

目錄

中文摘要	3
英文摘要	4
前言	6
I.形態發生	6
II.細胞極性	7
III.Crumbs 參與細胞極性的建立	9
IV.果蠅眼睛的發育	11
實驗材料及方法	14
I.果蠅品系	14
II.熱誘導處理	14
III. Phalloidin 染色	15
IV. 穿透式電子顯微鏡樣品之固定與包埋	15
V.切片與觀察	17
結果	18
I.桿小體的形態發生	18

II.過度表現 <i>crumbs</i> 會影響桿小體的形態發生	19
III.過度表現 <i>crumbs</i> 造成感光細胞的轉向異常	19
IV.過度表現 <i>crumbs</i> 改變桿小體的超微結構	21
討論	24
參考文獻	29
圖目錄	33
圖說	34
個人資料	45

中文摘要

形態發生是指生物在胚胎發育過程中，已分化的上皮細胞藉由一連串的細胞形狀、細胞數目、及細胞極性的改變而形成各種立體結構的組織及器官，而目前對於調控形態發生的分子作用機制則仍不清楚。但與細胞形狀維持有關的細胞骨架及控制細胞極性的分子，應與形態發生有密切的關係。本實驗利用果蠅桿小體的形態發生來探討形態發生的分子機制。果蠅桿小體是位於眼睛內對光敏感的胞器，桿小體的發育開始於蛹週期早期，藉由感光細胞形狀的改變，而產生成熟果蠅桿小體的形態。由於感光細胞改變形狀時，細胞極性的建立扮演了重要的角色，因此本研究欲探討細胞極性基因，*crumbs* 對於桿小體形態發生的影響。利用基因轉殖果蠅來誘發 *crumbs* 的過度表現以檢驗 Crumbs 對桿小體形態發生的作用，結果發現改變感光細胞的極性會擾亂桿小體的形態發生，並且導致感光細胞的死亡。此結果顯示，細胞極性對於桿小體的形態發生及感光細胞功能的維持，扮演了重要的角色。

英文摘要

Morphogenesis is a developmental process that brings differentiated cells together to form a three-dimensional tissue or organ by coordinating a series changes in cell shape, polarity, and cell number. Genetic regulation of morphogenesis remains unclear but cytoskeletal elements and cell polarity genes are thought to be important in this process. We have used a model, the rhabdomere morphogenesis in *Drosophila* that allows us to study the molecular regulation of morphogenesis. Rhabdomere is a photosensitive organelle that begins to form at the mid-pupal stage of eye development by turning its apical surface toward the center of ommatidium. However, the mechanism that mediates rhabdomere morphogenesis is unclear. Recent evidence showed that cell polarity genes play important roles in morphogenesis. Thus we are interested in examining if cell-polarity gene, *crumbs* plays any role in rhabdomere formation. Our results showed that ectopic expression of Crumbs protein in transgenic flies alter the polarity of photoreceptors.

The consequence of altering cell polarity resulted in mislocalization of rhabdomere and cell death at photoreceptors. These results suggest that apical signals may play an important role in rhabdomere formation.

前言

I. 形態發生 (morphogenesis)

形態發生是指細胞在發育過程中經過細胞數目、細胞形狀的改變、細胞極性的建立，與細胞間形成特殊的排列形式而整合成各種特定形狀及具有特殊生理功能的組織或器官 (Hülskamp *et al.*, 1998)，過去的研究發現有些分子，如細胞間接合 (cellular adhesion) 分子、訊息傳遞路徑 (signal transduction pathway) 分子、或與細胞骨架 (cytoskeletons) 相關的蛋白質，可能參與形態發生的過程 (Rodriguez-Boulan and Nelson, 1989; Gumbiner, 1992)。但目前對於形態發生分子機轉的調控仍不清楚。

形態發生過程中上皮細胞通常會改變其細胞形狀及極性以形成一個具有生理功能的組織。細胞形狀的改變通常受到細胞骨架、細胞間接合 (cellular junction) (Bussey, 1996; Leptin, 1994)，及膜蛋白組合的影響 (knust, 2000)，細胞形狀的改變開始於單一個或單一群的細胞藉由其特定端細胞膜產生收縮並牽動周圍細胞，而導致細胞形狀的改變 (Leptin, 1994)，而位於細胞皮質 (cell cortex) 的細胞骨架，

微絲與膜蛋白的細胞質端片段形成的複合結構，與特定區域細胞膜之收縮有關 (Knust, 2000)。此外，細胞形狀改變時又與細胞接合有密切的關係，如緊密接合 (tight junction)，胞橋小帶 (zonula adherens, ZA) 這些細胞接合通常會藉由一系列的蛋白質作用來調節細胞骨架在細胞中分佈的位置，而達到細胞形狀的改變，目前已知組成 ZA 的主要分子，cadherin 與 catenin 可以調節 actin 的排列而影響細胞的形狀 (Drubin and Nelson, 1996; Eaton and Simon, 1995; Gumbiner, 1996; Knust, 1996; Knust, 2000)，而與細胞形狀改變有關的分子，如細胞骨架蛋白、膜蛋白與細胞接合組成分子呈極性地分佈在不同區域細胞膜，但這些分子如何建立在細胞特定位置的機制仍不清楚。

II. 細胞極性 (cell polarity)

細胞極性是指細胞膜上蛋白質組成成份不同而被區分為，頂面 (apical)、側面 (lateral) 及底面 (basal) 等三個不同區域，且細胞骨架、胞器及其相關蛋白質因極性不同而呈現不對稱分佈，(Drubin and Nelsons, 1996; Eaton and Simons, 1995; Müller and Wieschaus, 1996; Wodarz *et al.*, 1995)，細胞極性的建立開始於發育的早期，參

與建立細胞極性的分子依不同上皮細胞特性歸類如下。

第一類上皮細胞由位於卵膜(egg membrane)或卵細胞皮質(egg cytocortex) 所衍生頂面細胞極的分子決定其細胞頂面的極性，並影響其他區域細胞膜極性的決定及細胞骨架與細胞核在細胞中的分佈，與細胞極性化的形態，在脊椎動物及無脊椎動物均發現利用卵膜決定細胞極性的例子，例如果蠅的極性分子 Crumbs (Tepass, 1996)。

第二類上皮細胞決定細胞極性的分子為細胞接合 (cellular junctions)，細胞接合在形態發生開始以前，被建立在細胞膜特定的位置成為空間誘導因子 (spatial cues)，以決定細胞的極性。細胞接合包含相鄰細胞間接合的分子例如，E-cadherin，及負責細胞與細胞外基質作用 (extracellular matrix) 的分子，例如，Integrin、Laminin (Tepass and Hartenstein,1994 ; Roote and Zusman, 1995 ; Vega Salas *et al.*, 1987 ; Yarnitzky and Volk, 1995)。E-cadherin 位於相鄰細胞間的細胞膜，阻擋頂面細胞膜分子的向下分佈，並決定側面細胞極性。在非極性細胞株轉殖 E-cadherin，造成細胞骨架及細胞蛋白質極性化分佈 (May *et al.*, 1994)。integrin 及 laminin 位於頂面及底面的細胞膜，分別與不同的細胞外基質組成分子作用，而決定細胞頂面及底面的極

性。因為這些細胞接合分子的細胞質端氨基酸片段會與不同的分子形成複合物,以調控細胞質內細胞骨架的排列並影響細胞質內蛋白質的配送與細胞質內小泡的運輸方向,所以這些細胞接合分子若發生異常,細胞則失去極性、形狀改變並導致組織結構的破壞 (Knust and Leptin, 1996),所以這些分子的分佈與形態發生有密切的關係。

最近的研究指出,極性基因 (cell-polarity gene), *crumbs* 與 ZA 結構的穩定有關,因為當 *crumbs* 基因發生異常,則 E-cadherin 及 -catenin 所形成的複合結構會被破壞,細胞極性喪失,並導致細胞的死亡及形態的異常 (Grawe *et al.*, 1996; Knust *et al.*, 1993; Knust, 2000; Tepass, 1996; Wodarz *et al.*, 1993)。目前僅知這些分子與細胞極性的建立有關,但其作用機制與共同參與作用的分子仍不清楚。

III. Crumbs 參與細胞極性的建立

crumbs 是果蠅內的一個細胞極性基因,在 *crumbs* 的突變果蠅中,上皮細胞極性消失且伴隨細胞形狀的改變,上皮細胞之細胞間接合的 ZA 結構的破壞,並導致胚胎的死亡 (Knust *et al.*, 1993; Tepass *et al.*, 1990; Tepass and Knust, 1993; Tepass, 1996)。利用 Gal4/UAS

誘發全長或細胞質片段 *crumbs* 的過度表現基因轉殖果蠅亦有細胞極性改變的情形並且伴隨細胞形態 (morphology) 的改變與組織結構完整性破壞等類似 *crumbs* 基因缺損之表現型 (Wodarz *et al.*, 1995)。

Crumbs 由 2146 個胺基酸組成，係位於果蠅上皮細胞及所有外胚層所衍生的上皮細胞頂面之膜蛋白，Crumbs 的蛋白質結構含細胞外 (extracellular) 貫穿膜 (transmembrane) 細胞內 (cytoplasmic) 三個區域 (domain)。其細胞外的區域，含 30 個與上皮細胞生長因子相似的重複片段 (EGF-like repeats)，及 4 個 integrin 的配體 (ligand) - 昆布胺酸 (laminin) A G domain 相似的重複片段 (laminin A G domain-like repeats)，這些胺基酸重複片段與蛋白質及蛋白質間的作用有關 (Tepass *et al.*, 1990 ; Knust *et al.*, 1993)。Crumbs 的細胞質端，由 37 個胺基酸組成，這 37 個胺基酸片段的功能尚不清楚，但其 C 端 5 個胺基酸序列 EERLI 與位於頂面細胞膜內側的蛋白質 Discs-lost(Dlt)的 PDZ (PSD-95, Discs-large, ZO-1) 的序列區域結合，而影響細胞極性的建立 (Klebes and Knust, 2000 ; knust, 2000)。另一個與 Crumbs 作用的蛋白質-Scribble，亦具有 PDZ 的蛋白質區域，Scribble 分佈在細胞底-側面 (baso-lateral)，當 Scribble 基因發生突變，造成

ZA 結構的破壞而導致 Crumbs 及其它頂面細胞膜蛋白分佈至細胞的底面及側面，(Bilder and Perrimon, 2000)。如前述，細胞極性在形態發生過程中扮演重要角色，所以 Crumbs 可能藉由與細胞質內一些含 PDZ 序列區域的分子作用調控細胞極性而參與形態發生，但目前並無直接證據說明極性分子如何參與形態發生的過程，所以我利用果蠅眼睛的發育為模式探討極性分子在形態發生所扮演的功能。

IV. 果蠅眼睛的發育

果蠅的複眼由 750-800 個小眼 (ommatidia) 組成,每個小眼包含 8 個感光細胞 (R cell), 4 個錐細胞 (cone cell)、 2 個初級色素細胞 (primary pigment cell)、 3 個次級色素細胞 (secondary pigment cell)、 1 個三級色素細胞 (tertiary pigment cell) 及 2 個形成剛毛複和體 (bristle complex) 的細胞， 8 個感光細胞根據分化的次序及其神經軸突投射至不同腦葉而區分為 R8、 R1/R6、 R3/R4、 R2/R5、 及 R7，其中 R1-R6 圍繞著小眼中軸而成楔狀排列，而 R7 與 R8 位於小眼中軸，且 R7 位於 R8 上方 (Wolff and Ready, 1993)。 8 個感光細胞均具有對光敏感之特化細胞膜，稱之為桿小體。

果蠅眼睛由單層柱狀上皮細胞-眼睛成蟲盤 (eye imaginal disc) 分化而來，果蠅眼睛的發育開始於三齡幼蟲期，位於眼睛成蟲盤後緣 (posterior) 的形態建成溝 (morphogenetic furrow, MF)，在眼睛發育時 MF 由後往前移動，在 MF 之後的細胞為已分化的細胞而在 MF 之前為未分化的細胞。在 MF 之後的分化細胞會先形成包含 R8、R2/R5、R3/R4 等感光細胞，而未分化的細胞經第二次細胞分裂並分化為 R1/R6、R7、錐細胞及色素細胞，這些細胞的分化在 1/3 蛹週期告一段落 (Ready *et al.*, 1976)。

接著在蛹週期的中段，桿小體 (rhabdomere) 開始發育，桿小體是位於感光細胞頂面由約 60000 個微絨毛組成的膜狀胞器，桿小體內含 65% 司光收集及維持桿小體微絨毛結構之膜蛋白 rhodopsin (Paulsen and Schwemer, 1984)，另外含 35% 專司負責維持桿小體微絨毛結構的膜蛋白 (Van Vactor, Jr. *et al.*, 1988; Reinke *et al.*, 1988)。果蠅桿小體的發育涵蓋整個蛹週期，約 37% 果蠅蛹週期，果蠅感光細胞的頂面開始內轉朝向果蠅小眼的中軸，並且在 48% 蛹週期時完成轉向，由於分佈在感光細胞頂面兩側的細胞接合，ZA 在感光細胞頂面區域轉往小眼中軸過程中，一直保持並未消失，所以此感光細胞

頂面的移動係由感光細胞的轉向造成，而非感光細胞頂面區域由原先分佈位置消失，並在側面細胞膜形成新的頂面細胞膜區域。到了 55% 蛹週期感光細胞頂面面積開始擴張，55% 蛹週期後，形成桿小體所必需的物質會被運往感光細胞的頂面，並堆積成緻密微絨毛構造，即成熟的桿小體。控制桿小體發育的分子機轉仍不清楚（Longley and Ready, 1995）。目前有研究指出，細胞骨架中微管之運動蛋白基因，*Glued*，與桿小體的發育有關（Fan and Ready, 1997），根據過去的研究，微管負責細胞內物質的運輸，且其運輸方向受到細胞極性的支配。

在桿小體形態發生過程中，感光細胞頂面細胞膜的形態發生扮演了重要的角色，而形態發生與細胞極性的決定又有密切的關係，因此，本實驗以果蠅桿小體的發育為模式來探討細胞極性基因 *crumbs* 與形態發生的關係。研究顯示，利用基因轉殖果蠅過度表現 *crumbs* 後會明顯地改變桿小體形態的發生。

實驗材料與方法

I. 果蠅品系 (Fly stocks)

本實驗以黑腹果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 為材料, 以 w¹¹¹⁸ 為本實驗之野生種 (wild type)。 UAS-*crb*^{mini}、及 UAS-*crb*^{intra-myc} 品系為表現 *crumbs* 的基因轉殖果蠅 (基因轉殖果蠅由 Dr. Knust at Duesseldor University, Germany 提供), UAS-*crb*^{mini} 表現 *crumbs* 的全長基因, UAS-*crb*^{intra-myc} 表現 *crumbs* 的貫穿膜區及細胞質片段 (Wodarz et al., 1995)。 並以 hs-GAL4(III) 來誘導 *crumbs* 基因的表現。 所有的果蠅均飼養於標準玉米培養基 (standard corn agar medium), 並培養於 20° C 的培養箱。

II. 熱誘導處理

為了誘發 *crumbs* 基因的過度表現, 將果蠅置於熱循環儀 (thermal cycler, Perkin Elmer, 2400) 以 37 °C 熱處理 45 分鐘, 然後將果蠅置於 20 °C 培養箱中, 待其成長至特定發育階段做解剖觀察。

III. Phalloidin 染色

將 55% 蛹週期的果蠅背面朝上以雙面膠帶黏在解剖盤上，用 5 號 Dumostar 鑷子取下呼吸蓋 (operculum)，然後剝除外殼 (case)，之後在蛹上滴約 1ml 之林格氏液 (Paul Alder's Ringer solution)，用 4 號解剖刀片，在蛹的前額橫向劃一刀，再用刀片輕壓蛹的頸部並往前推，再用 2 支解剖針解剖取得的頭部，仔細地將蛹的腦部撥除後，將果蠅眼睛置入固定液 (4% paraformaldehyde, 1X PBS) 30 分鐘，然後將眼睛置於 PBST，清洗三次，每次 15 分鐘，以除去固定液。然後將果蠅眼睛置入 5% normal goat serum (NGS)，及 rhodamine-conjugated phalloidin (10 nM in PBST) 之溶液中 4°C 過夜。第二天，用 PBST 洗去未作用之染劑，重複三次，每次 15 分鐘，之後將果蠅眼睛包埋在封片膠 (50% Glycerol, 1XPBS, 0.01M N-propyl gallate) 中，並利用共軛焦顯微鏡 (ZEISS, LSM 510) 觀察，影像並用 Adobe photoshop 軟體處理。

IV. 穿透式電子顯微鏡樣品之固定與包埋

將成體的果蠅用 CO₂ 迷昏，將果蠅腹面朝上地固定在雙面膠帶

上，取一滴約 1ml 之固定液中完全覆蓋住黏於膠帶之果蠅，用鑷子夾住果蠅口器，並用刀片切下果蠅頭部，再用刀片縱切果蠅頭部，並用解剖針挑去果蠅的腦，將取的果蠅眼睛，浸泡在固定液中，在室溫中，1 小時，然後用 pipetman 吸取果蠅眼睛，置入含固定液之 4ml 標本瓶進行前 3 小時的固定 (prefixation)，之後將果蠅眼睛置入 1% Tannic Acid (Merck, Germany)，隔夜，第二天用 PH7.4, 1M NaCacodylate 緩衝液 (Sigma, USA)，清洗 3 次，每次 10 分鐘，然後用 2% 四氧化鐵 (Electron Microscopy Science, USA) 進行 2 小時的後固定 (postfixation)，接著用去離子蒸餾水洗去四氧化鐵後，將樣品置入 2% 醋酸鈾鹽 (uranyl acetate) (Electron Microscopy Science, USA) 進行染色，隔夜，接著以 50%、75%、85%、95%、100% 的酒精，各 10 分鐘做脫水置換，然後將果蠅眼睛，置入 100% 酒精與環氧丙烷 1, 2-propylene oxide，濃度比例為 1:1 的的溶液，10 分鐘後，將溶液置換為 100% propylene oxide，10 分鐘，然後將果蠅眼睛置入含 1, 2-propylene oxide 與包埋劑 epox，濃度比例為 1:1 的過渡溶液中，浸泡 4 小時，最後將果蠅眼睛浸於 100% 的 Epox 隔夜，接著將果蠅眼睛置入裝有包埋劑之模板並放入溫度設定為 80°C 之真空烘

箱，每次間隔 10 分鐘取出調整果蠅眼睛為右側平行於切面之位向，重復三次直到包埋劑硬化，將烘箱溫度調為 100°C，24 小時，完成果蠅眼睛之包埋。

V. 切片與觀察

將完成包埋之樣品塊進行切片觀察，進行切片前，在解剖顯微鏡底下完成樣品塊之修整後，利用切片機（Reichert-Jung, Austria）進行切片，先用玻璃刀，進行厚度為 0.6 μ m 之切片，將切片於光學顯微鏡觀察，確認切片之深度及樣品包埋位向之正確後，進行厚度為 80nm 之薄片切片，並以 250 網目之銅網（grid），承接帶狀之薄片，將銅網置於收集盒（grids box），隔夜乾燥後，利用穿透式電子顯微鏡（Hitachi, Model H-600）進行觀察。

結果

I. 桿小體的形態發生

為了觀察桿小體的形態發生，我們利用 phalloidin 來染細胞中的微絲 (actin)，因為在極性細胞的細胞皮質 (cell cortex) 會有許多的微絲聚集，此染色法可以用來標定細胞的外緣。此外，在細胞的頂面是未來形成桿小體的區域，因此較其他區域有更多的微絲在細胞頂面堆積，所以用 phalloidin 染色可同時觀察感光細胞頂面細胞膜形態的改變，結果顯示 30% 蛹週期小眼，標定感光細胞頂面的亮點位於小眼縱切面的最外層，即視網膜頂 (retinal roof) (圖一 A)，到 35% 蛹週期時可以看到亮點逐漸往小眼中軸移動 (圖一 B)，到 40% 蛹週期時亮點轉往小眼縱切面內層且出現在小眼的每個連續切面，表示感光細胞表面積的擴張 (圖一 C)，而到了 45% 蛹週期時亮點已經抵達小眼縱切面的最內層，即視網膜板 (retinal floor) (圖一 D)，感光細胞頂面細胞膜完成轉向。由結果我們發現桿小體的發育開始於感光細胞頂面逐漸地由視網膜頂部轉向小眼的中軸並逐漸延伸至視網膜板，而感光細胞頂面的轉向約發生於 30%-45% 蛹週期。

II. 過度表現 *crumbs* 會造成桿小體形態的異常

將野生型果蠅 w^{1118} 與基因轉殖果蠅 $hs-Gal4/UAS-crb^{intra-myc}$ 於 40% 蛹週期予以熱誘導處理，並於 55% 蛹週期解剖眼睛做 phalloidin 的染色，觀察桿小體的形態，結果顯示，野生型果蠅感光細胞之細胞骨架排列規則，且感光細胞形狀固定，桿小體位於小眼中央，成楔形規則排列（圖二 A），而在 $hs-Gal4/UAS-crb^{intra-myc}$ 果蠅，由於細胞極性基因的過度表現 *crumbs*，造成感光細胞之細胞骨架排列紊亂，感光細胞形狀歪曲不規則，且桿小體呈現混亂的分佈，許多桿小體改變其原有的位置而分佈於感光細胞頂面或側面區域（圖二 B）。

III. 過度表現 *crumbs* 造成感光細胞轉向的異常

藉由 phalloidin 染色觀察不同發育時期野生型果蠅桿小體形態的發生，我們瞭解感光細胞頂面的轉向，因此我們希望進一步瞭解細胞極性對於感光細胞轉向的影響，所以分別在不同的發育時期誘發基因轉殖果蠅過度表現 *crumbs* 基因，然後觀察 Crumbs 對感光細胞頂面轉向的影響。將野生型果蠅與 $hs-Gal4/UAS-crb^{intra-myc}$ 基因轉殖果蠅分別於 30%、35%、40%、45%，及 50% 蛹週期給予熱誘導處理，然

後於 55% 蛹週期解剖眼睛，並染予 phalloidin，結果發現，作為對照組之 40% 蛹週期熱誘導處理之野生型 w^{1118} 果蠅感光細胞，在小眼 Z 軸各個切面均有標定感光細胞頂面微絲的亮點出現，顯示感光細胞轉向的進行，及轉向後感光細胞頂面表面積的擴張。

而 30%、35% 蛹週期熱誘導處理之 $hs-Gal4/UAS-crb^{intra-myc}$ 果蠅感光細胞，標定細胞頂面微絲的亮點只出現在小眼中軸縱切面之最外層，視網膜頂的位置，顯示感光細胞的轉向因 *crumbs* 的過度表現受到阻礙，同時我們發現，感光細胞的微絲呈現散亂分佈至細胞側面及底面的情形，且感光細胞頂面形狀改變，桿小體排列呈現不規則，顯示感光細胞頂面的轉向與桿小體後續的發育及在小眼中的排列有重要的關係（圖三 A）、（圖三 B），40% 蛹週期熱誘導處理之 $hs-Gal4/UAS-crb^{intra-myc}$ 果蠅眼睛，大部分標定感光細胞的亮點仍停留在小眼縱切面的最外層，但已有其它切面出現標示感光細胞頂面的亮點，表示感光細胞的轉向發生在 40% 蛹週期之前，所以已轉向的部分不受 *crumbs* 過度表現的影響，但未轉向的部分會因 *crumbs* 的過度表現而阻礙其轉向（圖三 C），45% 蛹週期熱誘導之 $hs-Gal4/UAS-crb^{intra-myc}$ 果蠅眼睛，亮點出現在小眼中軸的各個切面，

顯示感光細胞於 45% 蛹週期完成感光細胞的轉向所以在 45% 蛹週期誘發 *crumbs* 的過度表現，感光細胞頂面仍然能夠完成其轉向，且大量微絲聚集於感光細胞頂面（圖三 D）。

IV. 過度表現 *crumbs* 改變桿小體的超微結構

根據共軛焦顯微鏡觀察的結果發現，過度表現 *crumbs* 造成感光細胞頂面的形態的改變及轉向的異常後，進一步想瞭解 *crumbs* 是否與成熟桿小體結構的發育有關，所以利用穿透式電子顯微鏡來研究過度表現 *crumbs* 對桿小體微絨毛超微結構的影響。將野生型果蠅及過度表現 *crumbs* 之基因轉殖果蠅 *hs-Gal4/UAS-crb^{mini}*、*hs-Gal4/UAS-crb^{intra-myc}* 分別於 30%、35%、40%、45%、50%、55% 蛹週期予以熱誘導處理後，於成蟲期解剖果蠅眼睛，利用穿透式電子顯微鏡觀察桿小體之超微結構，結果顯示野生型果蠅 *w¹¹¹⁸* 之成蟲期桿小體位於感光細胞頂面，微絨毛組成之結構成圓形且其微絨毛結構排列規則。而 30% 蛹週期熱誘導處理之基因轉殖果蠅眼睛表現型顯示，基因型為 *hs-Gal4/UAS-crb^{mini}* 果蠅其桿小體隨機地出現在感光細胞頂面以外的區域，且桿小體形狀呈不規則，桿小體微絨

毛結構疏鬆，感光細胞形狀改變且無法成楔形環繞小眼中軸排列(圖四 B)，基因型為 $hs-Gal4/UAS-crb^{intra-myc}$ 之果蠅感光細胞表現型與 $hs-Gal4/UAS-crb^{mini}$ 果蠅相似，桿小體隨機地出現在感光細胞底面，且相鄰桿小體有黏合的現象(圖四 C)。35%-40% 蛹週期熱誘導處理之基因轉殖果蠅 $hs-Gal4/UAS-crb^{intra-myc}$ 與 $hs-Gal4/UAS-crb^{mini}$ 感光細胞表現型亦顯示與 30% 蛹週期熱誘導處理相似之表現型，且不管過度表現全長或細胞質端 *crumbs* 均造成感光細胞形狀改變而無法成楔形環繞小眼中軸排列、桿小體隨機地出現在感光細胞側面及底面，且桿小體微絨毛結構疏鬆、果蠅桿小體形狀不規則，及相鄰桿小體互相黏合的情形(圖五)(圖六)，此外在 30-40% 蛹週期熱誘導處理基因轉殖果蠅感光細胞之低倍率電子顯微照片均發現感光細胞染色質濃縮且感光細胞數目減少的現象(圖十)。

45% 蛹週期之後熱處理之基因轉殖果蠅桿小體表現型程度降低，基因型為 $hs-Gal4/UAS-crb^{mini}$ 果蠅桿小體環繞小眼中軸排列，部分桿小體形狀趨於野生型之卵圓形外觀，但仍有部分桿小體呈現不規則且微絨毛結構疏鬆(圖七 B)，基因型為 $hs-Gal4/UAS-crb^{intra-myc}$ 之果蠅桿小體環繞小眼中軸排列，桿小體成卵圓形，仍有桿小體隨

機地出現在感光細胞底面及側面的情形 (圖七 C), 於 50%-55% 蛹週期熱處理之基因轉殖果蠅桿小體表現型類似, 基因型為 $hs-Gal4/UAS-crb^{mini}$ 之表現型趨近於野生型果蠅, 桿小體規則環繞小眼中軸排列, 感小體微絨毛之排列較疏鬆 (圖八 B)(圖九 B), 基因型為 $hs-Gal4/UAS-crb^{intra-myc}$ 之果蠅感光細胞頂面之桿小體形狀為圓形, 且桿小體規則環繞小眼中軸排列, 仍有桿小體隨機地出現在感光細胞底面的情形 (圖八 C)(圖九 C)。

討論

形態發生的過程包含細胞數目、形狀的改變，及細胞極性的建立。細胞形狀的改變受到細胞骨架及細胞接合調控，而細胞骨架的排列及細胞接合的分佈與細胞極性有密切的關係（Drubin and Nelsons, 1996；Eaton and Simons, 1995；Müller and Wieschaus, 1996）。就極性的上皮細胞而言，細胞極性的建立對於其功能的執行有密切的關係，極性的上皮細胞通常具有不同的細胞膜區域以執行不同的細胞功能，例如，小腸內壁表皮細胞的頂面具有微絨毛(microvilli)專司養分的吸收。這些上皮細胞在形態發生過程中建立其細胞極性，但這些不同的細胞膜區域如何被建立以及這些不同區域的建立對細胞功能的影響又是如何？特別是在分子的層次上，基因如何調控細胞極性的建立，一直是發育與細胞生物學家所欲探討的問題。根據過去對於細胞形態發生的研究指出，細胞極性的建立依細胞特性區分為二類，第一類與位於卵膜頂面細胞極分子有關，例如果蠅的 Crumbs，第二類與位於相鄰細胞間的細胞接合，如 cadherin，及細胞與細胞外基質相互作用的分子，如 integrin 及 laminin 有關，但並無直接的證據說明這

些分子如何在形態發生過程中參與細胞的極性的建立以及這些分子如何藉由調節細胞極性而影響形態的發生，所以本研究以果蠅桿小體的形態發生為模式，探討極性基因 *crumbs* 對於細胞極性的建立以及此極性建立對於形態發生的影響。

桿小體是位於感光細胞頂部的特殊膜狀構造，內含有許多微絲及感光蛋白，是眼睛中負責感光的胞器。桿小體的形態發生開始於感光細胞頂面的轉向 (Longley and Ready, 1995)，待感光細胞轉向完成後微絲及感光蛋白會逐漸堆積到感光細胞頂面以形成桿小體。但調節桿小體形態發生過程，包含感光細胞頂面轉向、桿小體微絨毛結構發育及微絨毛結構的維持等分子作用機制尚不清楚。

本實驗觀察野生型果蠅感光細胞頂面的轉向，並確定轉向發生時間為 30% - 45% 蛹週期 (圖一)，加上根據過去的研究，*crumbs* 基因過度表現與 *crumbs* 缺損之突變種果蠅均發現細胞極性喪失、細胞形狀改變，與組織結構破壞等類似表現型，所以在 30%-45% 蛹週期感光細胞發生轉向的過程中，誘發基因轉殖果蠅過度表現 *crumbs*，然後在 55% 蛹週期利用 phalloidin 染感光細胞微絲標定細胞外圍後，以共軛焦顯微鏡觀察桿小體的形態變化，探討極性基因 *crumbs* 是否參

與桿小體形態發生過程中，感光細胞頂面的轉向，並且於果蠅成體期解剖以電子顯微鏡觀察桿小體超微結構，分析 *crumbs* 在桿小體發育成熟結構所扮演的角色。

結果顯示在桿小體發育過程中，當感光細胞頂面由視網膜頂轉向小眼的中軸，因為 *crumbs* 的過度表現，導致原來在細胞中具極性規則分佈於感光細胞頂面的細胞骨架蛋白微絲，散亂隨機地分佈在細胞質中，且感光細胞形狀變得不規則，(圖二) 因為在感光細胞轉向過程中，感光細胞頂面形狀發生變化，而與細胞形狀變化有關的細胞骨架蛋白，及細胞骨架相關蛋白質，被運往感光細胞的頂面，而過去的研究發現 *crumbs* 與細胞頂面蛋白質修飾後的配送有關(Wodarz *et al.*, 1993), 且根據免疫染色發現，當 *crumbs* 過度表現，會分佈至細胞的底面及側面，造成細胞頂面標記分子 (marker) 分佈至細胞底面及側面，顯示 *crumbs* 決定其他細胞頂面分子的分佈(Wodarz *et al.*, 1995), 所以在感光細胞轉向過程中因為 *crumbs* 的過度表現，造成維持細胞骨架排列分子運輸至細胞頂面以外的位置，使得感光細胞形狀改變，此外桿小體超微結構的觀察亦顯示桿小體隨機地出現在感光細胞的底面及側面，表示形成桿小體成熟結構與維持桿小體微絨毛結構的分

子的運送方向因 *crumbs* 的過度表現而改變其運送方向導致桿小體結構出現在感光細胞的底面及側面（圖四）（圖九），所以本實驗之結果提供直接證據說明極性基因參與形態發生過程中，細胞的極性的維持，並且細胞極性的維持與細胞形狀的改變及形態（morphology）的發育有密切的關係。

另一方面，利用電子顯微鏡，觀察桿小體低倍率之超微結構，發現 *crumbs* 的過度表現導致基因轉殖果蠅感光細胞之細胞核出現染色質濃縮的情形，表示細胞進行細胞死亡而造成感光細胞數目的減少。在過去有關 *crumbs* 的研究已發現，在果蠅胚胎發育過程中，當 *crumbs* 基因發生突變，上皮細胞極性消失且伴隨細胞形狀的改變，並導致細胞的死亡（Knust *et al.*, 1993；Tepass *et al.*, 1990）。可能是因為在形態發生過程中，細胞外基質提供上皮細胞存活信號（survival signal）（Tan *et al.*, 1998），而細胞與細胞外基質的作用由細胞極性調控，所以推論因為 *crumbs* 的過度表現使得感光細胞極性的改變，並影響細胞與細胞外基質的正常作用而出現細胞死亡的現象，但究竟 *crumbs* 的異常表現如何造成細胞的死亡，則仍須更進一步的研究其真正的作用機轉。

綜合上述，本實驗以桿小體發育為模式，說明極性基因在形態發生過程中，參與細胞極性的建立及維持，且細胞極性與細胞形狀的改變，細胞數目的維持有密切的關係。

參考文獻

- Brand, A. H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.
- Bilder, D., and Perrimon, N. (2000). Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ Protein Scribble. *Nature* 403, 676-680.
- Drubin, D. G., and Nelson, W. J. (1996). Origins of cell polarity. *Cell* 84, 335-344.
- Eaton, S., and Simon, K. (1995) Apical, basal, and lateral cues for epithelia polarization. *Cell* 82, 5-8.
- Fan, S. S., and Ready, D. F. (1997). *Glued* participates in distinct microtubule-based activities in *Drosophila* eye development. *Development* 124, 1497-1507.
- Grawe, F., Wodarz, A., Lee, B., Knust, E., Skaer, H., (1996). The *Drosophila* genes *crumbs* and *stardust* are involved in the biogenesis of adherens junctions. *Development*. 122, 951-959.
- Gumbiner, B. M. (1992). Epithelial morphogenesis. *Cell* 69, 385-387.
- Gumbiner, B. M. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84, 345-357.
- Hogan, B. L. M. (1999). Morphogenesis. *Cell* 96, 225-233.
- Hülkamp, M., Folker, U., and Grini, P. E. (1998). Cell morphogenesis in *Arabidopsis*. *BioEssays* 20, 20-29.
- Klämbt, C. (1997). *Drosophila* development: A receptor for ommatidial recruitment. *Curr. Biol.* 7, R132-135.

- Klebes, A., and Knust, E. (2000). A conserved motif in Crumbs is required for E-cadherin localisation and zonula adherens formation in *Drosophila*. *Curr. Biol.* *10*, 76-85.
- Knust, E.(2000). Control of epithelial cell shape and polarity. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *10*, 471-475.
- Knust, E., Tepass, U., and Wodarz, A. (1993). *crumbs* and *stardust*, two genes of *Drosophila* required for the development of epithelial cell polarity. *Development*.(Suppl.) 261-268.
- Knust, E., and Leptin, M. (1996). Adherens junction in the *Drosophila* embryo: the role of E-cadherin in their establishment and morphogenetic function. *BioEssay* *18*(8), 609-612.
- Kumar, J. P., and Ready, D. F. (1995). Rhodopsin plays an essential structural role in *Drosophila* photoreceptor development. *Development* *121*, 4359-4370.
- Leptin, M. (1994). Control of epithelial cell shape changes. *Curr. Biol.* *4*, 709-712.
- Longley, R. L., and Ready, D. F.(1995). Intergrin and the development of three-dimensional structure in the *Drosophila* compound eye. *Dev. Biol.* *171*, 415-433.
- Mays, R.W., Beck, K. A., and Nelson, W. J. (1994). Organization and function of the cytoskeleton in polarized epithelial cells: a component of the protein sorting machinery. *Curr. Opin. Cell Biol.* *6*, 16-24.
- Müller, H. –Arno J., and Wieschaus, E. (1996). *armadillo*, *bazooka*, and *stardust* are critical for early stages in formation of the zonula adherens and maintenance of the polarized blastoderm in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* *134*, 149-163.
- Vega Salas, D. E., Salas, P. J., Gunderson, D., and Rodriguez-Boulan, E. (1987).

Formation of the apical pole of epithelial (Madin-Darby canine kidney) cells: polarity of an apical protein is independent of cell-cell interactions. *J. Cell Biol.* *104*, 905-916.

Müller, H. J. (2000). Genetic control of epithelial cell polarity: lesson from *Drosophila*. *Dev. Dyn.* *218*, 52-67.

Rashbass, P., and Skaer, H. (2000). Cell polarity: Nailing Crumbs to the scaffold. *Curr. Biol* *10*, R234-R236.

Reifegerste, R., and Moses, K. (1999). Genetics of Epithelial polarity and pattern in the *Drosophila* retina. *BioEssays* *21*, 275-285.

Roote, C. E., and Zusman, S. (1995). Function of PS-integrins in tissue adhesion, migration, and cell shape changes during early embryonic development in *Drosophila*. *Dev. Biol.* *169*, 322-336.

Rodriguez-Boulan, E., and Nelson, W. J. (1989). Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science* *245*, 718-725.

Takeichi, M. (1991). Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic Regulator. *Science* *251*, 1451-1455.

Tanentzapf, G., Smith, C., Mcglade, J., and Tepass, U. (2000). Apical, lateral, and basal polarization cues contribute to the development of the follicular epithelium during *Drosophila* oogenesis. *J. Cell Biol.* *151*, 891-904.

Tang, M. J., Hu, J. J., Lin, H. H., Chiu, W. T., and Jiang, S. T. (1998). Collagen gel overlay induces apoptosis of polarized cells in cultures: disoriented cell death. *Am. J. Physiol.* *275*, 921-931.

Tepass, U., and Knust, E. (1993). *crumbs* and *stardust* act in a genetic pathway that conyrols the organization of epithelia in *Drosophila melanogaster*. *Development* *159*, 311-326.

Tepass, U., and Hartenstein, V. (1994). The development of cellular junction in the *Drosophila* embryo. *Dev. Biol.* *161*, 563-596.

Tepass, U., and Theres, C., and Knust, E. (1990). *Crumbs* encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of *Drosophila* epithelia. *Cell* *61*, 787-799.

Tepass, U. (1996). Crumbs, a component of the apical membrane, is required for zonula adherens formation in primary epithelia of *Drosophila*. *Dev. Biol.* *177*, 217-255.

Tepass, U. (1997). Epithelium differentiation in *Drosophila*. *Bioassay* *19*(8), 673-682.

Vega Salas, D. E., Salas, P. J., Gunderson, D., and Rodriguez-Boulan, E. (1987). Formation of the apical pole is independent of tight junction while segregation of a basolateral marker requires cell-cell interaction. *J. Cell Biol.* *104*, 905-916.

Wodarz, A., Grawe, F., and Knust, E. (1993). CRUMBS is involved in the control of apical protein targeting during *Drosophila* epithelial development. *Mech. Dev.* *44*, 175-187.

Wodarz, A., Hinz, U., Engelbert, M., and Knust, E. (1995). Expression of *crumbs* confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia. *Cell* *82*, 67-76.

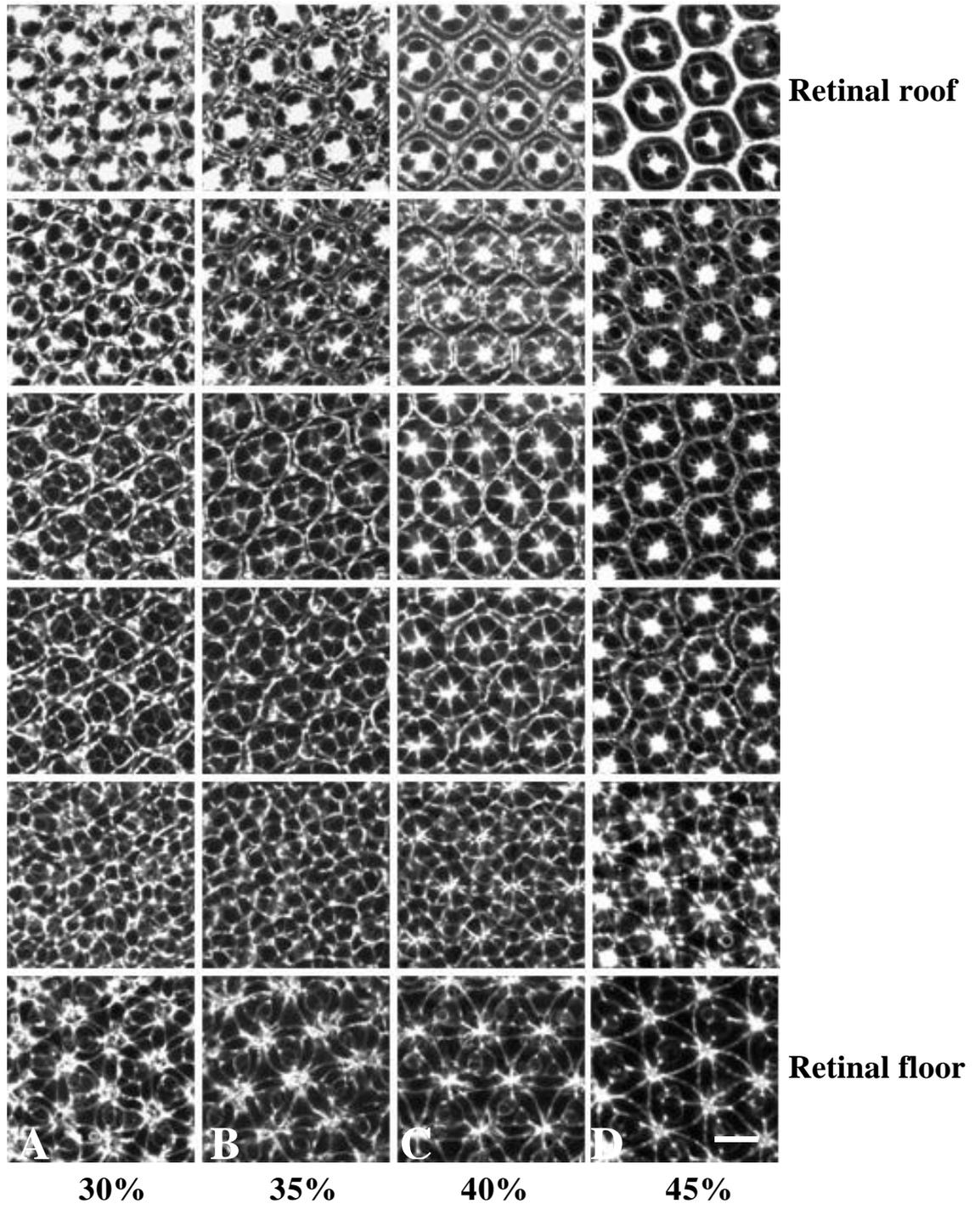
Yarnitzky, T., and Volk, T. (1995). Laminin is required for heart, somatic muscle, and gut development in the *Drosophila* embryo. *Dev. Biol.* *169*, 609-618.

圖目錄

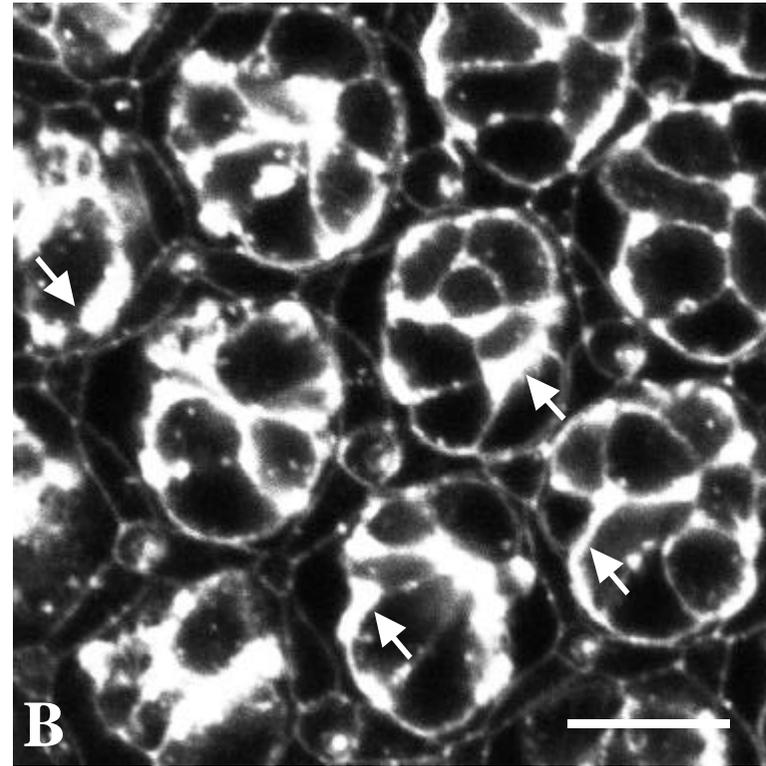
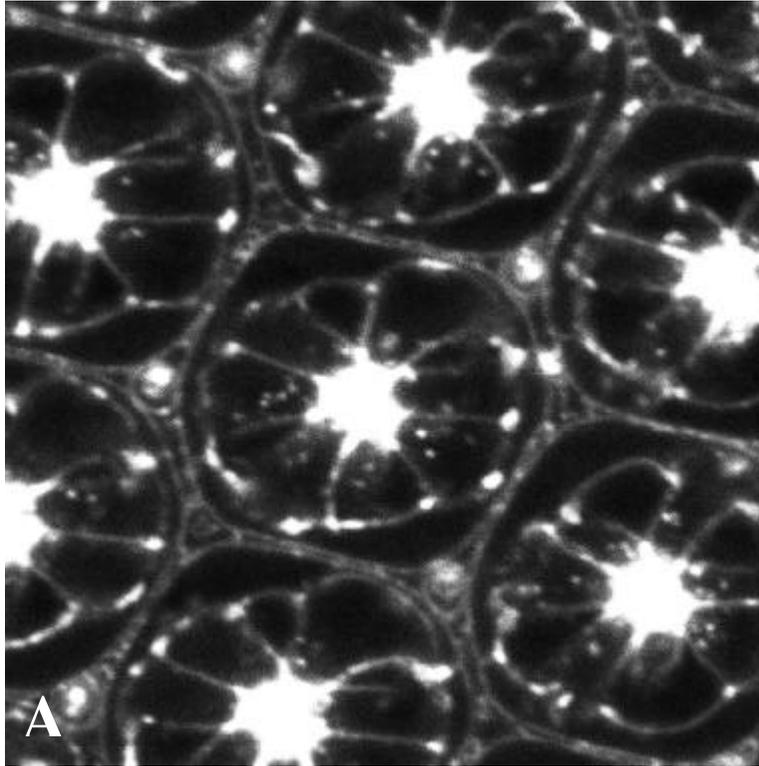
圖一、野生型果蠅眼睛在 30%-45% 蛹週期之桿小體共軛焦顯微照片	32
圖二、野生型果蠅與 <i>hs-Gal4/UAS-crb^{intramyc}</i> 基因轉殖果蠅在 40% 蛹週期做熱誘導處理到 55% 蛹週期解剖之桿小體共軛焦顯微照片	33
圖三、野生型果蠅在 40% 蛹週期做熱誘導處理與過度表現 <i>crumbs</i> 之基因轉殖果蠅在 30%-45% 蛹週期做熱誘導處理到 55% 蛹週期解剖之桿小體共軛焦顯微照片	3 4
圖四、野生型果蠅與過度表現 <i>crumbs</i> 之基因轉殖果蠅桿小體在 30% 蛹週期做誘導處理之電子顯微顯微照片	35
圖五、野生型果蠅與過度表現 <i>crumbs</i> 之基因轉殖果蠅桿小體在 35% 蛹週期做誘導處理之電子顯微顯微照片	3 6
圖六、野生型果蠅與過度表現 <i>crumbs</i> 之基因轉殖果蠅桿小體在 40% 蛹週期做誘導處理之電子顯微顯微照片	37
圖七、野生型果蠅與過度表現 <i>crumbs</i> 之基因轉殖果蠅桿小體在 45% 蛹週期做誘導處理之電子顯微顯微照片	38
圖八、野生型果蠅與過度表現 <i>crumbs</i> 之基因轉殖果蠅桿小體在 50% 蛹週期做誘導處理之電子顯微顯微照片	3 9
圖九、野生型果蠅與過度表現 <i>crumbs</i> 之基因轉殖果蠅桿小體在 55% 蛹週期做誘導處理之電子顯微顯微照片	4 0
圖十、低倍率野生型果蠅與過度表現 <i>crumbs</i> 之基因轉殖果蠅桿小體在 30%-45% 蛹週期做誘導處理之電子顯微顯微照片	4 1

圖一、共軛焦顯微照片顯示，桿小體形態發生開始於感光細胞頂面的轉向。解剖不同發育時期野生型果蠅 w^{1118} 的眼睛 (30%-45%) 以 Phalloidin 標定細胞外圍。感光細胞的頂部為未來發育成為桿小體的部分，因為有許多的微絲分佈，因此以 Phalloidin 染色後呈現亮點。染色後的眼睛以共軛焦顯微鏡作 Z 軸連續切面的觀察，圖片由上到下的排列分別表示小眼縱切面的最外層，視網膜頂 (retinal roof)；及小眼縱切面的最內層，(retinal floor)。 (A) 30% 時所有亮點位於小眼縱切面最外層，(B) 35% 時亮點逐漸往小眼中軸移行，(C) 40% 時亮點移到整個小眼的縱切面 1/2 處 (D) 45% 亮點已移到小眼縱切面的最內層。(Bar=50 μ m)

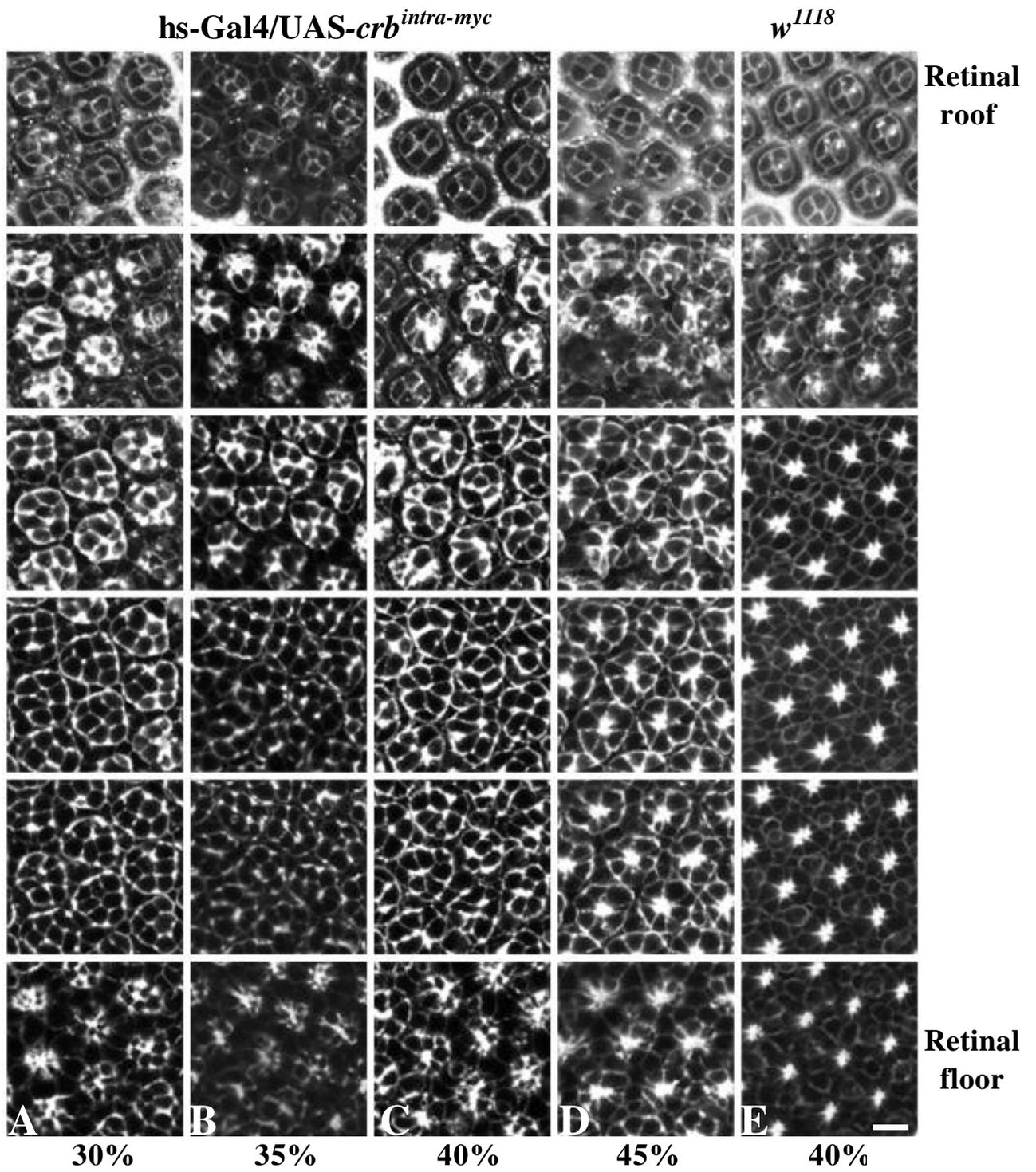
w¹¹¹⁸



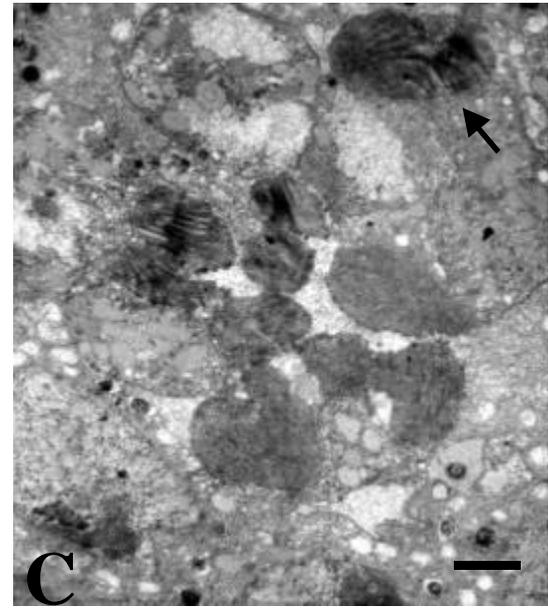
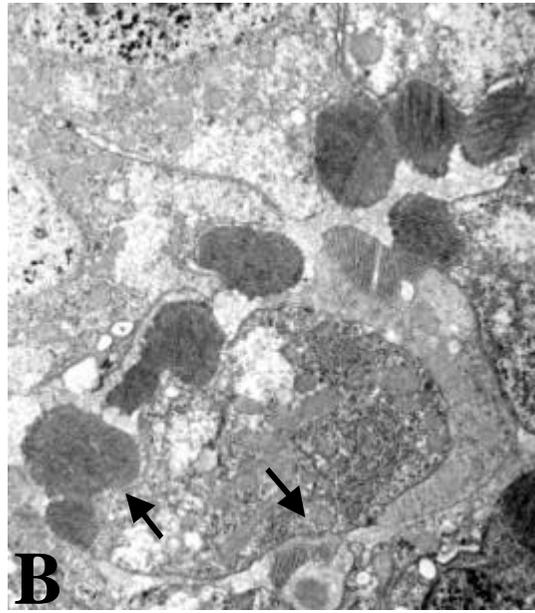
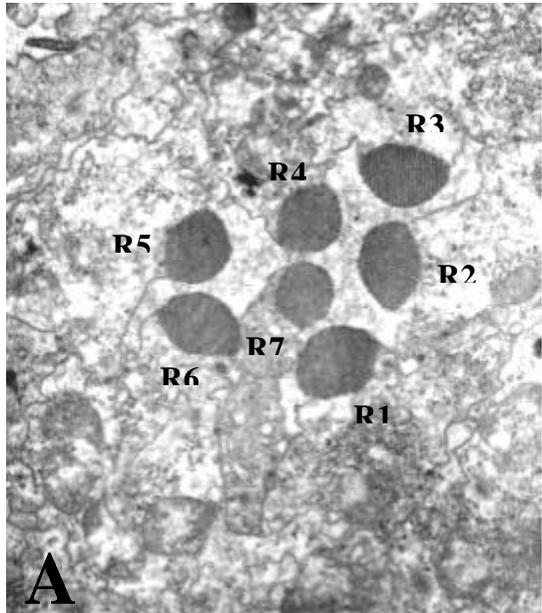
圖二、共軛焦顯微照片顯示過度表現 *crumbs* gene 會影響桿小體的形態，(A) 野生型 w^{1118} 果蠅 (B) $hs-Gal4/UAS-crb^{intra-myc}$ 果蠅，在 40% 蛹週期予以熱誘導處理並於 55% 解剖眼睛作 Phalloidin 染色。在野生型果蠅，桿小體位於小眼中央，呈規則排列，在 $hs-Gal4/UAS-crb^{intra-myc}$ 果蠅，桿小體呈現混亂的分佈許多桿小體改變其形狀及原有的位置而分佈於感光細胞底面或側面區域（如箭號所示），（Bar=50 μ m）



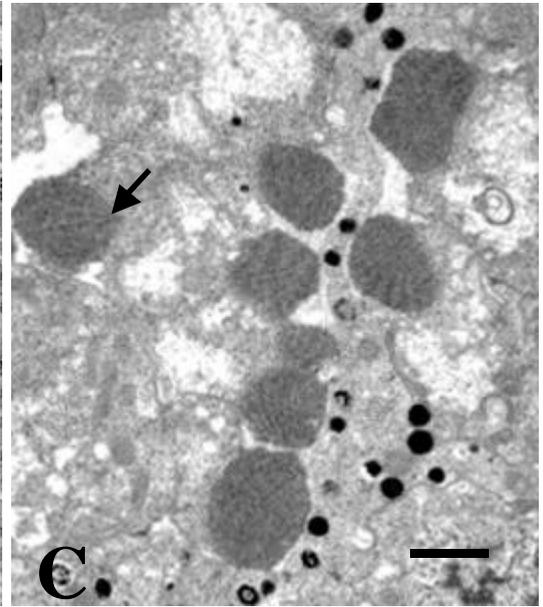
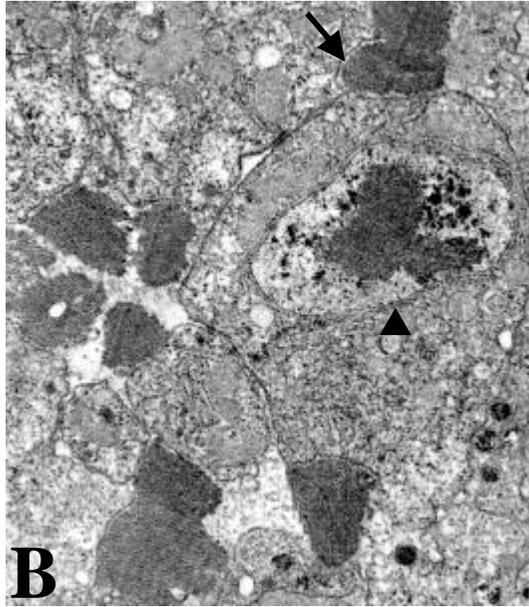
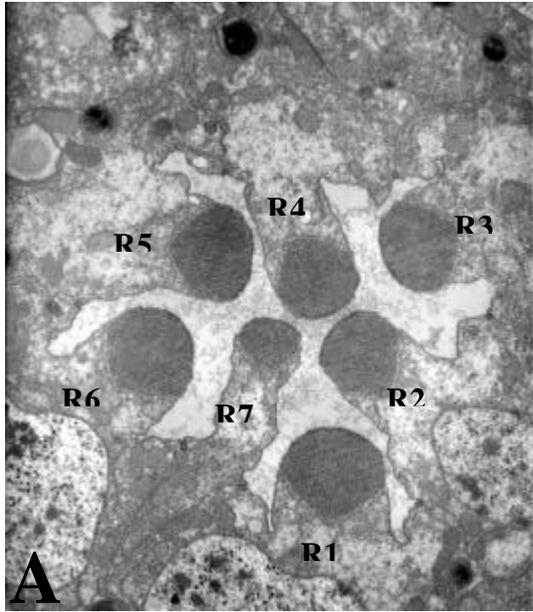
圖三、共軛焦顯微照片顯示過度表現 *crumbs* gene 導致細胞骨架的排列的改變並阻礙感光細胞頂面的轉向。分別在不同發育時間點(30%-45% 蛹週期)予以熱誘導處理，並於55%解剖果蠅眼睛作 Phalloidin 染色，(A) 30% 蛹週期熱誘導之 *hs-Gal4/UAS-crb^{intra-myc}* 果蠅眼睛，桿小體停留在小眼中軸縱切面最外層顯示感光細胞的轉向受到干擾 (B) 35% 蛹週期熱誘導之 *hs-Gal4/UAS-crb^{intra-myc}* 果蠅眼睛，感光細胞頂面及側面聚集許多微絲，並有部分亮點出現在下一個切面 (C) 40% 蛹週期熱誘導之 *hs-Gal4/UAS-crb^{intra-myc}* 果蠅眼睛，大部分亮點出現在小眼中軸縱切面的外層、部分亮點出現在小眼中軸 1/2 處 (D) 45% 蛹週期熱誘導之 *hs-Gal4/UAS-crb^{intra-myc}* 果蠅眼睛，部分亮點出現在小眼中軸 1/2 處，但大部分亮點已分佈在小眼中軸縱切面的最內層。(E) 對照組，40% 蛹週期熱誘導之 *w¹¹¹⁸* 果蠅眼睛，部分亮點出現在小眼中軸 1/2 處，部分亮點分佈在小眼中軸縱切面的最內層顯示感光細胞的轉向，及頂面表面積的擴張。(Bar=50μm)



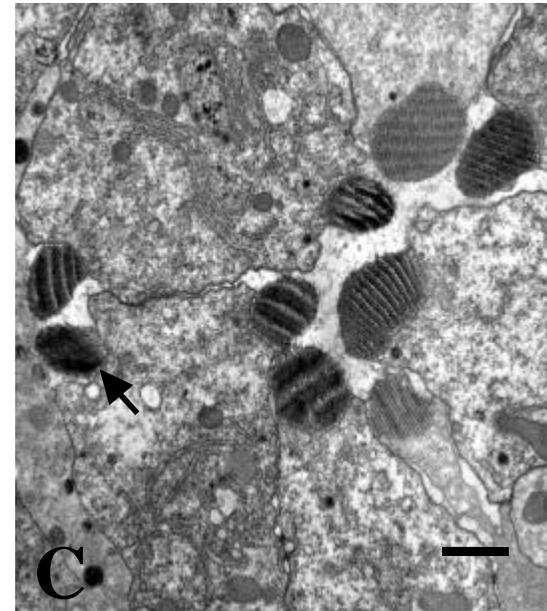
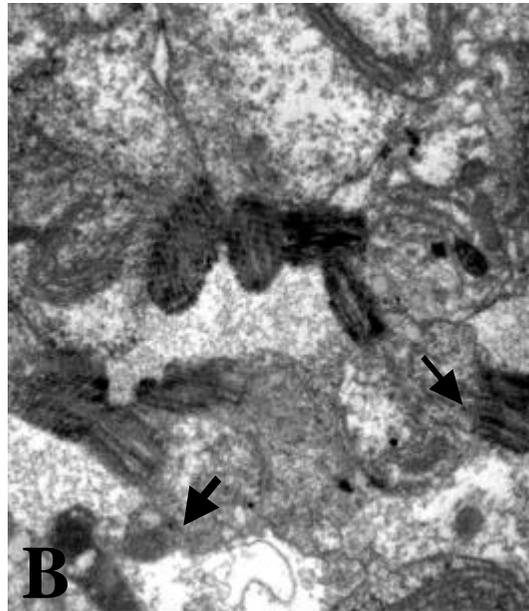
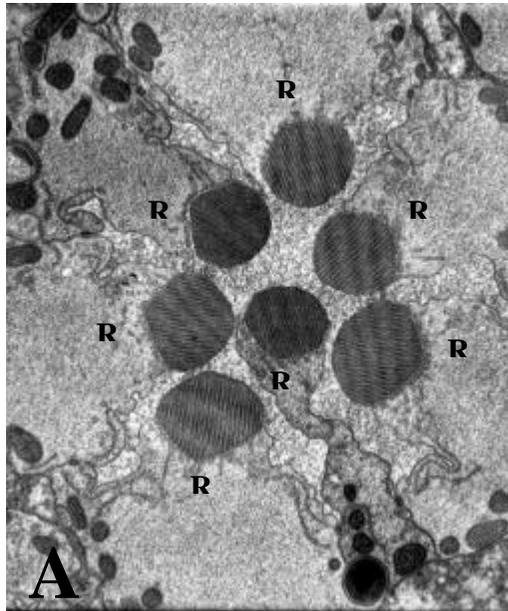
圖四、穿透式電子顯微照片顯示過度表現 *crumbs* gene 影響桿小體形態的發生。在 30% 蛹週期熱誘導處理後於成體期解剖之果蠅眼睛感光細胞。(A) 野生型果蠅 w^{1118} 之感光細胞，R1-R7 環繞小眼中軸排列，桿小體位於 7 個感光細胞頂面成楔形排列，桿小體之微絨毛結構成圓形，且微絨毛排列規則。(B) $hs-Gal4/UAS-crb^{mini}$ 基因轉殖果蠅感光細胞，桿小體出現在感光細胞底面及側面(如箭號所示)，桿小體形狀不規則，且無法成楔形環繞小眼中軸排列，桿小體微絨毛結構疏鬆，相鄰桿小體有黏合的情形，(C) $hs-Gal4/UAS-crb^{intra-myc}$ 基因轉殖果蠅表現型與 $hs-Gal4/UAS-crb^{mini}$ 基因轉殖果蠅相似，桿小體隨機地出現在感光細胞底面(如箭號所示)，桿小體變大，但結構較為疏鬆，並且桿小體無法成楔形環繞小眼中軸排列，且相鄰桿小體有黏合的現象。(Bar=1 μ m)



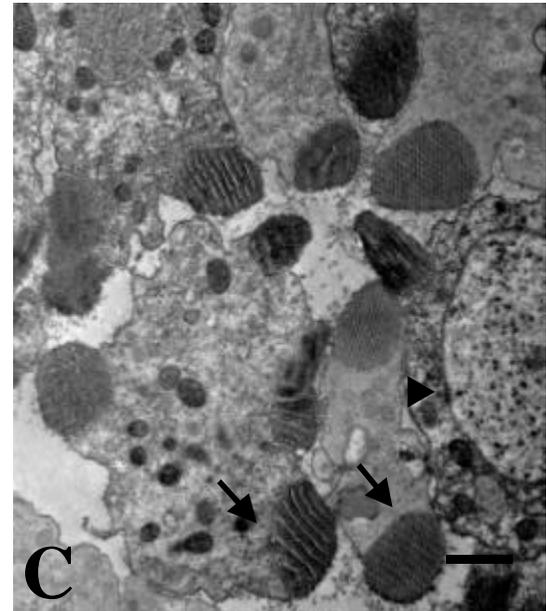
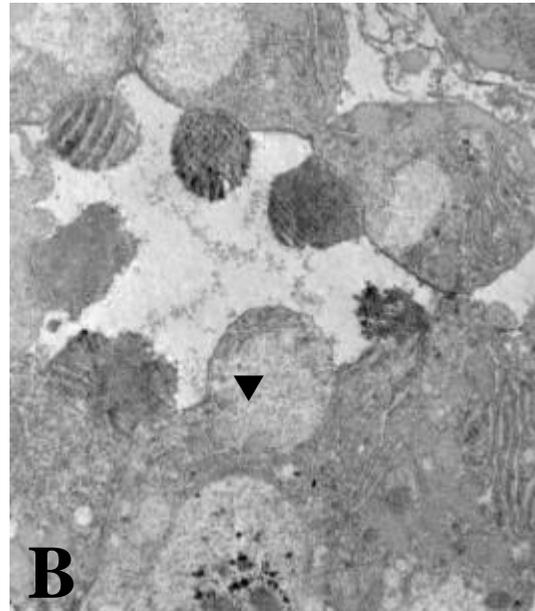
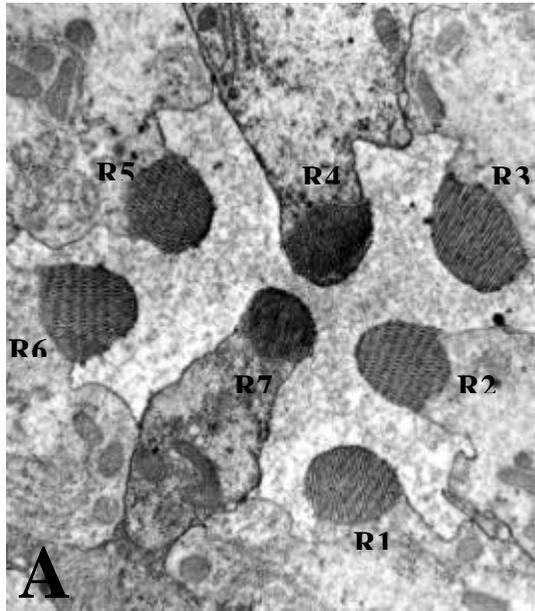
圖五、穿透式電子顯微照片顯示過度表現 *crumbs* gene 影響桿小體形態的發生。在 35% 蛹週期熱誘導處理後於成體期解剖之果蠅眼睛感光細胞。(A) 野生型果蠅 w^{1118} 之感光細胞，R1-R7 環繞小眼中軸排列，桿小體位於 7 個感光細胞頂面成楔形排列，桿小體之微絨毛結構成圓形，且微絨毛排列規則。(B) *hs-Gal4/UAS-crb^{mini}* 基因轉殖果蠅感光細胞，桿小體出現在感光細胞底面(如箭號所示)，桿小體形狀不規則，且無法成楔形環繞小眼中軸排列，感光細胞之細胞核內染色質濃縮的現象，顯示細胞正進行細胞死亡，(C) *hs-Gal4/UAS-crb^{intra-myc}* 基因轉殖果蠅之感光細胞，桿小體隨機地出現在感光細胞底面(如箭號所示)，且結構較為疏鬆，部分相鄰桿小體互相黏合。感光細胞形狀改變，使得桿小體無法成楔形環繞小眼中軸排列。(Bar=1 μ m)



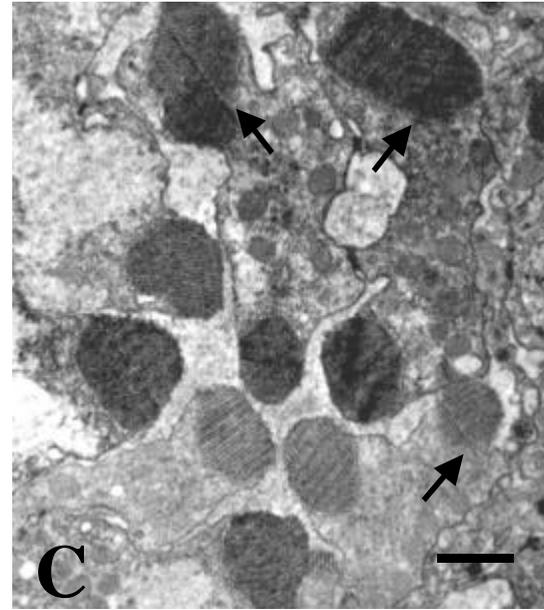
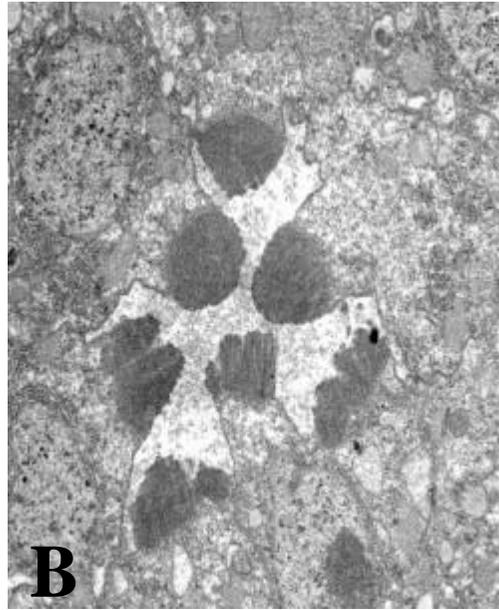
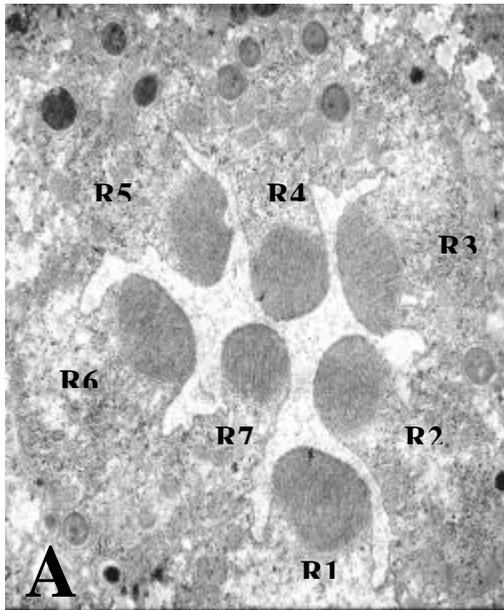
圖六、 穿透式電子顯微照片顯示過度表現 *crumbs* gene 造成微絨毛結構改變並影響桿小體形態的發生。在 40% 蛹週期熱誘導處理後於成體期解剖之果蠅眼睛感光細胞。(A) 野生型果蠅 w^{1118} 之感光細胞，R1 R7 環繞小眼中軸排列，桿小體位於 7 個感光細胞頂面成楔形排列，桿小體之微絨毛結構成圓形，且微絨毛排列規則。(B) *hs-Gal4/UAS-crb^{mini}* 基因轉殖果蠅感光細胞，桿小體出現在感光細胞底面及側面(如箭號所示)，桿小體形狀不規則，且無法成楔形環繞小眼中軸排列，且有相鄰桿小體黏合的現象，(C) *hs-Gal4/UAS-crb^{intra-myc}* 基因轉殖果蠅之感光細胞，桿小體隨機地出現在感光細胞底面(如箭號所示)，桿小體結構較為疏鬆。(Bar=1 μ m)



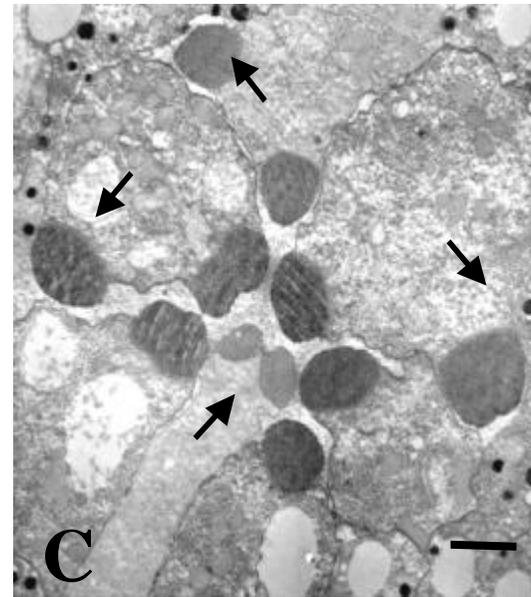
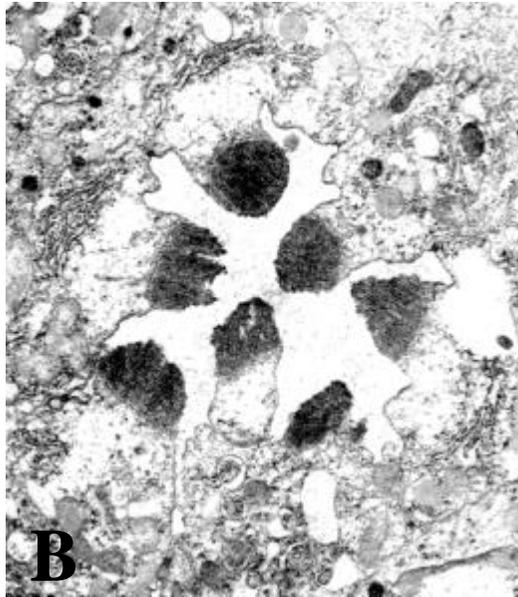
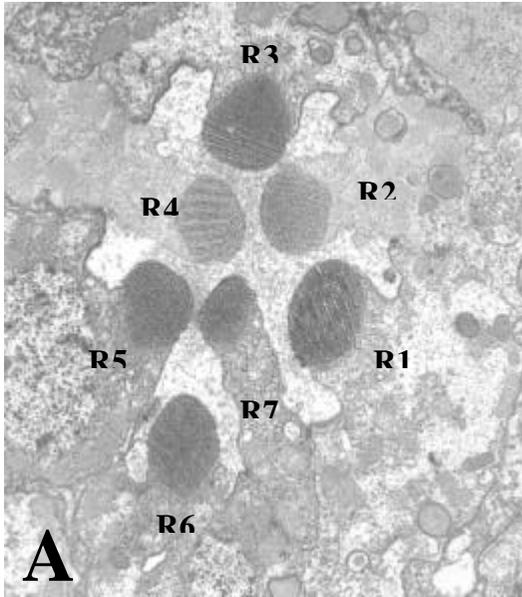
圖七、穿透式電子顯微照片顯示 *crumbs* gene 的過度表現造成微絨毛結構改變並影響桿小體形態的發生。在 45% 蛹週期熱誘導處理後於成體期解剖之果蠅眼睛感光細胞。(A) 野生型果蠅 w^{1118} 之感光細胞，R1-R7 環繞小眼中軸排列，桿小體位於 7 個感光細胞頂面成楔形排列，桿小體之微絨毛結構成圓形，且微絨毛排列規則。(B) *hs-Gal4/UAS-crb^{mini}* 基因轉殖果蠅感光細胞，桿小體成趨近於野生型之卵圓形結構位於感光細胞頂面，環繞小眼中軸排列，僅部分桿小體微絨毛結構鬆散，感光細胞之細胞核染色質濃縮，顯示細胞正進行細胞死亡(如箭頭所示)，且其頂面微絨毛結構消失，(C) *hs-Gal4/UAS-crb^{intra-myc}* 基因轉殖果蠅之感光細胞，成卵圓形之桿小體隨機地出現在感光細胞底面(如箭號所示)，部分桿小體結構較為疏鬆。(Bar=1 μ m)



圖八、 *crumbs* gene 的過度表現造成微絨毛結構改變並影響桿小體形態的發生。50% 蛹週期熱誘導處理-成體期解剖之果蠅感光細胞穿透視電子顯微影像，(A) 野生型果蠅 w^{1118} 之感光細胞 R1-R7 環繞小眼中軸排列，桿小體位於 7 個感光細胞頂面成楔形排列，桿小體之微絨毛結構，因構造致密染色較深。(B) *hs-Gal4/UAS-crb^{mini}* 基因轉殖果蠅感光細胞之排列近似野生型果蠅之表現型，僅部分桿小體結構較疏鬆，(C) *hs-Gal4/UAS-crb^{intra-myc}* 基因轉殖果蠅之感光細胞環繞小眼中軸排列，感光細胞形狀改變程度減弱，仍有桿小體隨機地出現在感光細胞底面及側面細胞膜的情形（如箭號所示）。(Bar=1 μ m)



圖九、 *crumbs* gene 的過度表現造成微絨毛結構改變並影響桿小體形態的發生。55% 蛹週期熱誘導處理-成體期解剖之果蠅感光細胞穿透視電子顯微影像，(A) 控制組果蠅 w^{1118} 之感光細胞 R1-R7 環繞小眼中軸排列，因 R8 位於 R7 底部所以在單一層切面僅能觀察到 7 個感光細胞，桿小體位於 7 個感光細胞頂面成楔形排列，桿小體之微絨毛結構，因構造致密所以染色較深。(B) 基因型為 $hs-Gal4/UAS-crb^{mini}$ 之果蠅感光細胞之排列近似野生型果蠅之表現型，僅部分桿小體結構較疏鬆。(C) 基因型為 $hs-Gal4/UAS-crb^{intra-myc}$ 之果蠅，桿小體隨機地出現在感光細胞底面及側面(如箭號所示)。(Bar=1 μ m)



圖十、低倍率穿透式電子顯微照片顯示過度表現 *crumbs* gene 造成感光細胞進行細胞死亡並感光細胞數目減少。(A1) (D1) 在 30%-45% 蛹週期熱誘導處理後於成體期解剖之野生型果蠅 w^{1118} 之感光細胞，R1 R7 環繞小眼中軸排列。(A2) ~ (D2) 在 30%-45% 蛹週期熱誘導處理後於成體期解剖之 *hs-Gal4/UAS-crb^{mini}* 基因轉殖果蠅感光細胞，感光細胞形狀不規則，感光細胞之細胞核內染色質濃縮，顯示細胞正進行細胞死亡（如箭頭所示），且小眼的感光細胞數目減少，(A3) (D3) *hs-Gal4/UAS-crb^{intra-myc}* 基因轉殖果蠅表現型與 *hs-Gal4/UAS-crb^{mini}* 基因轉殖果蠅相似，感光細胞形狀不規則及感光細胞之細胞核內染色質濃縮（如箭頭所示），且感光細胞數目減少。(Bar=2 μ m)

