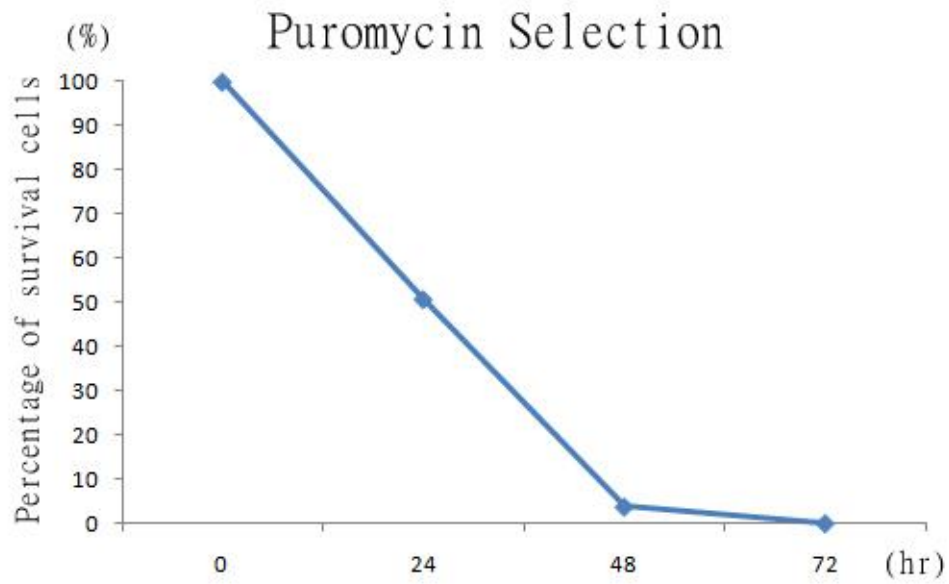
圖八 confocal 影像瀏覽軟體測量分支長度。



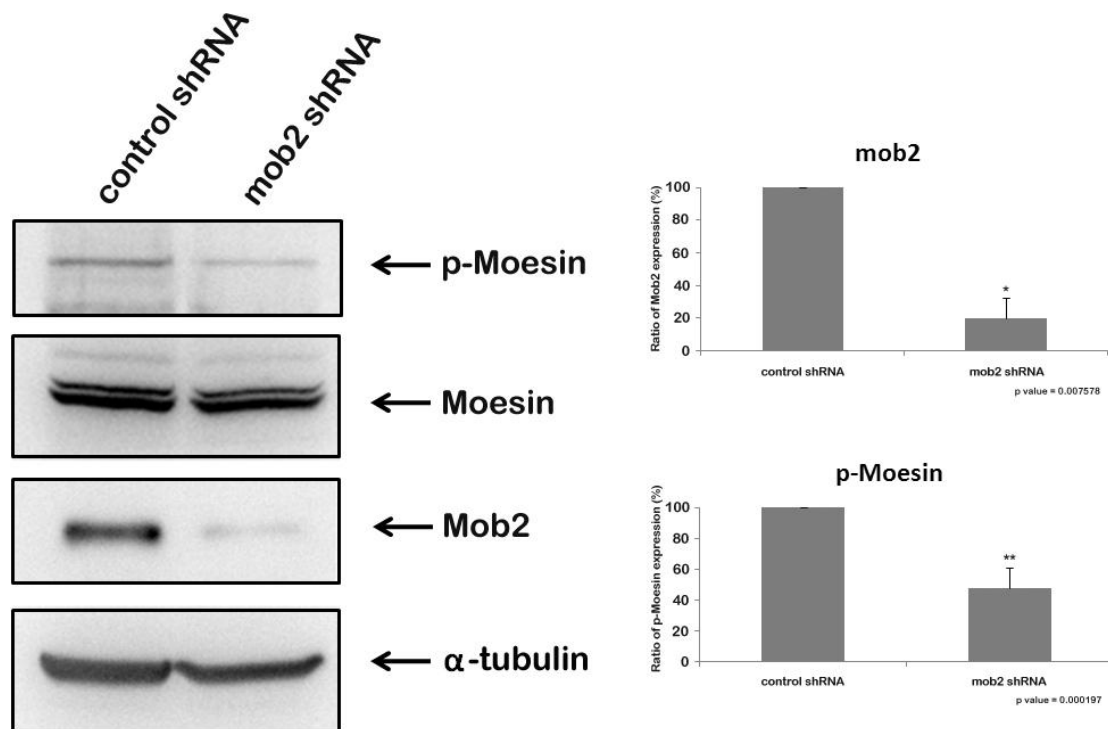
圖九 Mob2 / NDR 大量表現使分支長度增加。X 軸顯示細胞經不同質體做短暫性轉染處理，Y 軸顯示分支的平均長度。統計結果顯示，在 Mob2 及 NDR 大量表現下，細胞的分支長度約為控制組的兩倍。(Tukey's test, SAS 1985,  $P < 0.0002$ )



圖十 Mob2 / NDR 大量表現下可增加 p-Moesin 的表現量。由西方點墨法的結果顯示，Mob2 和 NDR 在單獨大量表現及一起大量表現下皆會使 p-Moesin 的表現量增加。Mob2 為  $193 \pm 12.1\%$ ，NDR1 為  $186 \pm 35.6\%$ ，NDR2 為  $178 \pm 50\%$ ，NDR1/Mob2 為  $188 \pm 15.52\%$ ，NDR2/Mob2 為  $173 \pm 23\%$ 。(Tukey's test, SAS 1985,  $P < 0.0129$ )

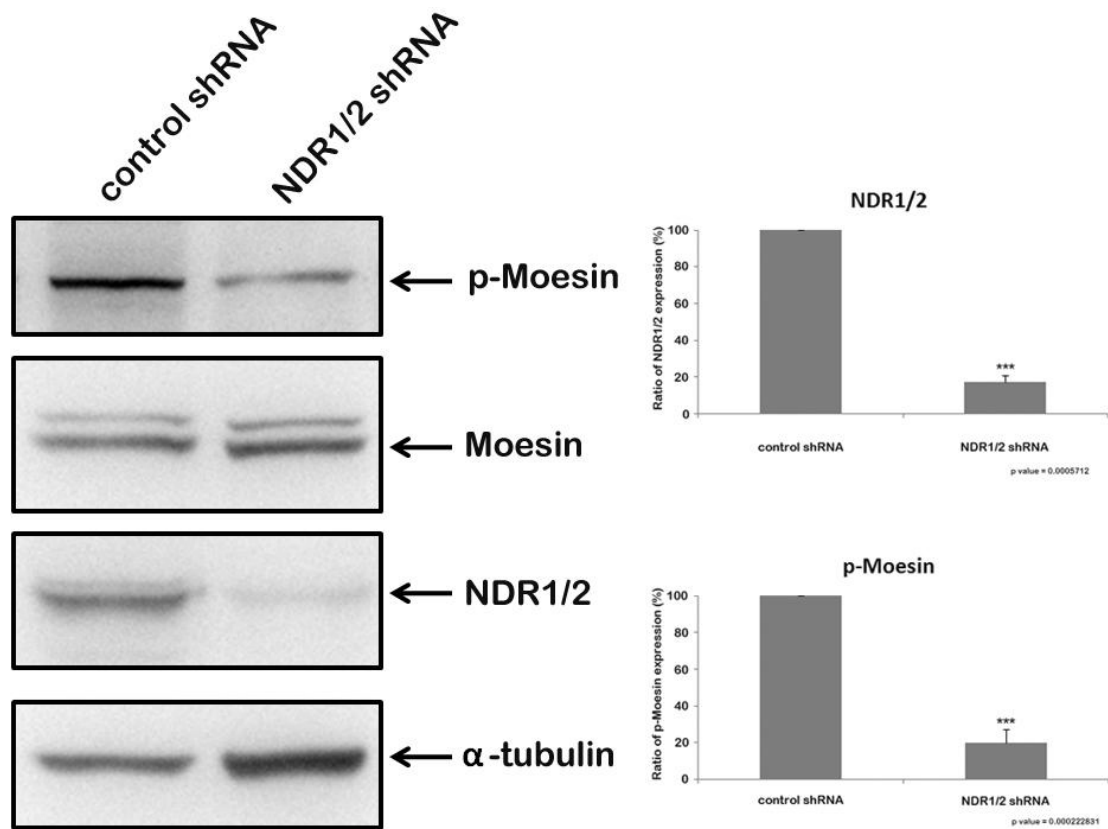


圖十一 經嘌呤黴素處理後的細胞生存率。經過嘌呤黴素處理後，細胞在第七十二小時將全部死亡。

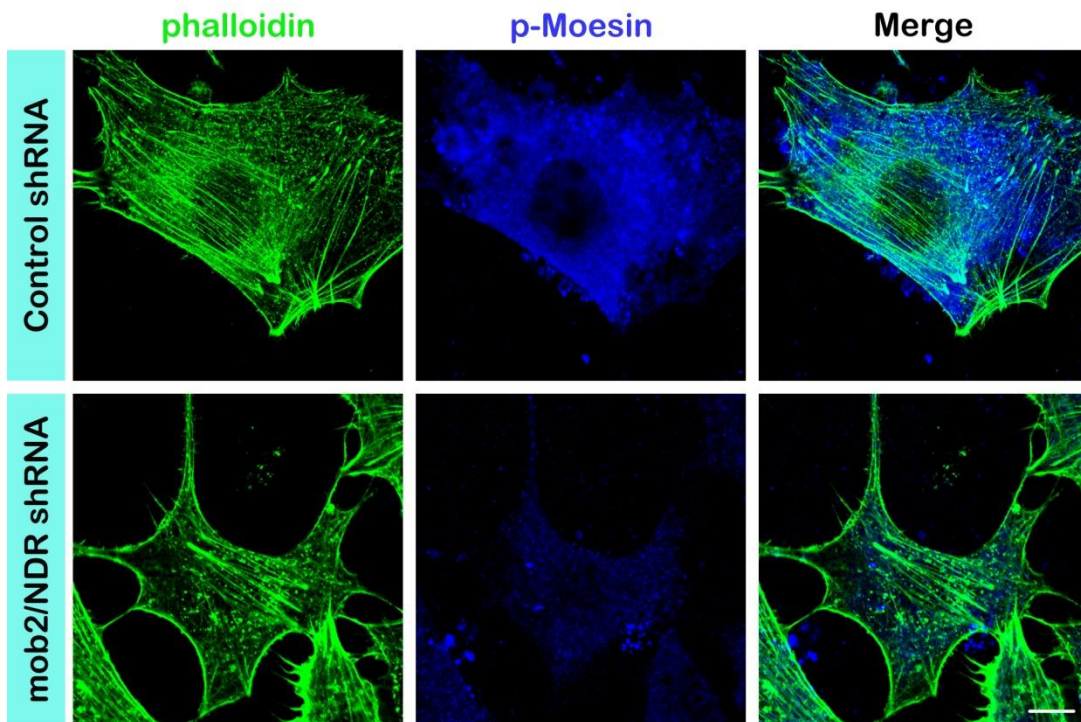


圖十二 Mob2 降低表現會減少 p-Moesin 表現量。由西方點墨法結果顯示，Mob2 降低表現會減少 p-Moesin 表現量。Mob2 表現量為控制組的 20.18±12.1 %；p-Moesin 的表現量為控制組的 48.05±12.92 %。





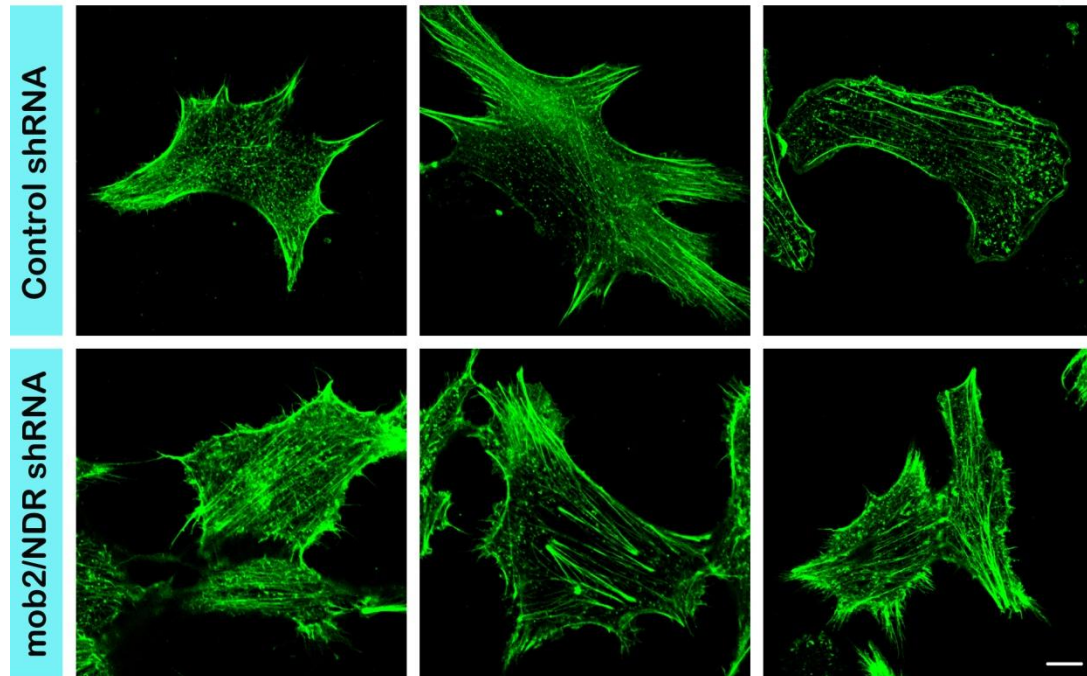
圖十三 NDR 降低表現會減少 p-Moesin 表現量。由西方點墨法結果顯示，NDR 降低表現會減少 p-Moesin 表現量。NDR 表現量為控制組的  $17.28 \pm 3.85\%$ ；p-Moesin 的表現量為控制組的  $19.86 \pm 7.48\%$ 。



圖十四 由免疫螢光染色結果得知降低 Mob2/NDR 表現量會減少

p-Moesin 的表現量。綠色以 phalloidin 標示微絲蛋白與細胞型態；

藍色標示 p-Moesin。 Scale bar = 10  $\mu$  m。



圖十五 降低 Mob2/NDR 的表現並不影響細胞型態與應激纖維組成。

以 phalloidin 標示微絲蛋白與細胞型態，可觀察到在 Mob2/NDR 降低表達下，細胞型態與應激纖維組成未受影響。 Scale bar = 10 $\mu$ m。

## 個人資料

姓名：胡惠嵐

性別：女

出生日期：1985 年 4 月 2 日

籍貫：台灣屏東縣

戶籍地址：屏東縣屏東市崇蘭里古松西巷 87 號

### 學歷

私立東海大學生命科學系生物醫學組碩士

私立東海大學生命科學系生物醫學組學士

國立屏東女子高級中學

### 經歷

私立東海大學分子生物學實驗(上)助教

私立東海大學分子生物學實驗(下)助教