

東海大學生命科學系
碩士論文

指導教授：蔡玉真 博士

Yu-Chen Tsai, Ph.D.

果蠅 Jak/STAT 訊息傳遞鏈中配體和受體間
的交互關係及功能之研究

Functional study of the interaction between ligands and
receptors in *Drosophila* Jak/STAT pathway

研究生：王柏凱

Po-Kai Wang

中華民國一〇一年八月

目錄

● 目錄.....	1
● 圖表目錄.....	4
● 中文摘要.....	6
● 英文摘要.....	8
● 前言.....	10
● 哺乳動物中的 Jak/STAT 訊息傳遞鏈.....	10
● 果蠅為研究 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的良好模式生物.....	11
● 果蠅 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的成員.....	12
● 果蠅 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的配體:Upd.....	14
● 果蠅 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的配體:Upd2.....	15
● 果蠅 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的配體:Upd3.....	16
● 果蠅 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的受體:Dome.....	18
● 果蠅 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的受體:Domelike.....	19
● Dome 及 Domelike 受體和 Upd-like 配體預測可能的結合區域.....	21
● 問題及假說.....	22
● 實驗材料.....	24
● 引子清單.....	24
● 果蠅株.....	27
● 化學藥品.....	29
● 抗體.....	31
● 實驗方法.....	33
● 細胞培養.....	33

• 細胞短暫轉染(Transient transfection).....	33
• S2 細胞蛋白萃取.....	34
• 蛋白質濃度定量.....	34
• 免疫共沉澱法(Co-immunoprecipitation).....	35
• 西方點墨法(Western blot).....	36
• S2 R ⁺ 細胞免疫染色.....	37
• S2 細胞 RNA 萃取.....	38
• 反轉錄聚合酶連鎖反應.....	38
• 聚合酶連鎖反應.....	39
• 轉型作用(Transformation).....	39
• 小量質體萃取.....	40
• 中量質體萃取(Viogene Midi kit).....	40
• 免疫組織染色.....	41
• 細胞外免疫組織染色.....	42
• 掃描式電子顯微鏡.....	43
● 實驗結果	46
• Upd 和 Upd3 為氨基連接的醣化蛋白(N-linked glycoprotein).....	47
• Upd-like 蛋白在 S2 細胞中可形成同雙體及異雙體.....	49
• Upd-like 蛋白在果蠅眼碟組織內的分布.....	52
• Upd-likes 表達於眼碟分化中區域對 Jak/STAT 訊息傳遞鏈活性的影響.....	55
• Upd-likes 表達於眼碟未分化區域對 Jak/STAT 訊息傳遞鏈活性的影響.....	57
• Upd-likes 表達於眼碟未分化區域對成蟲複眼表型的影響.....	59
• 表達 Upd-likes 配上 Dome 或 Domelike 受體對 Jak/STAT 訊息鏈的影響.....	61
• 表達 Upd-likes 和 Dome 或 Domelike 受體對果蠅成蟲複眼表型的影響.....	62
● 討論	64

- 果蠅 Jak/STAT 訊息傳遞鏈中三種 Upd-like 蛋白特性的比較.....64
- Upd-like 蛋白形成同雙體及異雙體後可能的功能.....66
- Upd-like 蛋白分別表現在眼碟已分化和未分化區域，對 Jak/STAT 訊息傳遞鏈活性有不同影響.....67
- 不同的 Upd-like 配體與 Dome 受體之間有不同的交互作用.....68
- Upd-like 蛋白配上 Dome 或 Domelike 受體造成不同的交互作用.....69
- 果蠅 Jak/STAT 訊息傳遞鏈可能和 MAPK 訊息傳遞鏈有交互作用.....70
- **參考文獻**.....**72**



圖表目錄

圖表

圖一、Upd 及 Upd3 皆為氨基連接的醣化蛋白(N-linked glycoprotein).....	77
圖二、共同免疫沉澱法所利用之 <i>Actin-Gal4</i> 及 <i>UAS-upd-likes</i> 質體.....	78
圖三、Upd-like 蛋白在 S2 細胞中會形成同雙體(Homodimers).....	79
圖四、Upd-like 蛋白在 S2 細胞中會形成異雙體(Heterodimers).....	80
圖五、GFP 抗體不會直接辨認 Upd-HA、Upd2-flag 及 Upd3(共同免疫沉澱法控制組).....	81
圖六、Upd-like 蛋白分泌至細胞外後於果蠅眼碟內的分布情形.....	82
圖七、Upd-likes 表達於眼碟分化中細胞的區域對 Jak/STAT 訊息傳遞鏈活性的影響.....	84
圖八、Upd-likes 表達於眼碟未分化細胞的區域對 Jak/STAT 訊息傳遞鏈活性的影響.....	86
圖九、Upd-likes 表達於眼碟未分化區域對成蟲複眼表型的影響.....	88
圖十、在果蠅眼碟未分化區域表達 Upd-likes 和 Dome 或 Domelike 受體對 Jak/STAT 訊息鏈的影響.....	89
圖十一、表達 Upd-likes 和 Dome 受體對果蠅成蟲複眼表型的影響.....	90
圖十二、表達 Upd-likes 和 Domelike 受體對果蠅成蟲複眼表型的影響.....	91

附圖

附圖一、果蠅 Jak/STAT 訊息傳遞鏈及其活性的報告者 10XSTAT92E-GFP-NLS.....	92
附圖二、果蠅複眼的發育過程及專一表達於果蠅眼碟的 <i>Gal4</i> 果蠅株 <i>ey-Gal4</i> 及 <i>GMR-Gal4</i>	93

附圖三、Jak/STAT 訊息傳遞鏈調控果蠅多種發育過程及生理反應之可能的分子機制模式圖.....94

附圖四、表達 *upd2* 於果蠅眼碟邊緣的區域會活化 Jak/STAT 訊息鏈及造成成蟲複眼變大.....95

個人資料表.....96



摘要

Jak/STAT 訊息鏈調控多種生理反應，包含細胞增生、幹細胞維持、免疫反應和造血作用。當 Jak/STAT 訊息鏈失去妥善調控，可能會引發癌症和免疫相關的疾病。果蠅的 Jak/STAT 訊息鏈在演化上與哺乳動物同源且較為簡單，所以果蠅是良好的模式生物來研究 Jak/STAT 訊息鏈的功能。果蠅的 Jak/STAT 訊息鏈調控許多重要發育過程和生理反應。在果蠅的 Jak/STAT 訊息鏈中，三個 Upd-like 配體(Upd、Upd2、Upd3)及兩個 Dome 受體(Dome、Domelike)的下游，僅只有一個 Jak 和一個 STAT，但可以調控許多發育過程及生理反應。最近的研究中發現，Dome 和 Domelike 會形成同雙體及異雙體。在我的實驗中，利用免疫共沉澱法發現 Upd-like 蛋白也會形成同雙體及異雙體。我們推測在 Jak/STAT 訊息鏈中 Upd-like 蛋白形成雙體，可能會影響 Upd-likes 在組織中的分布，或改變和 Dome 受體的親和力，進而執行不同功能。另一方面，我發現在 Upd-like 蛋白中，Upd 和 Upd3 不論在組織中的分布情形及長距離活化 Jak/STAT 活性的能力都很相近，而 Upd2 的特性較為不同。我也發現在果蠅眼碟表達不同組合的 Upd-like 配體時，會對複眼表型產生不同的影響。在觀察同時表達 Upd-like 配體和 Dome 受體對複眼發育的影響時，我發現表達 Upd3 時，複眼變大的性狀對於 Dome 受體的劑量很敏感，此外我也發現分別表達 Upd 和 Upd3 配

合不同的 Dome 受體會造成果蠅複眼不同的性狀。此研究使我們對於果蠅 Jak/STAT 訊息鏈中配體和受體的作用機制有更深一層的了解，也透過對於果蠅這個模式生物的研究，我們能更了解哺乳動物 Jak/STAT 訊息鏈可能的作用機制。



Abstract

The Jak/STAT pathway plays a crucial role in physiological and developmental processes in mammals, such as immune response, hematopoiesis, and adipogenesis. Since the Jak/STAT signaling is evolutionarily conserved and *Drosophila* has only one Jak and one STAT, *Drosophila* is a simple and non-redundant system to investigate function and regulation of Jak/STAT pathway *in vivo*. Three ligands, Unpaired (Upd), Upd2, Upd3 and two receptors, Domeless (Dome) and Domelike, have been identified in *Drosophila*. Upd is regarded as an essential factor to affect cell proliferation, cell migration and differentiation whereas Upd3 is implicated in immune response. The function of upd2, however, remains obscure. On the other hand, it is suggested in recent studies that Dome and Domelike can form homodimers and heterodimers *in vivo*. Hence, we are interested in how such a simple Jak/STAT signaling regulates multiple distinct developmental processes. We proposed that different combinations of Upd-likes and Dome receptors would have different affinity and induce different biological effects. In my study, I found Upd-like proteins have different properties. Both Upd and Upd3 are N-linked glycoproteins, but Upd2 is not. The localization of Upd2 *in vivo* is also different from that of Upd and Upd3. Upd and Upd3 can influence Jak/STAT activity in a long-range manner, but Upd2 cannot. From the Co-immunoprecipitation assay, I found Upd-like proteins can form homodimers and heterodimers in S2 cells. The adult eye phenotype of Upd/Upd3 combination is different from Upd or Upd3. Also, different combinations of Upd-likes and Dome receptors have different effects on

Drosophila eye development. This study may help us to further understand the molecular mechanism of ligands-receptors interaction in *Drosophila* Jak/STAT pathway.



前言

我的實驗主要是探討果蠅中 Janus kinase(Jak)/Signal transducers and activators of transcription(STAT)訊息傳遞鏈的功能及其調控機制。由於 Jak/STAT 訊息傳遞鏈要被活化，是必須藉由其配體結合至受體後才能啟動，因此在我的研究中，我以果蠅 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的配體：Unpaired(Upd)、Unpaired2(Upd2)、Unpaired3(Upd3) 和受體：Domeless(Dome)、Domelike 之間的交互作用為主題，利用果蠅作為模式生物，觀察不同 Jak/STAT 訊息鏈的配體和受體組合，如何影響此訊息傳遞鏈的功能及調控。

哺乳動物中的 Jak/STAT 訊息傳遞鏈

Jak/STAT 訊息傳遞鏈是一個在演化上高度保留的訊息鏈。在哺乳動物體中，Jak/STAT 訊息傳遞鏈調控許多發育過程及生理反應，包含細胞的增生、細胞分化、細胞移動、造血作用、免疫反應、乳腺發育以及乳汁分泌(Rawlings et al., 2004)。若是此訊息傳遞鏈失去妥善調控，可能會引發癌症和免疫相關的疾病(Rawlings et al., 2004)。Jak/STAT 訊息傳遞鏈主要是由酪胺酸激酶(tyrosine kinase)：Janus kinase(Jak)，以及轉錄因子：Signal transducers and activators of transcription(STAT)組成。在哺乳動物體中，當細胞表面的受體(Receptor)接收細胞激素(Cytokine)以及生長因子(Growth factor)的訊息會活化 Jak/STAT 訊息傳遞鏈

(Argetsinger et al., 1993; Imada and Leonard, 2000; Levy, 1999; Mui, 1999; O'Shea et al., 2002; Yeh and Pellegrini, 1999)。Jak/STAT 訊息傳遞鏈活化的過程中，首先是受體的構形發生改變，接著進一步活化結合在受體上的 Jak kinase，活化的 Jak kinase 會磷酸化受體，使受體上產生一個連接點，使 STAT 結合至受體，最後 Jak kinase 會磷酸化 STAT，而磷酸化的 STAT 會形成雙體(dimer)的型式，進入細胞核中，結合到特定的核苷酸序列 (TTCnnnGAA) 稱之為 Gamma interferon Activated Site(GAS)，起始下游基因的轉錄(附圖一)(Arbouzova and Zeidler, 2006; Yan et al., 1996)。哺乳動物體中有四種不同的 Jak kinase(Jak1、Jak2、Jak3、Tyk2)(Firmbach-Kraft et al., 1990; Harpur et al., 1992; Johnston et al., 1994; Krolewski et al., 1990; Rane and Reddy, 1994; Wilks, 1991)，以及七個 STATs(STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5a、STAT5b、STAT6)(Schindler and Darnell, 1995)，它們彼此之間嚴密的交互作用調控多種不同的發育過程及生理反應，在功能上它們具有部分重複性。

果蠅為研究 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的良好模式生物

果蠅僅包含一個 Jak kinase 和一個 STAT，它們的序列在演化上與哺乳動物同源(Binari and Perrimon, 1994; Hou et al., 1996; Yan et al., 1996)，但相較於哺乳動物，果蠅 Jak/STAT 訊息傳遞鏈簡單許多。由於果蠅具有完整的 Jak/STAT 訊息傳遞鏈，加上果蠅在過去研究的歷史

上已累積許多遺傳研究方面的工具，所以果蠅是研究 Jak/STAT 訊息傳遞鏈一個良好的模式生物。果蠅的 Jak/STAT 訊息傳遞鏈調控許多重要發育過程和生理反應，其中包含胚胎時期體節的發育(Harrison et al., 1998)、性別的決定(Sefton et al., 2000)、氣管的生成(Chen et al., 2002)，幼蟲時期血球的發育(Harrison et al., 1995)、眼睛發育中細胞的增生(Tsai and Sun, 2004)和小眼極性的排列(Zeidler et al., 1999)，以及卵巢發育時的邊緣細胞移動(border cell migration) (Beccari et al., 2002)，成蟲時期生殖幹細胞的維持(Tulina and Matunis, 2001)、免疫反應(Agaisse and Perrimon, 2004)和長期記憶的調控(Copf et al., 2011)。從細胞的層級來看，果蠅的 Jak/STAT 訊息傳遞鏈調控細胞的增生、細胞的分化以及細胞的移動(Arbouzova and Zeidler, 2006)。由此我們觀察到果蠅的 Jak/STAT 訊息傳遞鏈雖然簡單但卻能調控多種不同的功能。

果蠅 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的成員

果蠅的 Jak/STAT 訊息傳遞鏈僅包含一個 Jak kinase，當其失去功能(Loss of function)，在胚胎時期會產生體節 T2、T3、A4、A5 缺失的表型(Perrimon and Mahowald, 1986)，有如兒童跳房子遊戲跳過一格，故名為 Hopscotch(Hop)。另一方面果蠅僅包含一個 STAT，由於其基因位於果蠅唾液腺第三條染色體 92E 的區域，故名為 STAT92E。果蠅的

Jak/STAT 訊息傳遞鏈具有三個配體(Ligand)：Unpaired(Upd)、Upd2、Upd3(統稱為 Upd-likes)，它們都具有 N 端訊息序列(Signal sequence)，和氨基連接的醣化點(N-linked glycosylation site)，推測這三個 Upd-like 蛋白皆可能為分泌性的醣化蛋白。此三個配體都已被證實具有活化果蠅的 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的能力(Harrison et al., 1998; Hombria et al., 2005; Wright et al., 2011)。近期的研究指出，Upd-like 蛋白與哺乳動物的瘦體素(Leptin)在胺基酸序列上最為相近(Arbouzova and Zeidler, 2006)。果蠅的三個 Upd-like 配體能藉由兩個受體傳遞訊息：Domeless(Dome)以及 Domelike，其中 Dome 是首先被發現，且為主要活化果蠅 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的受體(Brown et al., 2001; Chen et al., 2002)。Dome 受體的細胞外區域(Extracellular domain)包含有三個纖維連接蛋白類型三區域(Fibronectin-type-III(FN III)domains)，以及細胞激素結合區域(Cytokine binding motif(CBM))，這是哺乳動物第一型細胞激素受體家族的特徵(Cytokine receptor class I family)，經過序列比對發現，Dome 和介白素六受體(Interleukin-6 receptor)最為接近(Brown et al., 2001)。而 domelike 基因座落於果蠅 X 染色體，與 dome 基因在相鄰的位置上，且有相同的轉錄方向，顯示它可能由於基因的複寫(Gene duplication event)所產生。Dome 和 Domelike 的蛋白質結構在細胞外區域非常相似，然而它們細胞質區域(Cytoplasmic domain)卻相當不同

(Makki et al., 2010)，Domelike 的細胞質區域相較於 Dome 短了許多，並且沒有 STAT 的結合點(Makki et al., 2010)。

果蠅 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的配體：Upd

Upd 為果蠅 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的配體，也是在果蠅中研究最多的 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的配體(Arbouzova and Zeidler, 2006)。在果蠅胚胎時期，*upd* 會表達於胚胎早期的體節，呈現帶狀分布，晚期則表達於氣孔的位置(Harrison et al., 1998)。*upd* 若失去功能，在胚胎發育時期也會造成體節缺失的表型，使腹部體節不成對，故命名為 *unpaired(upd)*(Harrison et al., 1998)，此表型與 *hop* 以及 *STAT92E* 的突變相同(Hou et al., 1996; Perrimon and Mahowald, 1986)，因而推測它們可能為同一條訊息傳遞鏈中的成員。Upd 蛋白的 N 端具有訊息序列(Signal sequence)，並且也已證實 Upd 蛋白為氨基連接的醣化蛋白(N-linked glycoprotein)(Harrison et al., 1998)。在細胞培養的實驗中，也觀察到 Upd 蛋白會分泌至細胞外，且結合於細胞外基質上(Harrison et al., 1998; Hombria et al., 2005)。Upd 在果蠅眼睛的發育中扮演重要的角色。於果蠅二齡幼蟲時期，Upd 會表現在眼碟後端的中心點上，並且能活化遠處細胞的 Jak/STAT 訊息傳遞鏈，促使未分化細胞的增生(Tsai and Sun, 2004)，證實在果蠅體內 Upd 為分泌性蛋白質，並且具有

遠距離活化 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的能力(Tsai and Sun, 2004);另一方面, Upd 於眼碟後端的中心點上表達, 分泌擴散至眼碟組織中, 影響果蠅複眼背側及腹側的平面極性(Zeidler et al., 1999)。Upd 也參與果蠅性別決定基因 *sex-lethal* 的表達中, 影響果蠅 X 染色體及體染色體的比例, 進而決定果蠅的性別(Jinks et al., 2000; Sefton et al., 2000)。Upd 也被證實和生殖幹細胞的維持有關, Upd 會表達於雄性成蟲的睪丸前端生殖幹細胞棲位(Hub)的位置, 使緊鄰幹細胞棲位的細胞維持幹細胞的命運(Tulina and Matunis, 2001)。大量表現 Upd 於生殖幹細胞, 將導致生殖幹細胞數目大量增加, 而不走向分化的命運(Tulina and Matunis, 2001)。Upd 也參與果蠅卵巢發育的調控, 卵巢中的極細胞(polar cell)會表達 Upd, 並影響周圍的濾泡細胞(follicle cells), 使它們跟隨極細胞(polar cell)一起移動, 此稱為邊緣細胞移動(border cell migration)(Beccari et al., 2002)。在近期的研究中也提出, Upd 也表達於果蠅成蟲大腦中的蕈狀體(mushroom bodies)的位置, 影響果蠅長期記憶的生成(Copf et al., 2011)。

果蠅 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的配體：Upd2

在細胞培養的實驗中, 已證實 Upd2 為分泌性蛋白, 並且具有活化 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的能力(Gilbert et al., 2005; Hombria et al., 2005)。

然而 Upd2 分泌至細胞外後並不會結合於細胞外基質(Hombria et al., 2005), 這與 Upd 的特性不同。在先前的研究中發現, 若將 Upd 及 Upd2 的訊息序列互換, 會導致它們分泌至細胞外的特徵互換(Hombria et al., 2005)。在活體內的研究, 也證實 Upd2 和 Upd 是透過相同的受體 Dome 活化 Jak/STAT 訊息傳遞鏈(Hombria et al., 2005)。另一方面, Upd2 在胚胎時期表現的區域非常類似 Upd(Harrison et al., 1998; Hombria et al., 2005), 於胚胎第 9 期, Upd2 表現在果蠅胚胎體節的位置, 與 Upd 同樣呈現帶狀分布, 在胚胎第 10 期, Upd2 的表達則出現在氣孔的位置(Hombria et al., 2005), 並且在胚胎時期也觀察到 Upd2 能夠部分挽救 Upd 缺失時所造成的影響(Gilbert et al., 2005; Hombria et al., 2005)。我們實驗室建立的 *upd2* 突變株是能夠存活, 具有和野生型果蠅相同大小的眼睛, 且不影響其繁殖的能力(Osman et al., 2012)。目前 *upd2* 主要的功能仍不清楚, 最新的研究提出, 它可能和瘦體素(Leptin)類似, 執行類似遠距離荷爾蒙的功能(Rajan and Perrimon, 2012)。

果蠅 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的配體：Upd3

Upd3 會活化 Jak/STAT 訊息傳遞鏈(Wright et al., 2011)。在細胞培養的實驗中, Upd3 被觀察到會分泌至細胞外, 並且會結合在細胞外基質上(Wright et al., 2011)。Upd3 會參與在果蠅免疫反應的調控中

(Agaisse et al., 2003; Makki et al., 2010)。在果蠅幼蟲時期淋巴腺的幹細胞棲位(posterior signaling center)及髓質區(medullary zone)中都可觀察到 Upd3 的表達(Jung et al., 2005)，並且能活化髓質區的 Jak/STAT 訊息傳遞鏈，以維持髓質區中的血球前驅細胞(prohemocytes)的數量，避免不正常的分化(Makki et al., 2010)。然而一旦果蠅幼蟲受到寄生蜂下蛋寄生時，Upd3 的表達會受到抑制，此時就能有足夠數量的血球前驅細胞進行分化，以執行免疫功能(Makki et al., 2010)。另一方面，果蠅幼蟲時期的中腸細胞若受損或受到細菌感染，會引發 Upd3 的表現，促使腸幹細胞增生、中腸先驅細胞分化，以修補受損的組織(Buchon et al., 2009)。此外 Upd3 也會表達於雄性胚胎 14-16 期的生殖腺中，推測 Upd3 也可能參與在生殖腺發育的調控中(Hombria et al., 2005)。雄性成蟲睪丸前端的幹細胞棲位(Hub)，也可觀察到 *upd3* RNA 的表現(鄭雅仁同學，國立台灣大學丁照棣老師實驗室)，這和 *upd* 的表現區域重疊的現象。在我們實驗室先前的研究發現，*upd3* 如同 *upd* 也表達在果蠅二齡幼蟲眼碟後端的中點上，並且調控果蠅複眼的發育(Tsai and Sun, 2004; Huang, Y.T., 2009)。實驗室先前所建立的 *upd3* 突變株是能夠存活，但具有小眼的表型(Huang, Y.T., 2009)，以及 *upd3* 突變的雄果蠅子代數目，有相較於野生型雄果蠅減少的現象(Lin, W.H., unpublished data)。

果蠅 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的受體：Dome

Dome 是首先被證實為果蠅 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的受體(Brown et al., 2001; Chen et al., 2002)。Dome 受體的細胞外區域(Extracellular domain)包含有三個纖維連接蛋白類型三區域(Fibronectin-type-III(FN III)domains)，以及細胞激素結合區域(Cytokine binding motif(CBM))，這是哺乳動物第一型細胞激素受體家族的特徵(Cytokine receptor class I family)(Heinrich et al., 1998)。在細胞激素結合區域的 N 端具有四個保守的半胱氨酸(Cysteine)，在 C 端則有 WSXWS 區域，Dome 在細胞激素結合區域有 N 端保有的四個半胱氨酸，而在 C 端則是不完全的 WSXWS 區域(Dome 為 NTXWS)，經過序列比對發現，Dome 和介白素六受體家族(Interleukin-6 receptor type family)最為接近(Brown et al., 2001)。

dome 突變株的果蠅在胚胎時期有後端氣孔圓拱型構造的缺失，以及體節缺失的表型，故名為 Domeless(Dome)(Brown et al., 2001)，或稱為 *master of marelle(mom)*(Chen et al., 2002)。在先前的研究中，利用 β blue- β blau β -galactosidase complementation 的技術，證實了 Dome 能在活體中形成雙體 (Brown et al., 2003)，這個方法是將 β -galactosidase 分成兩個區域： $\Delta\alpha$ 、 $\Delta\omega$ ，然後分別和 Dome 做成融合蛋白，其中 $\Delta\alpha$ 及 $\Delta\omega$ 兩個區域不會自己發生交互作用，唯有當兩個

Dome 受體發生交互作用時，拉近 $\Delta\alpha$ 及 $\Delta\omega$ 的距離才會產生 β -galactosidase 的活性，並可以利用 X-gal 染色來偵測 β -galactosidase 的活性(Brown et al., 2003)。此篇論文的作者將 Dome $\Delta\alpha$ 和 Dome $\Delta\omega$ 表達於整個果蠅胚胎，發現只有在特定區域才有雙體的形成(Brown et al., 2003)，顯示 Dome 要形成雙體是受到調控的。在他們的觀察中更發現，和脊椎動物的細胞激素訊息鏈不同，Dome 形成雙體的形式是不需依靠配體的(Brown et al., 2003)。他們也發現唯有形成雙體後，才能夠接收配體的訊息，再進而傳遞訊號至下游，活化 Jak/STAT 訊息傳遞鏈(Brown et al., 2003)。在我們實驗室先前的研究中，當大量表達 Dome 於果蠅的複眼時，會導致小眼的表型，推測這是由於顯性的負向影響(Dominant negative effect)，有一種可能的假說：當大量的 Dome 表現於細胞膜時，由於沒有增加足夠劑量的 Jak kinase 結合於 Dome 的細胞質區域，然而唯有兩個 Dome 受體都有 Jak 結合才能傳遞配體的訊息，所以過多的 Dome 表達時會造成許多沒有能力傳遞訊息的 Dome 受體，當 Upd-like 配體結合時無法向下傳遞訊息，因此稀釋了 Upd-like 配體有效傳遞訊息的數量，結果導致失去功能的表型。

果蠅 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的受體：Domelike

果蠅 X 染色體 18A *dome* 基因下游有一個相鄰的基因(CG14225)，

在最近的研究中指出，CG14225 可能為 Jak/STAT 訊息傳遞鏈另一個受體(Kallio et al., 2010; Makki et al., 2010)。由於 CG14225 表達的蛋白質結構類似於 Dome，因此我們實驗室稱它為 Domelike(DL)。Domelike 的細胞外區域(Extracellular domain)的蛋白質結構與 Dome 相近，都具有細胞激素結合區域(Cytokine binding motif(CBM))，並且有 43% 的相似度(Makki et al., 2010)，以及在細胞激素結合區域之後，有一段約 200 個胺基酸的 Lat-Dome 同源區域，有 41% 的相似度(Makki et al., 2010)。但是 Domelike 的細胞外區域並沒有纖維連接蛋白類型三區域(Fibronectin-type-III(FN III)domains)。Dome 與 Domelike 最大的不同是在它們的細胞質區域(Cytoplasmic domains)，Domelike 的細胞質區域比 Dome 短了很多，並且沒有 STAT 的結合點(序列 YXXQ)(Makki et al., 2010)。

Domelike 已證實可在活體中形成雙體，並且也能和 Dome 形成異雙體(Makki et al., 2010)。近期的研究證實 Domelike 對果蠅 Jak/STAT 訊息傳遞鏈是扮演一個抑制者的角色。由於在果蠅複眼中抑制 Domelike 的表達，會造成果蠅複眼變大的表型，因此稱作 Eye transformer(簡稱 ET)(Kallio et al., 2010)。在細胞實驗中，當利用 ET 的 shRNA 抑制 ET 的表達，發現 STAT 磷酸化的現象上升，活化 Jak/STAT 訊息傳遞鏈，因此推測 ET 也就是 Domelike 可能扮演 Jak/STAT 訊息傳遞鏈抑制者的角色

(Kallio et al., 2010)。另一方面，Domelike 參與在果蠅受到寄生蜂感染時，產生免疫反應的調控中(Makki et al., 2010)。當果蠅幼蟲受到寄生蜂感染時，其淋巴腺的髓質區會表達 Domelike，抑制 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的活性，使淋巴腺髓質區中的血球前驅細胞進行分化為葉狀血細胞(Lamellocyte)，以抵制寄生蟲的感染(Makki et al., 2010)。

在我們實驗室先前的研究中發現，表達 Domelike 於果蠅複眼，會造成小眼的表型。表達 Domelike 於果蠅翅膀，會造成翅膀合不攏，並且有額外翅膀的表型(Chiu, Y.T., unpublished data)。

Dome 及 Domelike 受體和 Upd-like 配體預測可能的結合區域

哺乳動物第一型細胞激素受體家族中，在蛋白質結構的 N 端都具有細胞激素結合區域(Cytokine binding motif(CBM))(Heinrich et al., 1998)。細胞激素結合區域的 N 端具有四個保守的半胱氨酸(Cysteine)，在 C 端則有 WSXWS 區域，是受體與細胞激素結合時的重要區域(Heinrich et al., 1998)。Dome 和 Domelike 的蛋白質結構上都預測到細胞激素結合區域，與哺乳動物第一型受體家族同源，可能為 Dome 及 Domelike 受體在結合 Upd-like 配體時很重要的區域(Brown et al., 2001; Makki et al., 2010)。三個 Upd-like 配體在我們實驗室先前的研究中，將它們的蛋白質序列進行比對發現有一段約 77 個胺基酸的相似

區域，相似度為 52.6%，稱之為 Upd 區域(Upd domain) (Huang, Y.T., 2009)，單獨將 Upd 和 Upd2 比對此區域，相似度更達 75.6%(Huang, Y.T., 2009)，分析此區域的蛋白質結構，發現此區域可形成螺旋(Helix)的二級結構。在果蠅目前已定序完成的 11 個物種中 (*Drosophila pseudoobscura*、*Drosophila persimilis*、*Drosophila sechellia*、*Drosophila simulans*、*Drosophila erecta*、*Drosophila yakuba*、*Drosophila ananassae*、*Drosophila virilis*、*Drosophila grimshawi*、*Drosophila willistoni*、*Drosophila mojavensis*)，此區域也具有高度保留性(aligned by Dr. Jyung-Hurng Liu)。顯示此區域在演化上保留，可能為 Upd-like 配體在蛋白結構上或與受體結合執行功能的重要區域。

問題及假說

果蠅的 Jak/STAT 訊息傳遞鏈中，三個 Upd-like 配體及兩個 Dome 受體之下，僅只有一個 Jak 和一個 STAT，但卻能調控多種發育過程及生理反應，我們推測：在 Jak/STAT 訊息鏈中，Upd-like 蛋白和兩個 Dome 受體之間有交互作用，並在不同的組合下，由於親和力和作用位置的不同，引發下游不同活性，進而執行不同功能。在我的研究中，我將在 S2 細胞株中，利用免疫共沉澱法測試 Upd-like 蛋白是否會形成同雙體及異雙體。我也會表達 Upd-like 蛋白和 Dome 或 Domelike 受體，利

用 Jak/STAT 活性的報告者以及觀察成蟲複眼的表型來比較，不同配體與受體的組合是否造成不同的 Jak/STAT 訊息傳遞鏈活性，以及對成蟲複眼表型有何影響。



實驗材料

引子清單(Primer list)

Construct	Primer (enzyme site)	Sequence of primer (Tm)
pUAST- dome ^{EXT} DL ^{CYT}	dome-11F	CgCCgCCACAActgTACgTg (58.7°C)
	Swap-domeE-2R (Hind III)	TAAgCTTCTTgCggTATTTCTTgTACACgAg (54.9°C)
	Swap-DLC-1F (Hind III)	GAAgCTTgACATCCgggTTgAACTgCCA (59.3°C)
	DL-12R (Xho I)	GCTCgAgTCCCgAgAgATTTCAgCgCAC (58.9°C)
pUAST- DL ^{EXT} dome ^{CYT}	Domelike-5F (Eco R I)	AgAgATCTCCgCgAATTCgACTATCAg (61.1°C)
	Swap-DLE-2R (Sac II)	GCCgCggTTCAACCCggATgTCCgCCA (62.7°C)
	Swap-domeC-1F (Sac II)	CCgCggAAgAAATACCgCAAgATgTCCgATA (57.1°C)
	Dome-14B (Xba I)	TCTAgATTAgAggACgTgCCgATTgTggg (61.8°C)

pUAST- Upd-Myc	Upd-1F (EcoR I)	<u>gAATTC</u> ATggCTCgTCCgCTgCTCCT (60.7°C)
	Upd-R-Myc (Xba I)	<u>ATCTAg</u> ATCACAgATCTTCTTCAgAAATAA gTTTTTgTTCCgTgCgCTgCACgCgCTT (63.9°C)
pUAST- Upd-flag	Upd-1F (EcoR I)	<u>gAATTC</u> ATggCTCgTCCgCTgCTCCT (60.7°C)
	Upd-R-flag (Xba I)	<u>ATCTAg</u> ATCACTTgTCgTCgTCgTCCTTgT AgTCCgTgCgCTgCACgCgCTT (63.9°C)
pUAST- New Upd2-GFP	New upd2-3F (EcoR I)	<u>TgAATTC</u> ATgATCCTgAgCgTCgTgATgC (58.7°C)
	Upd2-12b (Sac II)	<u>TCCgCgg</u> AgACTCATTggATCCgCCATCg (59.8°C)
pUAST- New Upd2-Myc	New upd2-3F (EcoR I)	<u>TgAATTC</u> ATgATCCTgAgCgTCgTgATgC (58.7°C)
	Upd2-R-Myc (Xho I)	<u>ACTCgAg</u> TCACAgATCTTCTTCAgAAATAA gTTTTTgTTCAgACTCATTggATCCgCCAT Cg (59.8°C)

pUAST- Upd3-Myc	Upd3-start -Not I	AgCggCCgCATgACgACAgCTgACCgCCC (59.5°C)
	Upd3-R-Myc (Xho I)	TCTCgAgCTACAgATCTTCTTCAgAAATAA GTTTTTgTTCgAgTTTCTTCTggATCgCCT TTg (56°C)
pUAST- Upd3-flag	Upd3-start -Not I	AgCggCCgCATgACgACAgCTgACCgCCC (59.5°C)
	Upd3-R-flag (Xho I)	TCTCgAgCTACTTgTCgTCgTCgTCCTTgT AgTCgAgTTTCTTCTggATCgCCTTTg (56°C)

果蠅株(Fly stock)

*w*¹¹¹⁸

w; Sp/CyO;Dr/TM6B

w; DH/SM6-TM6B

from Dr. Y. H. Sun

from Dr. Y. H. Sun

from Dr. Y. H. Sun

Gal4 line

w;ey-Gal4(III)

w;GMR-Gal4(III)

from Dr. Y. H. Sun

form Dr. C.H. Chen

Extracellular staining

w;UAS-upd-GFP³⁵⁻¹/SM6-TM6B

w;UAS-upd2-GFP¹⁷⁻¹/CyO

w;UAS-upd2-GFP¹⁷⁻¹/SM6-TM6B

w;UAS-GFP-upd3⁶⁻²/TM6B

w;UAS-upd;GMR-Gal4/SM6-TM6B

w;UAS-upd2/Cyo;GMR-Gal4/TM6B

w;UAS-upd2;GMR-Gal4/SM6-TM6B

w;UAS-upd3;GMR-Gal4/SM6-TM6B

from our lab

from our lab

from our lab

from our lab

from our lab

from our lab

from our lab

from our lab

Test Jak/STAT pathway activity

w;10XSTAT92EGFPNLS/CyO;GMR-Gal4/TM6B

w;10XSTAT92EGFPNLS;GMR-Gal4/SM6-TM6B

w;10XSTAT92EGFPNLS;ey-Gal4/SM6-TM6B

w;10XSTAT92EGFPNLS/CyO;dpp-Gal4/TM6B

w; 10XSTAT92EGFPNLS;dpp-Gal4/SM6-TM6B

w;UAS-upd²¹³³/CyO

w;UAS-upd2⁹/TM6B

w;UAS-IP8763⁴⁻²/CyO

w;UAS-upd3⁴⁻²/TM6B

w;UAS-dome/TM6B

w;UAS-DL¹²⁻¹(II)

w;UAS-DL¹²/TM6B

from our lab

from our lab

from our lab

in this study

in this study

from Dr. N. Perrimon

from our lab

from our lab

from our lab

from our lab

from our lab

from our lab

upd-likes interaction

w;UAS-upd²¹³³/CyO;Dr/TM6B

w;UAS-upd2³/CyO;Dr/TM6B

w;Sp/CyO;UAS-upd2⁹/TM6B

in this study

from our lab

in this study

w;UAS-IP8763 ⁴⁻² /CyO;Dr/TM6B	in this study
w;Sp/CyO;UAS-upd3 ⁴⁻² /TM6B	from our lab
w;UAS-upd ²¹³³ /CyO;UAS-upd2 ⁹ /TM6B	in this study
w;UAS-upd ²¹³³ ;UAS-upd2 ⁹ /SM6-TM6B	in this study
w;UAS-upd ²¹³³ /CyO;UAS-upd3 ⁴⁻² /TM6B	in this study
w;UAS-upd ²¹³³ ;UAS-upd3 ⁴⁻² /SM6-TM6B	in this study
w;UAS-upd2 ³ ;UAS-upd3 ⁴⁻² /SM6-TM6B	in this study
w;upd-GFP/FM7;upd ²¹³³ /CyO	in this study
w;UAS-upd2-GFP ¹⁷⁻¹ /CyO;Dr/TM6B	in this study
w;Sp/CyO;UAS-upd2-flag ¹ /TM6B	in this study
w;UAS-upd2-GFP ¹⁷⁻¹ ;UAS-upd2-flag ¹ /SM6-TM6B	in this study
w;UAS-UAS-upd-GFP ³⁵⁻¹ /CyO;UAS-upd3 ⁴⁻² /TM6B	in this study
w;UAS-UAS-upd2-GFP ¹⁷⁻¹ /CyO;UAS-upd3 ⁴⁻² /TM6B	in this study

upd-likes, dome interaction

w;Sp/CyO;UAS-dome/TM6B	in this study
w;Sp/CyO;UAS-DL ¹² /TM6B	in this study
w;UAS-upd ²¹³³ /CyO;UAS-dome/TM6B	in this study
w;UAS-upd ²¹³³ ;UAS-dome/SM6-TM6B	in this study
w; UAS-upd2 ³ /CyO;UAS-dome/TM6B	in this study
w UAS-upd2 ³ ;UAS-dome/SM6-TM6B	in this study
w; UAS-IP8763 ⁴⁻² /CyO;UAS-dome/TM6B	in this study
w UAS-IP8763 ⁴⁻² ;UAS-dome/SM6-TM6B	in this study
w;UAS-upd ²¹³³ /CyO;UAS-DL ¹² /TM6B	in this study
w;UAS-upd ²¹³³ ;UAS- DL ¹² /SM6-TM6B	in this study
w; UAS-upd2 ³ /CyO;UAS-DL ¹² /TM6B	in this study
w UAS-upd2 ³ ; UAS-DL ¹² /SM6-TM6B	in this study
w; UAS-IP8763 ⁴⁻² /CyO;UAS- DL ¹² /TM6B	in this study
w UAS-IP8763 ⁴⁻² ; UAS-DL ¹² /SM6-TM6B	in this study
w;UAS-upd-GFP ³⁵⁻¹ ;UAS-dome/SM6-TM6B	in this study
w;UAS-upd2-GFP ¹⁷⁻¹ ;UAS-dome/SM6-TM6B	in this study
w;UAS-upd-GFP ³⁵⁻¹ ;UAS-DL-GFP/SM6-TM6B	in this study
w;UAS-upd2-GFP ¹⁷⁻¹ ;UAS-DL-GFP/SM6-TM6B	in this study
w; UAS-IP8763 ⁴⁻² ;UAS-DL-GFP/SM6-TM6B	in this study

dome, domelike domain swap

w;UAS-DL ^{EXT} dome ^{CYT 11-1} /CyO	in this study
w;UAS-DL ^{EXT} dome ^{CYT 12-1} /CyO	in this study

<i>w;UAS-DL^{EXT}dome^{CYT 12-2}/TM6B</i>	<i>in this study</i>
<i>w;UAS-dome^{EXT}DL^{CYT 4}/CyO</i>	<i>in this study</i>
<i>w;UAS-dome^{EXT}DL^{CYT 9}/CyO</i>	<i>in this study</i>
<i>w;UAS-dome^{EXT}DL^{CYT 10}/TM6B</i>	<i>in this study</i>
<i>w;UAS-dome^{EXT}DL^{CYT 22}/TM6B</i>	<i>in this study</i>

化學藥品

2-mercaptoethanol	Merck:8.05740
Acetone	Merck:100020
Agar	BD:214530
Agarose	Amersco:0710
Ampicillin	Sigma:A5918
Aprotitin	Sigma:A1153
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma:A9647
Bromophenol blue	Sigma:B0126
Chloroform	Merck:1.02445
dNTP	Roche:11969064001
EDTA	Merck:1.08418
Ethanol	Merck:1.00983
Glycerol	Merck:1.04903
Glycine	Bio-rad:161-0724
Isoamyl Alcohol(IAA)	Merck:1.00979
Isopropanol	Merck:1.09634
KCl	Merck:1.04936
KH ₂ PO ₄	Merck:1.04873
KOAc	Merck:1.04820
Leupetin	Sigma:L2884

Methanol	Merck:1.06007
MgCl ₂	Usb:18641
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	Merck:1.06580
NaCl	Amresco:0241
NaOH	Merck:1.06498
NH ₄ OAc	Merck:1.01116
Nonfat milk	安佳脫脂奶粉
NP-40	Sigma:BM0919-1
Paraformadehyde	Merck:1.04005
Pfu Turbo DNA polymerase	Stratagene:0380316
pGEM-T-vector	Promega:A362A
Phenol	Amresco:0981
PMSF	Sigma:P7625
Prime Taq polymerase	GeNet Bio
RNase	Promega:M6101
Sodium dodecyl sulfate(SDS)	Merck:8.22050
Sodium orthovanadate	Sigma:S6508
T4 ligase	Promega:M180A
TB dry powder growth media	Mo Bio:12105-1
Tris	Amresco:0710
Triton X-100	Sigma:T8532
Tunicamycin	Sigma:T7765
Tween-20	Sigma:P5927
Yeast extract	BD:212750

抗體

Western blot

Primary antibodies			
Host	Antigen	Titer	Company
Rabbit	GFP	1:15000	Abcam(ab290)
Rabbit	GFP	1:5000	Abcam(ab6556)
Rabbit	HA	1:3000	GeneMark
Mouse	HA	1:1000	GeneMark
Rabbit	flag	1:2000	GeneMark
Mouse	flag	1:1000	Stratagene (M2)
Mouse	Tubulin	1:5000	Sigam
Rabbit	Upd3	1:10000	U1, 8th boost
Secondary antibodies			
Antigen	Titer	Company	
HRP-conjugated goat anti-Rabbit IgG	1:5000	GeneTex	
HRP-conjugated goat anti-Mouse IgG	1:5000	GeneTex	

Immunofluorescence staining

Primary antibodies			
Host	Antigen	Titer	Company
Rabbit	GFP	1:333 (Extracellular staining)	Invitrogen
Rat	Elav	1:400	Iowa hybridoma bank
Rabbit	Caspase-3	1:200	Cell signaling

Secondary antibodies		
Antigen	Titer	Company
Cy5 Rabbit-IgG	1:200	Jackson Immuno Research
Cy3 Rat-IgG	1:400	Jackson Immuno Research
Cy3 Rabbit-IgG	1:400	Jackson Immuno Research

Co-immunoprecipitation

Host	Antigen	Concentration	Company
Mouse	GFP	0.4mg/ml	Roche
Mouse	HA	1mg/ml	GeneMark
Rabbit	HA	1mg/ml	GeneMark
Mouse	flag	2mg/ml	Stratagene (M2)

實驗方法

(一)細胞培養

果蠅 S2 和 S2^{R+}細胞株在 25°C 下以 1X Schneider's *Drosophila* Medium(GIBCO)外加 10%胎牛血清(Fetal Bovine Serum/FBS; 56°C 熱去補體活性)及 1%Penicillin-Streptomycin 培養於 T25 培養瓶中，並於 3 至 4 天後以 1:4 稀釋倍率進行繼代培養。

(二)細胞短暫轉染(Transient transfection)

將細胞培養於 10 公分培養盤，3 至 4 天後取出以顯微鏡觀察生長狀況，再吸至 15ml 離心管，室溫下以轉速 1000rpm 離心 5 分鐘。細胞離心後去除上清液，以 8~10ml 已過濾的培養液(利用 0.22 μ m 過濾膜過濾，不含 FBS)清洗，室溫下再以 1000rpm 離心 5 分鐘，離心後去除上清液，並回溶於 8~10ml 的培養液(不含 FBS)。在六孔盤培養皿中，每一個孔放入 6×10^6 個細胞進行實驗。每一個孔準備少於 2 μ g 的質體 DNA 混和於 100 μ l 的培養液(不含 FBS)混和均勻；另一方面，準備和質體 DNA 重量比例為 1:8 的 Cellfectin[®] II Reagent (Invitrogen; 1 μ g/ μ l)混和於 100 μ l 的培養液(不含 FBS)混和均勻。再將 cellfectin 培養液慢慢加入質體 DNA 培養液中，溫和的混和均勻。靜置 15 至 30 分鐘後，再將質體 DNA/cellfectin 混和液慢慢加入放有細胞的孔中，

最後以培養液(不含 FBS)將每個孔補體積至 1ml，放入 25°C 恆溫培養箱中，培養 16 小時後，將培養液更換成 3ml 含有 FBS 的培養液，繼續培養 48 小時後，收取細胞進行免疫染色或萃取蛋白質進行分析。

(三)S2 細胞蛋白萃取

將細胞培養液放至 1.5ml 離心管中，在 4°C 下以轉速 1000rpm 離心 5 分鐘，去除上清液後，以 1ml 的 1X PBS(137mM NaCl、2.68mM KCl、10mM Na₂HPO₄、1.76mM KH₂PO₄)清洗細胞，在 4°C 下以轉速 1000rpm 離心 5 分鐘，去除上清液後，加入 80~150 μ l 的 lysis buffer(0.05M Tris(pH=7.8)、0.15M NaCl、0.5% Triton X-100、0.5% NP-40 及蛋白酶抑制劑：0.1mM PMSF、5 μ g/ml Leupetin、10 μ g/ml Aprotinin、5 μ g/ml Pepstatin)混合均勻，置於冰上 30 分鐘後，在 4°C 下以轉速 13000rpm 離心 10 分鐘，收集上清液，在 4°C 下再以轉速 13000rpm 離心 5 分鐘，收集上清液，即為細胞蛋白萃取液。

(四)蛋白質濃度定量

配置五種標準濃度的牛血清蛋白(Bovine Serum Albumin /BSA)，濃度分別為 1mg/ml、2mg/ml、3mg/ml、4mg/ml 和 5mg/ml，將細胞蛋白樣本分別稀釋 2 倍及 4 倍。取標準蛋白和蛋白樣本各 5 μ l，分別加入 1ml 呈色劑(ddH₂O 和 Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate

以 1:4 混和), 室溫下反應 5 分鐘後以波長 595nm 測定吸光值, 分光光度計需事先暖機十分鐘, 選擇 Protein assay 中 Bradford 模式, 以標準蛋白製作標準曲線, 再測定蛋白樣本的吸光值並依據標準曲線換算為蛋白濃度。

(五)免疫共沉澱法(Co-immunoprecipitation)

利用短暫轉染使 S2 細胞大量表現特定蛋白, 並利用外加蛋白酶抑制劑的免疫共沉澱緩衝液(Co-IP buffer: 20mM HEPES(pH=7.5)、150mM NaCl、0.5%NP-40、10mM NaF、10% Glycerol 外加蛋白酶抑制劑: 0.1mM PMSF、5 μ g/ml Leupeptin、10 μ g/ml Aprotinin、5 μ g/ml Pepstatin、2mM Sodium orthovanadate)萃取細胞蛋白質。取 2mg 的細胞蛋白至 1.5ml 離心管中, 加入 50 μ l 的 protein G, 再以 Co-IP buffer 將體積補至 1ml, 在 4 $^{\circ}$ C 下搖晃 1 小時, 在 4 $^{\circ}$ C 下以轉速 4000rpm 離心 1 分鐘, 收集上清液, 接著加入 2 μ g 的抗體, 在 4 $^{\circ}$ C 下搖晃 2 小時, 再加入 50 μ l 的 protein G, 在 4 $^{\circ}$ C 下搖晃 3 小時, 在 4 $^{\circ}$ C 下以轉速 4000rpm 離心 1 分鐘, 吸取上清液為 Flow through, 加入 1ml Co-IP buffer 清洗沉澱下來的 protein G beads, 在 4 $^{\circ}$ C 下搖晃 20 分鐘, 在 4 $^{\circ}$ C 下以轉速 4000rpm 離心 1 分鐘, 重複三次, 去除上清液, 加入 30 μ l 5X protein sample buffer(60mM Tris-HCl、25% glycerol、2% SDS、

14.4mM 2-mercaptoethanol、0.1% Bromophenol blue)至沉澱下來的 protein G beads，放入 100°C 沸水浴 7 分鐘，得到免疫沉澱產物，利用西方點墨法分析。

(六)西方點墨法(Western blot)

將蛋白質萃取物混和 5X protein sample buffer(60mM Tris-HCl、25 % glycerol、2% SDS、14.4mM 2-mercaptoethanol、0.1% Bromophenol blue)，放入 100°C 沸水浴 7 分鐘使蛋白變性(denature)。將蛋白樣本注入 10 % 正二十烷硫酸鈉-聚苯乙烯醯胺電泳膠 (Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis : SDS-PAGE)，固定電流以 13mA 進行電泳分離。接著將電泳膠及硝化纖維膜(Nitrocellulose membrane 0.45 μ m ; BIO-RAD)浸泡於轉漬緩衝液(Transfer buffer : 50mM Tris、380mM Glycine、0.05% SDS、20% Methanol)搖晃 10 分鐘，以轉漬緩衝液將 3M 濾紙浸濕，鋪三層在半乾式轉漬裝置上(BIO-RAD)，再鋪上硝化纖維膜及電泳膠，最後再鋪三層 3M 濾紙，過程中確實去除每一層之間的氣泡，以電壓 20V 轉漬 30 分鐘，使電泳膠上的蛋白轉漬到硝化纖維膜上。將轉漬完成的硝化纖維膜放入 5%安佳脫酯牛奶(in 1X PBST : 137mM NaCl、2.68mM KCl、10mM Na₂HPO₄、1.76mM KH₂PO₄、0.05%(v/v)Tween-20)，室溫下搖晃 1 小時或 4°C 下搖晃至隔

天，以 1X PBST 輕微清洗硝化纖維膜，放入一級抗體(in 1X PBST) ，室溫下搖晃 1 小時或 4°C 下搖晃至隔天，以 1X PBST 清洗 15 分鐘三次，放入結合 HRP(Horse radish peroxidase)的二級抗體(in 1X PBST 1:5000)，室溫下搖晃 1 小時，以 PBST 清洗 15 分鐘四次。最後以 ECL 試劑在硝化纖維膜上反應產生化學冷光，利用冷光感應系統(Cool CCD camera ; Fuji film)偵測冷光訊號。

(七)S2 R⁺細胞免疫染色

將 S2 R⁺細胞培養於蓋玻片上使其貼附，去除培養液，以 1X PBS(137mM NaCl, 2.68mM KCl, 10 Na₂HPO₄·H₂O, 1.76mM KH₂PO₄)清洗 5 分鐘三次，去除清洗液，以 4%多聚甲醛(4% Paraformaldehyde in 1X PBS)室溫下固定 25 分鐘，以 1X PBS 清洗 10 分鐘三次，去除清洗液，加入 5%胎牛血清(Fetal Bovine Serum/FBS in PBST : 137mM NaCl、2.68mM KCl、10mM Na₂HPO₄、1.76mM KH₂PO₄、0.3%(v/v)Triton X-100)，室溫下靜置 30 分鐘，以 1X PBST 清洗 10 分鐘三次，在 4°C 下以 1X PBST 中進行一級抗體染色至隔夜，接著以 1X PBST 清洗三次，每次 10 分鐘。在黑暗中室溫下以 1X PBST 進行二級抗體染色 1 小時，接著再以 1X PBST 清洗三次，每次 10 分鐘，將蓋玻片取出並瀉乾。利用 DABCO 溶液(0.22M N-propyl gallate, 90% glycerol in 1X PBS)封片，以

共軛焦顯微鏡進行觀察。

(八)S2 細胞 RNA 萃取

將 S2 細胞培養於 6 孔盤培養皿至滿盤，取出觀察確定無污染，去除培養液，以 1X PBS 清洗三次，加入 1ml TRIzol® Reagent，以 pipetman 反覆吸取沖散細胞，再吸至 1.5ml 離心管，置於室溫 5 分鐘，再加入 200 μ l chloroform 混和均勻，置於室溫 3 分鐘，接著 4°C 下以轉速 12000g 離心 15 分鐘，離心完收集上清液(約 500~600 μ l)，加入 500 μ l isopropanol，置於室溫 10 分鐘，再 4°C 下以轉速 12000g 離心 10 分鐘，此時有 RNA 沉澱，去除上清液後，以 1ml 75%酒精清洗，再 4°C 下以轉速 7500g 離心 5 分鐘，去除上清液後於 60°C 下烘乾，再回溶於 12 μ l DEPC 水。

(九)反轉錄聚合酶連鎖反應

取 3 μ g 的細胞 RNA 萃取物，加入 1 μ l Oligo dT(500 μ g/ml)、1 μ l dNTP(10mM each)，再以 DEPC 水將體積補至 12 μ l，65°C 下反應 5 分鐘，再置於冰上 5 分鐘，接著加入 4 μ l 5X First strand-buffer、2 μ l 0.1M DTT、1 μ l RNase OUT(40 units/ μ l)，在 42°C 下反應 2 分鐘，再加入 1 μ l SuperScript™ II RT(200 units invitrogen)，在 42°C 下反應 50 分鐘，再放入 70°C 水浴槽下反應 15 分鐘，終止反應。

(十)聚合酶連鎖反應

取 2 μ l 少量的 DNA 模板，加入 2 μ l 正向引子(5pmol/ μ l)、2 μ l 負向引子(5pmol/ μ l)、2 μ l dNTP(2.5mM)、4 μ l 5X PC2 緩衝液、6 μ l ddH₂O、2 μ l 稀釋的 Primer Taq(1 μ l Primer Taq(2U/ μ l)加入 11.5 μ l 10X Taq 稀釋緩衝液)，混和均勻，放入 PCR 機器(Applied Biosystems 9700; AB9700)。設定反應溫度及反應時間：先在 94 $^{\circ}$ C 下 3 分鐘使雙股 DNA 模板分離為單股，接著進行 30 個循環，94 $^{\circ}$ C 下 1 分鐘，再降溫至正反向引子可黏上模板的溫度反應 1 分鐘，72 $^{\circ}$ C 下使 Taq DNA 聚合酶作用合成 DNA 片段，片段長度每 500bp 設定 30 秒，結束 30 個循環，再以 72 $^{\circ}$ C 下 7 分鐘確保每一個循環都合成完畢，最後降溫至 20 $^{\circ}$ C 停止反應。藉由膠體電泳確認 PCR 產物的片段大小及產率。

(十一)轉型作用(Transformation)

將勝任細胞(Competent cell)置於冰上解凍，電菌小管(Cuvette, BIO-RAD)置於冰上預冷，待勝任細胞解凍，立即與適量的質體 DNA 混和，並吸至電菌小管中。將電菌小管放入 MicroPulser(BIO-RAD)，設定 1.8kV 進行電穿孔，使質體 DNA 送入勝任細胞，接著加入 1ml TB 培養液混和勝任細胞，並吸至養菌管，37 $^{\circ}$ C 下以轉速 180rpm 搖晃 40 分鐘。將菌液吸至 1.5ml 離心管，室溫下 13000rpm 離心 1 分鐘，去

除部分上清液，再重新將菌液混和均勻，取適量體積塗在 LB 洋菜膠培養基(0.1mg/ml Ampicillin)，在 37°C 下培養 14 至 16 小時。

(十二)小量質體萃取

取 1ml 隔夜培養的菌液，以轉速 13000rpm 離心 1 分鐘，去除上清液，加入 100 μ l 的 Solution I(50mM glucose、25mM Tris-HCl pH=8.0、10mM EDTA pH=8.0)回溶細菌，再加入 200 μ l 的 Solution II(0.2N NaOH、1% SDS)和緩的混和均勻，等待約 3 分鐘，再加入 150 μ l 的 Solution III(0.3M CH₃COOK(KOAc) pH=5.2、11.5% CH₃COOH(HOAc)) 和緩的混和均勻，等待約 3 分鐘，再加入 100 μ l 的 chloroform/Isoamyl Alcohol(IAA)(24：1)溫柔的混和均勻，以轉速 13000rpm 離心 15 分鐘分離有機層和水層，吸取水層得到質體 DNA(約 450 μ l)。加入 900 μ l 100% EtOH，放置於-20°C 10 分鐘後，在 4°C 下以 13000rpm 離心 15 分鐘沉澱質體 DNA，去除上清液，以 1ml 70% EtOH 清洗質體 DNA，以 13000rpm 離心 5 分鐘，留下質體 DNA 沉澱，放置於 42°C，待水份完全揮發，加入 2 μ l RNase(10mg/ml)去除 RNA，以 40 μ l 1X TE(10mM Tris-HCl pH=8.0、1mM EDTA pH=8.0)回溶質體 DNA。

(十三)中量質體萃取(Viogene Midi kit)

首先在 37°C 下以 180rpm 震盪，培養 2ml 新鮮菌液 4 至 6 小時。

接著取 20 至 30 μ l 的新鮮菌液放大體積至 50ml, 加入 250ml 錐形瓶, 37 $^{\circ}$ C 下 180rpm 搖晃約 10 至 12 小時。將菌液倒入離心管, 在 4 $^{\circ}$ C 下以轉速 6000g 離心 5 分鐘, 去除上清液。加入 4ml 含 RNase 的 VP1 buffer, 回溶沉澱物, 再加入 4ml VP2 buffer, 溫和的旋轉以混和均勻, 室溫下等待 5 分鐘反應完全, 接著加入 4ml VP3 buffer, 溫和的旋轉以混和均勻, 置於冰上等待 5 分鐘反應完全, 再 4 $^{\circ}$ C 下以轉速 13000rpm 離心 15 分鐘。趁空檔製備 Midi-V100TM 管柱(column), 首先將管柱以迴旋震盪器震盪, 再加入 3ml 100%EtOH, 以重力使之流出, 再加入 10ml VPN, 同樣以重力流出完成管柱的製備。在離心結束後, 小心將上清液加入管柱, 避免吸取到沉澱物, 待上清液重力流出, 再加入 15ml VPN 沖洗。接著以 5ml VPE 洗提(elute)回溶出質體 DNA, 最後加入 3.5ml 異丙醇沉澱 DNA, 4 $^{\circ}$ C 下以轉速 13000rpm 離心 30 分鐘。離心結束, 去除上清液, 留下沉澱的 DNA, 以 70%EtOH 沖洗, 在 4 $^{\circ}$ C 下以轉速 13000rpm 離心 5 分鐘, 去除上清液, 並將 DNA 沉澱置於 42 $^{\circ}$ C 下烘乾, 最後回溶於 1X TE buffer(10mM Tris pH=8, 1mM EDTA)保存於 4 $^{\circ}$ C。

(十四)免疫組織染色

在 1X PBS 緩衝液(137mM NaCl, 2.68mM KCl, 10mM Na₂HPO₄•H₂O,

1.76mM KH_2PO_4) 中解剖果蠅幼蟲，取下眼碟及周圍組織，並去除唾液腺，再一起放入 4% 多聚甲醛(Paraformaldehyde in 1X PBS) 室溫下固定 15 至 20 分鐘。接著以 1X PBST 緩衝液(137mM NaCl, 2.68mM KCl, 10 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.76mM KH_2PO_4 , 0.3% Triton X-100) 清洗 3 次，每次 10 分鐘，並於 1X PBST 中去除多餘組織，僅留下口器及眼碟。在 4°C 下以 1X PBST 中進行一級抗體染色至隔夜(內含 10% Normal goat serum)，接著以 1X PBST 緩衝液清洗三次，每次 10 分鐘，室溫下在 1X PBST 中進行二級抗體染色 1 小時，接著再以 1X PBST 緩衝液清洗三次，每次 10 分鐘，並去除口器，僅留下眼碟。利用 DABCO 溶液(0.22M N-propyl gallate, 90% glycerol in 1X PBS) 封片。

(十五)細胞外免疫組織染色

在冰涼的 1X Grace's Medium(pH=6.3) 中解剖果蠅幼蟲，大略取出眼碟及周圍組織，並去除大腦，5 分鐘內為一批，在冰涼的 1X Grace's Medium(pH=6.3) 進行一級抗體染色，抗體濃度增加為一般免疫組織染色的三倍，室溫下以 80rpm 搖晃 30 至 60 分鐘，接著以冰涼的 1X PBS 清洗三次，每次 5 分鐘，再以冰涼的 4% 多聚甲醛(Paraformaldehyde) 室溫下固定 20 分鐘，接著以冰涼的 1X PBST 清洗三次，每次 10 分鐘，室溫下在 1X PBST 中進行二級抗體染色 1 小時，再以 1X PBST 清洗三

次，每次 10 分鐘，並去除口器及多餘組織，僅留下眼碟，利用 DABCO 溶液(0.22M N-propyl gallate, 90% glycerol in 1X PBS)封片。

(十六)掃描式電子顯微鏡

(1)樣品製備

將果蠅收集於玻璃瓶中，按順序依照不同濃度的酒精及丙酮，慢慢將果蠅樣品置換到 100%的丙酮中。其步驟如下：加入 50%酒精，室溫下搖晃 10 分鐘，接著去除 50%酒精，加入 70%酒精，室溫下搖晃 10 分鐘，注意置換的過程中可藉由保留少量溶液，避免樣品直接接觸空氣，接著若要保存樣品，可再置換一次 70%酒精，室溫下搖晃 10 分鐘，便可存放於 4°C 數月。之後依序加入 80%酒精、90%酒精、兩次 100%酒精、100%酒精和 100%丙酮 1:1 混和、100%酒精和 100%丙酮 1:2 混和，每種溶液都於室溫下搖晃 10 分鐘再行置換，最後置換到 100%丙酮，室溫下搖晃 15 分鐘，再置換一次 100%丙酮，室溫下搖晃 15 分鐘，緊接著進入臨界點乾燥的步驟。

(2)臨界點乾燥

清潔臨界點乾燥機(Critical Point Dryer)的樣品室(chamber)，放入刻度棒(O-ring)，重新關好樣品室。打開臨界點乾燥機電源，設定溫度為 0°C，待機器達到指定溫度，打開二氧化碳鋼瓶，並緩緩打開進氣

閥(Inlet)，注入液態二氧化碳，使液面升至刻度棒位置 5，關上進氣閥停留 5 分鐘，再打開排氣閥(Exhaust)，將樣品室內的二氧化碳全部排出，再關緊排氣閥，完成暖機的動作。將浸泡於 100%丙酮中的果蠅樣品倒入放有標籤的樣品籃中，迅速將樣品籃放入臨界點乾燥機的樣品室，關緊樣品室，緩緩打開進氣閥，注入液態二氧化碳，使液面蓋過樣品籃，約刻度棒位置 6，關上進氣閥停留 10 分鐘，再打開排氣閥，使液面稍微低於樣品籃，關上排氣閥，以上步驟重複三次。接著緩緩打開排氣閥，注入二氧化碳至液面到刻度棒位置 7，關閉二氧化碳鋼瓶，調整溫度至 20°C，待達到指定溫度後靜置 15 分鐘，再調整溫度至 37°C，待達到指定溫度靜置 10 分鐘。接著以流量計洩氣閥(Leak)以 2 l/min 的流量排放二氧化碳，至壓力降為 0，調整溫度至 25°C，待達到指定溫度，即可取出果蠅樣品進行金離子鍍膜。

(3) 金離子鍍膜

取出 SEM 樣品載台，利用專用雙面膠將果蠅樣品固定於載台上，並在載台邊緣編上編號。逆時針旋轉 Leak valve 以破除 chamber 真空狀態，打開玻璃罩蓋子，放入樣品載台，小心蓋上玻璃罩蓋子，接合處都應均勻塗有真空密合專用油，開啟金離子鍍膜機，再打開幫浦，壓下 LPG vale 旋轉 90 度使與抽氣管平行，等待約 10 分鐘，開始檢測真空度，將 Selector 轉至 coat 的位置，再將 H.V control 轉至 5，按下

Flash 鈕，檢視 Ion current 是否在 5mA 以下，再將 H.V control 轉至 8，
按下 Flash 鈕，檢視 Ion current 是否在 8mA 以下，若達到標準，即可
開始進行金離子鍍膜。將 H.V control 轉至 8，將 timer 轉至 1 分 30 秒，
此時 Ion current 應在 7mA 左右，若指針未在 7mA 的位置，可調整 H.V
control 控制 Ion current，此時 chamber 內可見穩定的藍紫色光，直到
時間結束後靜置 2 分鐘，再重複一次 1 分 30 秒，即完成金離子鍍膜。
旋轉 LPG vale 使與抽氣管垂直，關閉幫浦，再關金離子鍍膜機，逆時
針旋轉 Leak valve，破除 chamber 真空狀態，打開玻璃罩蓋子，取出
樣品載台，重新蓋回玻璃罩蓋子，檢視真空度，若以達真空度，即可
關機。果蠅樣品應保存於乾燥箱。

(4)掃描式電子顯微鏡觀察

果蠅樣品以 SEM(Scanning Electron Microscopy, Hitachi S2300)觀察，
並以影像擷取系統 (Digital Image Acquisition, GW Electronic,
Norcross,GA)拍攝樣品影像。

實驗結果

果蠅的 Jak/STAT 訊息傳遞鏈在上游有三個配體：Upd、Upd2、Upd3，以及兩個受體：Dome、Domelike，在下游僅只有一個 Jak 和一個 STAT，是一個很簡單的訊息傳遞鏈，但它卻能調控多種不同的發育過程及生理反應，我們實驗室對於像這樣簡單的訊息傳遞鏈是如何調控果蠅的發育感到興趣。

在先前的研究中已證實 Dome 以及 Domelike 能夠形成同雙體及異雙體(Brown et al., 2003; Kallio et al., 2010; Makki et al., 2010)，並且唯有形成雙體的受體，才能接收 Upd-likes 的訊息，進而向下繼續傳遞訊號(Brown et al., 2003)。另一方面，我們也觀察到 Upd-like 蛋白在果蠅的各個發育階段中，都有表現區域很鄰近或重疊的現象。因此我們推測，也許三個 Upd-like 蛋白彼此之間可能會形成同雙體及異雙體，並藉由和 Dome 或 Domelike 受體不同的結合，可能造成上游訊息的多樣性，再藉由受體細胞質區域的不同，將訊息傳給除了主要的 Jak 和 STAT 之外，可能還傳給其它的訊息。這些訊息可能和 Jak/STAT 交互作用，進而調控多種不同的功能(附圖三)。

在我的實驗中，我在果蠅的 S2 細胞株中表達不同組合的 Upd-like 蛋白，並利用免疫共沉澱法(Co-immunoprecipitation)，觀察這三個 Upd-like 蛋白是否會形成同雙體及異雙體。此外，我也會利用果蠅幼

蟲的眼碟，觀察此三個 Upd-like 蛋白在活體內的分布位置，以及對 Jak/STAT 訊息傳遞鏈活性和成蟲複眼表型的影響。同時我也觀察，同時表達 Upd-like 蛋白和 Dome 或 Domelike 受體的不同組合對果蠅複眼發育所產生的影響。

Upd 和 Upd3 為氨基連接的醣化蛋白(N-linked glycoprotein)

在進行免疫共沉澱法之前，首先觀察三個 Upd-like 蛋白的蛋白質結構，它們都有 N 端訊息序列(Signal sequence)，以及預測有許多氨基連接的醣化點(Harrison et al., 1998)，因此可以推測三個 Upd-like 蛋白為分泌性的蛋白，並且可能具有氨基連接的醣化作用(N-linked glycosylation)。先前的研究在哺乳動物 293T 細胞中表達 Upd，發現 Upd 蛋白在西方點墨法的結果中，呈現有許多不同分子量的現象(Harrison et al., 1998)，而當以 Tunicamycin 處理細胞，阻斷氨基連接的醣化作用後，可以發現 Upd 蛋白在西方點墨法的結果上，只留下原先預測的正確分子量大小(Harrison et al., 1998)。推測 Upd 蛋白在西方點墨法的結果中，呈現許多不同分子量的現象，是由於不同程度的醣化修飾所造成的結果，所以當加入 Tunicamycin 阻斷 Upd 上氨基連接的醣化後，西方點墨法的結果上就看到 Upd 多種不同分子量的訊號消失。此實驗應證 Upd 為氨基連接的醣化蛋白(Harrison et al.,

1998)。

我的實驗中以果蠅的 S2 細胞表達 Upd、Upd2 以及 Upd3，並在西方點墨法的觀察上發現，都呈現多種不同的分子量(圖一)，因此我也利用 Tunicamycin 處理，觀察在 S2 細胞中 Upd、Upd2 和 Upd3 是否為氨基連接的醣化蛋白。我以 Gal4-UAS 系統在果蠅的 S2 細胞株中大量表達 Upd-like 蛋白，利用共同轉染 *Actin-Gal4(Act-Gal4)* 及 *UAS-upd-likes*，*Actin-Gal4* 為 Actin 的啟動子(promoter)調控 Gal4 的表達，進而調控 *UAS-upd-likes* 表達於所有細胞。

利用共同轉染 *Act-Gal4* 和帶有 Human influenza hemagglutinin(HA) 標籤的 Upd 蛋白(*UAS-upd-HA*, from Lin, S.H., 2010)，以 Gal4-UAS 系統大量表達 *UAS-upd-HA(Act-Gal4>UAS-upd-HA* 以下簡稱 *Act>upd-HA*)，在西方點墨法的觀察中發現 Upd-HA 分布在分子量 50~60kDa 之間，且高於原先預測 Upd-HA 的分子量(~45kDa)(圖一，A)。若分別以 3.3 μ g/ml 和 5 μ g/ml 的 Tunicamycin 處理轉染 Upd-HA 的 S2 細胞株後，發現 Upd-HA 降至 43~50kDa 的位置(圖一，A)，接近原先預測的分子量，推測是 Upd-HA 沒有氨基連接醣化作用的形式，所以在 S2 細胞株中也觀察到 Upd 蛋白有氨基連接的醣化修飾。

我接著繼續觀察 Upd2 和 Upd3 是否也為氨基連接的醣化蛋白(圖一，B、C)，我在 S2 細胞中表達帶有 Green fluorescent protein(GFP)標

籤的 Upd2 蛋白(*Act-Gal4>UAS-upd2-GFP*)，結果發現 Upd2-GFP 分布在分子量 85~95kDa 之間(圖一，B)，若分別處理 3.3 μ g/ml 和 5 μ g/ml 的 Tunicamycin 後，發現 Upd2-GFP 蛋白分子量不受影響(圖一，B)，推測 Upd2 蛋白不具氨基連接的醣化修飾作用。我同樣利用 S2 細胞表達 Upd3 蛋白(*Act-Gal4>UAS-upd3*)，並利用我們實驗室製備的 Upd3 抗體偵測，結果發現 Upd3 在約 36~55kDa 之間偵測到不同分子量大小的蛋白(圖一，C)，而當我分別處理 3.3 μ g/ml 和 5 μ g/ml 的 Tunicamycin 後，發現 Upd3 只留下原先預測的正確分子量 36kDa(圖一，C)，在 S2 細胞株中也觀察到 Upd3 蛋白有氨基連接的醣化修飾。因此從我的結果發現 Upd3 和 Upd 皆為氨基連接的醣化蛋白。

Upd-like 蛋白在 S2 細胞中可形成同雙體及異雙體

為了觀察 Upd-like 蛋白是否會形成同雙體及異雙體，我共同轉染不同組合的 Upd-like 蛋白至 S2 細胞，並利用免疫共沉澱法來證明 Upd-like 蛋白彼此之間是否有交互作用。實驗室先前已將帶有不同標籤蛋白(tag)的 *upd-like* 接進具有 UAS 序列的載體中：*UAS-upd-GFP*、*UAS-upd2-GFP* (Tsai and Sun, 2004)、*UAS-upd-HA*(Su-Wen Cheng)、*UAS-upd2-flag*、*UAS-GFP-upd3* 以及 *UAS-upd3*(Yu-Ting Chiu)(圖二)，我利用標籤蛋白的抗體以及我們實驗室製備的 Upd3 抗體，進行西方點

墨法和免疫沉澱法。

我共同轉染 *Act-Gal4* 及不同組合的 *UAS-upd-like* 至 S2 細胞，利用 Gal4-UAS 系統在 S2 細胞株中大量表現這些 Upd-like 蛋白，並利用 Upd-like 蛋白上的標籤蛋白抗體來進行免疫沉澱法分析。

首先我表達 Upd-like 蛋白研究它們是否會形成同雙體，當利用 S2 細胞大量表達 Upd-GFP 和 Upd-HA(*Act-Gal4*>*UAS-upd-GFP*, *UAS-upd-HA*) 的組合(圖三，A)、Upd2-GFP 和 Upd2-flag(*Act-Gal4*>*UAS-upd2-GFP*, *UAS-upd2-flag*) (圖三，B)以及 GFP-Upd3 和 Upd3(*Act-Gal4*>*UAS-GFP-upd3*, *UAS-upd3*) (圖三，C)的組合，萃取細胞蛋白後，利用 Upd-like 蛋白上所帶有的標籤蛋白(tag)的抗體進行西方點墨法分析，和未轉染的 S2 細胞蛋白萃取物比較，確認三個組合的 Upd-like 蛋白都有表達(圖三，A、B、C lane1、2)。接著利用 GFP 的抗體分別進行免疫沉澱法，再利用 Upd-like 蛋白上所帶的標籤蛋白的抗體做西方點墨法，分析免疫沉澱的產物，結果發現在 *Act-Gal4*>*UAS-upd-GFP*, *UAS-upd-HA* 的組合中，以 GFP 和 HA 的抗體做西方點墨法，分析免疫沉澱的產物，Upd-GFP 會被免疫沉澱(圖三，A，上圖 lane3)，並且在 50kDa~60kDa 的範圍中，多種不同分子量的 Upd-HA 也被共同免疫沉澱下來(圖三，A，下圖 lane3)。 *Act-Gal4*>*UAS-upd2-GFP*, *UAS-upd2-flag* 的組合中，以 GFP 和 flag 的抗體做西方點墨法，分析免疫沉澱的結果，Upd2-GFP

和 Upd2-flag 也都被共同免疫沉澱下來(圖三, B lane3)。在 *Act-Gal4>UAS-GFP-upd3, UAS-upd3* 的組合中, 以 GFP 和 Upd3 的抗體做西方點墨法分析, 發現 GFP-Upd3 和 Upd3 都被共同免疫沉澱(圖三, C lane3)。另一方面, 在 *Act-Gal4>UAS-upd-GFP, UAS-upd-HA* 和 *Act-Gal4>UAS-upd2-GFP, UAS-upd2-flag* 的組合中, 我也分別利用 HA 和 flag 的抗體進行免疫共沉澱法, 再利用它們帶有標籤蛋白的抗體, 進行西方點墨法, 分析免疫沉澱產物, 反覆驗證看到 Upd-GFP 和 Upd-HA 會被共同免疫沉澱(圖三, A'), Upd2-GFP 和 Upd2-flag 也看到相同結果(圖三, B')。我的實驗證實三種 Upd-like 蛋白在 S2 細胞中能夠形成同雙體。

我也表達不同組合的 Upd-like 蛋白, 研究它們是否會形成異雙體。利用 S2 細胞大量表達 Upd2-GFP 和 Upd-HA(*Act-Gal4>UAS-upd2-GFP; UAS-upd-HA*) (圖四, A lane2), 利用 HA 的抗體進行免疫沉澱法, 以 GFP 和 HA 的抗體進行西方點墨法分析, 顯示 Upd2-GFP 和 Upd-HA 會被共同免疫沉澱下來(圖四, A lane3)。我也利用 S2 細胞大量表達 Upd2-GFP 和 Upd3(*Act-Gal4>UAS-upd2-GFP, UAS-upd3*)的組合(圖四, B)、Upd-GFP 和 Upd3(*Act-Gal4>UAS-upd-GFP, UAS-upd3*) (圖四, C)以及 GFP-Upd3 和 Upd-HA(*Act-Gal4>UAS-GFP-upd3, UAS-upd-HA*)的組合(圖四, C'), 收下細胞蛋白後, 以 GFP 的抗體進行免疫共沉澱法, 再利

用 Upd-likes 上帶有的標籤蛋白抗體做西方點墨法偵測，發現三種組合的 Upd-likes 都會被共同免疫沉澱(圖四，B、C、C' lane3)。我的結果顯示 Upd-like 蛋白在 S2 細胞中也能彼此形成異雙體。

為了確認 GFP 抗體不會直接辨認 Upd-HA、Upd2-flag 及 Upd3，造成在免疫共沉澱法的結果中誤判，我在 S2 細胞中分別單獨表達 Upd-HA(*Act-Gal4>UAS-upd-HA*)(圖五，A)、Upd2-flag(*Act-Gal4>UAS-upd2-flag*)(圖五，B)及 Upd3(*Act-Gal4>UAS-upd3*)(圖五，C)，收下細胞蛋白萃取物後，利用 GFP 的抗體做免疫沉澱法，再以 Upd-likes 上標籤蛋白的抗體進行西方點墨法，證實 Upd-HA、Upd2-flag 及 Upd3 都不會與 GFP 抗體非專一的結合，而被免疫沉澱下來(圖五，A、B、C lane3)。

Upd-like 蛋白在果蠅眼碟組織內的分布

在 S2 細胞株中的研究發現，Upd-like 蛋白皆為分泌性的蛋白質，Upd 和 Upd3 分泌後會結合於細胞外基質(Harrison et al., 1998; Hombria et al., 2005; Wright et al., 2011)。在活體細胞中 Upd-like 蛋白分泌的方向，以及擴散至組織中的分布，皆可能對 Jak/STAT 訊息傳遞鏈產生不同的影響。為了觀察 Upd-like 蛋白在活體內的分布情形，我在果蠅幼蟲時期的眼碟中，表現這些 Upd-like 蛋白，並利用細胞外免疫組織染色法，觀察 Upd-like 蛋白在組織中的分布情形是否類似。若

Upd-like 蛋白在組織中有不同的分布情形時，我將它們同時表達於組織中，觀察它們是否會有交互作用影響彼此的分布。我利用專一表達於果蠅眼碟分化中細胞的 Gal4 果蠅株：*GMR-Gal4*(附圖二)，來表達帶有 GFP 標籤蛋白的 *UAS-upd-likes*，由於 GFP 於細胞外的綠色螢光訊號不明顯，因此我以 GFP 的抗體做細胞外免疫組織染色，觀察分泌至細胞外的 Upd-like 蛋白。在我的結果中(圖六)，綠色訊號為 Upd-like-GFP 綠色螢光蛋白本身螢光訊號，紅色的訊號代表 Upd-like 蛋白分泌至細胞外後被偵測到的訊號。當利用 *GMR-Gal4* 表達 *UAS-upd-GFP* (*GMR>upd-GFP*)，Upd-GFP 綠色螢光訊號表達在果蠅眼碟分化中細胞的區域(圖六，B、B'')，而藉由 GFP 抗體進行細胞外免疫染色，可偵測到 Upd-GFP 在細胞外的訊號(圖六，B~B'''紅色)，由正在分化細胞的區域，擴散越過型態發生溝(Morphogenic furrow, MF)，散布在未分化細胞的區域(圖六，B、B'、B'')。利用顯微鏡 40 倍物鏡觀察，可見 Upd 在分化中細胞外被偵測到點狀的訊號，且點狀訊號相連成格子狀的圖樣(圖六，B''')。利用 *GMR-Gal4* 表達 *UAS-upd2-GFP*(*GMR>upd2-GFP*)，可見綠色螢光蛋白的訊號表達在果蠅眼碟分化中細胞的區域(圖六，C、C'')，然而利用 GFP 抗體做細胞外免疫染色的結果，沒有偵測到 Upd2-GFP 在細胞外的訊號(圖六，C~C''')。利用 *GMR-Gal4* 表達 *UAS-GFP-Upd3*(*GMR>GFP-upd3*)，綠色螢光蛋白表達在果蠅眼碟分化中

細胞的區域(圖六，D、D'')，藉由 GFP 的抗體做細胞外免疫染色，可偵測到 Upd3 在細胞外的訊號(圖六，D~D'''紅色)。如同 Upd 由正在分化細胞的區域擴散至未分化細胞的區域(圖六，D、D'、D'')。同樣利用顯微鏡 40 倍物鏡觀察，Upd3 在分化中細胞外被偵測到點狀的訊號相連成格子狀的圖樣(圖六，D''')。

在我的結果中發現 Upd 和 Upd3 在眼碟分化中細胞表達後，擴散到組織中的分布情形類似，而與 Upd2 的分布情形不同(圖六，B、C、D)。先前在 S2 細胞的研究中發現 Upd 和 Upd3 在分泌至細胞外後，會結合於細胞外基質(Harrison et al., 1998; Hombria et al., 2005; Wright et al., 2011)，而 Upd2 則直接擴散在培養基中(Hombria et al., 2005)，推測這個特性是造成 Upd2 在組織中的分布不同於 Upd 和 Upd3 的原因。

為了探討 Upd-likes 共同表達於果蠅眼碟時，是否會有交互作用影響在組織中的分布。我利用 *GMR-Gal4* 同時表達 *UAS-upd2-GFP* 和 *UAS-upd(GMR>upd;upd2-GFP)* (圖六，E~E')，Upd2-GFP 綠色螢光的訊號表達在果蠅眼碟分化中細胞的區域(圖六，E)，然而利用 GFP 抗體做細胞外免疫染色的結果，沒有偵測到 Upd2-GFP 在細胞外的訊號(圖六，E')。另一方面，利用 *GMR-Gal4* 同時表達 *UAS-upd2-GFP* 和 *UAS-upd3(GMR>upd3;upd2-GFP)* (圖六，F~F')，Upd2-GFP 綠色螢光訊號表達在

果蠅眼碟分化中細胞的區域(圖六，F)，以 GFP 抗體進行細胞外免疫染色也沒有偵測到 Upd2-GFP 在細胞外的訊號(圖六，F')。在我的實驗中，Upd2-GFP 分別與 Upd 或 Upd3 同時表達，仍然無法以 GFP 抗體的細胞外免疫染色，偵測到細胞外 Upd2-GFP 的訊號。

Upd-likes 表達於眼碟分化中區域對 Jak/STAT 訊息傳遞鏈活性的影響

在果蠅幼蟲時期眼碟的發育中，內生性的 Upd 在三齡幼蟲早期時，表達於眼碟後緣的中點(附圖二)(Tsai and Sun, 2004)，而 Jak/STAT 訊息傳遞鏈主要是作用於未分化細胞(附圖二)(Tsai and Sun, 2004)，Upd 會以分泌擴散的方式，到眼碟未分化細胞的區域，使未分化細胞產生 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的活性，促使未分化細胞進行細胞增生(附圖二)(Tsai and Sun, 2004)。在細胞外免疫染色的結果中，觀察到表達 Upd-GFP 和 GFP-Upd3 於眼碟分化中細胞區域時(*GMR>upd-GFP* 及 *GMR>GFP-upd3*)，會分泌擴散至未分化細胞的區域(圖六，B~B'''、D~D''')，接著我將進一步觀察它們對 Jak/STAT 訊息傳遞鏈活性的影響。

為了觀察 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的活性，我使用 Jak/STAT 訊息傳遞鏈活性的報告者：10XSTAT92E-GFP-NLS(附圖一，B)(from Lin, S.H., 2010)，它是在十個 STAT92E 的結合位後面接上熱休克蛋白的啟動子

(promoter)及綠色螢光蛋白報告基因，若有活化的 STAT92E 結合時，會誘導綠色螢光蛋白的表現，且綠色螢光蛋白之後接有細胞核訊息序列(nuclear localization sequence, NLS)，會使綠色螢光蛋白進入細胞核中，以增加綠色螢光的解析度 (Lin, S.H., 2010)。利用 10XSTAT92E-GFP-NLS 可以觀察到組織中有 Jak/STAT 訊息傳遞鏈被活化的細胞。我將 Upd-like 蛋白單獨表達或表達不同組合的 Upd-likes，利用 10XSTAT92E-GFP-NLS 觀察，它們對於 Jak/STAT 訊息傳遞鏈活性的影響是否會有不同。

在野生型果蠅中，以 10XSTAT92E-GFP-NLS 的綠色螢光標示 Jak/STAT 訊息傳遞鏈活性，在三齡幼蟲晚期的眼碟中 Jak/STAT 訊息傳遞鏈活性分布於眼碟後段約三分之一的區域(圖七，A、A')。當利用 *GMR-Gal4* 表達 *UAS-upd(GMR>upd)*於眼碟分化中細胞的區域(圖七，B、B')，以紅色訊號標示分化中的視神經細胞，可觀察到在未分化細胞的區域中 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的活性會明顯上升(圖七，B、B')。對應細胞外免疫染色的結果，在眼碟分化中細胞區域表達 Upd 蛋白，會分泌擴散至未分化細胞區域(圖六，B~B''')，並使 Jak/STAT 訊息傳遞鏈活性上升(圖七，B、B')，因此 Upd 對 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的活性具有長距離的影響力。當利用 *GMR-Gal4* 表達 *UAS-upd2(GMR>upd2)*於眼碟分化中細胞的區域時，Jak/STAT 訊息傳遞鏈活化的範圍類似野生型果蠅

(圖七, C、C')。當利用 *GMR-Gal4* 表達 *UAS-upd3(GMR>upd3)* 於眼碟分化中細胞的區域時, 在未分化細胞區域的 Jak/STAT 訊息傳遞鏈會被活化(圖七, D、D')。Upd3 同樣在眼碟分化中細胞區域表達時, 會分泌擴散至未分化細胞區域(圖六, D~D'''), 並且也能使 Jak/STAT 訊息傳遞鏈活性上升(圖七, D、D')。在此證實表達 Upd3 和 Upd 在果蠅眼碟中皆對 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的活性具有長距離的影響力。

進一步觀察表達不同組合 Upd-like 的蛋白時, 對 Jak/STAT 訊息傳遞鏈活性的影響。當利用 *GMR-Gal4* 共同表達 *UAS-upd* 和 *UAS-upd2 (GMR>upd;upd2)* 於眼碟分化中細胞的區域時, 未分化細胞的區域有 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的活性上升(圖七, E、E')。在 *UAS-upd* 和 *UAS-upd3* 的組合(*GMR>upd;upd3*) (圖七, F、F'), 以及 *UAS-upd2* 和 *UAS-upd3* 的組合(*GMR>upd2;upd3*) (圖七, G、G'), 都同樣能長距離的活化 Jak/STAT 訊息傳遞鏈, 彼此之間沒有觀察到明顯差異。

Upd-likes 表達於眼碟未分化區域對 Jak/STAT 訊息傳遞鏈活性的影響

由於果蠅眼碟中, 內生性的 Jak/STAT 訊息傳遞鏈主要是作用於未分化細胞的區域, 因此我利用專一表達於眼碟未分化細胞的 Gal4 果蠅株: *ey-Gal4*, 表達 *UAS-upd-like* 以及不同組合的 *UAS-upd-likes*, 並利用 10XSTAT92E-GFP-NLS 作為 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的報告者, 研究它

們是否對 Jak/STAT 訊息傳遞鏈活性有不同影響。

野生型果蠅的 Jak/STAT 訊息傳遞鏈活性，在三齡幼蟲晚期的眼碟中，是分布於眼碟後段約三分之一的區域(圖八，A、A')。當利用 *ey-Gal4* 表達 *UAS-upd(ey>upd)* 於未分化細胞區域，結果使果蠅眼碟有明顯變大的情形，大部分眼碟都嚴重摺疊扭曲，且常伴隨觸角碟成倍的現象(圖八，B、B'，黃色箭號)，而 Upd 活化 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的活性，主要在眼碟背側及腹側邊緣被活化(圖八，B'，白色箭號)，其中背側邊緣的活性特別強。然而眼碟上未分化細胞區域的中央並沒有 Jak/STAT 訊息傳遞鏈活化的訊號(圖八，B)，但在眼碟細胞基底(basal)的區域，靠近神經軸突的地方，有一團細胞的 Jak/STAT 訊息傳遞鏈被活化(圖八，B'，白色箭頭)。由於這群細胞在光學顯微鏡下觀察，細胞呈現很多小囊泡構造，類似正在進行細胞凋亡，被周圍正常細胞往基底層(basal)清出，因此我利用活化態 Caspase3 的抗體進行染色，發現這群細胞在進行細胞凋亡(圖八，H，白色箭頭)。當利用 *ey-Gal4* 表達 *UAS-upd2(ey>upd2)* 於未分化細胞的區域時，觀察發現眼碟大小和型態，以及 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的活性類似於野生型(圖八，C、C')。當利用 *ey-Gal4* 表達 *UAS-upd3(ey>upd3)* 在未分化細胞區域(圖八，D、D')，在眼碟背側及腹側的邊緣上活化 Jak/STAT 訊息傳遞鏈，其中背側邊緣的活性較強(圖八，D'，白色箭號)。另外在眼碟中央基底層(basal)，

靠近神經軸突的區域，同樣有一團細胞的 Jak/STAT 訊息傳遞鏈被活化，以活化態 Caspase3 的抗體進行染色，發現這群細胞在進行細胞凋亡(圖八，I，白色箭頭)，現象類似於 *ey>upd*(圖八，B'、H)。

進一步觀察表達不同組合的 Upd-like 蛋白時，對 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的活性的影響。利用 *ey-Gal4* 表達 *UAS-upd* 和 *UAS-upd2*(*ey>upd; upd2*)的組合(圖八，E、E')、*UAS-upd* 和 *UAS-upd3* 的組合(*ey>upd; upd3*) (圖八，F、F')，以及 *UAS-upd2* 和 *UAS-upd3*(*ey>upd2; upd3*)的組合(圖八，G、G')時，皆造成果蠅眼碟變大，並且嚴重摺疊扭曲，Jak/STAT 訊息傳遞鏈活性主要都在眼碟邊緣的區域被活化。其中表達 *UAS-upd* 和 *UAS-upd3* 的組合(*ey>upd; upd3*)，對眼睛發育的影響最為顯著(圖八，F、F')，變大的眼碟已無法全部放進 20 倍物鏡的視野下，視神經細胞的區域摺疊扭曲，伴隨觸角碟成倍，以及觸角碟位置不正確的現象(圖八，F'，白色箭號)。

Upd-likes 表達於眼碟未分化區域對成蟲複眼表型的影響

在三齡幼蟲晚期，眼碟後緣生成型態發生溝(Morphogenic furrow, MF)，從眼碟後緣向前方移動，此時型態發生溝所經過的細胞將有機會被選為視神經細胞，開始分化最後形成果蠅成蟲的複眼(附圖二)(Ready et al., 1976)，一般野生型果蠅的複眼約有 750~800 顆的小

眼(圖十, A)。Jak/STAT 訊息傳遞鏈作用於果蠅幼蟲時期的眼碟, 促使眼碟中未分化細胞進行細胞增生, 若眼碟發育早期 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的活性越高, 就會促使細胞增生越多, 到了三齡幼蟲晚期就會有越多細胞被選為視神經細胞, 最後造成果蠅複眼變大(Tsai and Sun, 2004)。因此我接著觀察果蠅 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的配體: Upd-likes, 單獨以及做不同組合的表達時, 對果蠅成蟲複眼表型的影響。

若以 *ey-Gal4* 表達 *UAS-upd(ey>upd)* 於眼碟未分化區域, 會導致果蠅成蟲複眼變大, 其小眼數增加為約 900~1000 顆(圖九, A)。而以 *ey-Gal4* 表達 *UAS-upd2(ey>upd2)* 的果蠅成蟲, 其複眼大小類似於野生型果蠅, 小眼數目約 750 顆(圖九, B)。當利用 *ey-Gal4* 表達 *UAS-upd3*, 小眼數目增加到約 1000 顆(圖九, C), 結果類似於 Upd 造成果蠅成蟲複眼變大。

進一步觀察表達不同組合的 Upd-like 蛋白, 是否會對果蠅成蟲複眼表型造成不同影響, 利用 *ey-Gal4* 同時表達 *UAS-upd* 和 *UAS-upd2(ey>upd; upd2)* 的組合, 或 *UAS-upd2* 和 *UAS-upd3(ey>upd2; upd3)* 的組合, 都會促使果蠅成蟲複眼變大, 小眼數目增加的表型(圖九, D、F)。然而當利用 *ey-Gal4* 表達 *UAS-upd* 和 *UAS-upd3(ey>upd; upd3)* 的組合時, 會造成果蠅成蟲複眼向外凸出, 但小眼數目並未增加, 頭部產生嚴重缺陷的表型(圖九, E)。同時表達 Upd 和 Upd3 所造成的成蟲表型, 不

同於其他 Upd-like 蛋白的組合，也是單獨表達 Upd 或 Upd3 未出現的表型，此表型也不是表達兩倍劑量的 Upd-like 蛋白就會產生的(圖九，G、H、I)。由這些觀察結果推論 Upd 和 Upd3 之間的交互作用對於果蠅成蟲頭部的發育，不同於其它 Upd-like 蛋白組合的影響。

表達 Upd-likes 配上 Dome 或 Domelike 受體對 Jak/STAT 訊息鏈的影響

在我的假說之中，若不同的 Upd-like 蛋白結合到不同的 Dome 或 Domelike 受體時，可能由於親和力和受體細胞質區域結構的不同，因而對下游訊息產生不同的影響。所以我觀察在果蠅眼碟未分化細胞的區域，表達不同 Upd-like 蛋白與 Dome 或 Domelike 受體的組合，對 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的活性是否產生不同的影響。我利用 *ey-Gal4* 表達不同的 *UAS-upd-like* 與 *UAS-dome* 或 *UAS-domelike* 受體的組合，藉由 Jak/STAT 訊息傳遞鏈活性的報告者 10XSTAT92E-GFP-NLS，觀察在果蠅眼碟未分化細胞的區域表達 Upd-like 蛋白與 Dome 或 Domelike 受體不同的組合，對 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的活性產生的影響。

當利用 *ey-Gal4* 單獨表達 *UAS-dome(ey>dome)* 或 *UAS-domelike(DL)* (*ey>DL*) 時，利用 10XSTAT92E-GFP-NLS 可觀察 Jak/STAT 訊息鏈的活性，發現內生性在眼碟後端三分之一區域的活性(圖八，A)，會被 *ey>dome* 和 *ey>DL* 抑制的情形(圖十，A、B)。當 Upd 和 Dome 受體同時表達

(*ey>upd;dome*)，Jak/STAT 訊息傳遞鏈在未分化區域會被活化(圖十，C、C')，而當 Upd 和 Domelike 受體同時表達(*ey>upd;DL*)，Jak/STAT 訊息傳遞鏈在未分化區域也能被活化，而且在眼碟背側的區域，有一群向外突出的細胞，且有 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的活化(圖十，D、D'，白色箭號)。我的觀察發現在果蠅眼碟中表達 Upd 配上 Dome 或 Domelike 受體會有不同的交互作用，對 Jak/STAT 訊息傳遞鏈造成不同的影響，導致果蠅幼蟲眼碟形態上的差異。而當 Upd2 和 Dome(*ey>upd2;dome*) 或 Domelike(*ey>upd2;DL*)同時表達，都類似受體單獨表達，眼碟後端內生性的 Jak/STAT 訊息傳遞鏈活性被抑制(圖十，E、E'、F、F')。

表達 Upd-likes 和 Dome 或 Domelike 受體對果蠅成蟲複眼表型的影響

為了觀察同時表達 Upd-like 蛋白和 Dome 或 Domelike(DL)受體對果蠅成蟲複眼表型的影響，我利用 *ey-Gal4* 表達 *UAS-upd-likes* 分別配上 *UAS-dome* 或 *UAS-domelike* 受體，並觀察它們成蟲複眼的表型。

當單獨表達 Dome(*ey>dome*)或 Domelike(DL)(*ey>DL*)在果蠅未分化細胞的區域時，會造成果蠅成蟲複眼變小的表型(圖十一，E，圖十二，A)。將 Upd-like 蛋白與 Dome 受體分別組合一起表達於眼碟未分化區域時，發現 Upd 與 Dome 受體同時表達(*ey>upd;dome*)，結果類似 *ey>upd* 造成複眼變大的表型(圖十一，F)，兩者的小眼數在統計上無

顯著差異(圖十一, I)。然而當 Upd2 和 Upd3 分別與 Dome 受體同時表達後($ey>upd2;dome$, $ey>upd3;dome$), 複眼呈現變小的表型(圖十一, G、H), 其中 Upd3 和 Dome 同時表達($ey>upd3;dome$)與 Upd3 單獨表達($ey>upd3$)比較, 在統計上差異最為顯著(圖十一, I), 推測 Upd3 對於 Dome 受體的劑量相當敏感。

當表達 Upd-like 蛋白配上 Domelike 的組合, 結果發現 Upd 與 Domelike 同時表達於眼碟未分化區域($ey>upd;DL$), 造成果蠅成蟲複眼向頭頂延伸的表型(圖十二, B, 白色箭號)。而 Upd2 與 Domelike 同時表達($ey>upd2;DL$), 造成果蠅成蟲複眼變小(圖十二, C), 類似於單獨表達 Domelike($ey>DL$)的表型(圖十二, A、C)。然而 Upd3 與 Domelike 同時表達($ey>upd3;DL$)產生三種不同的表型, 第一種是複眼變小, 在頭頂生成額外的複眼(圖十二, D, 白色箭號, 出現機率 32.5%), 第二種是複眼大小接近於野生型的果蠅(圖十二, E, 出現機率 46.25%), 第三種是複眼變大接近於 Upd3 單獨表達的表型(圖十二, F, 出現機率 21.25%), 在此我發現當不同的 Upd-like 蛋白與 Dome 或 Domelike 受體組合時, 在果蠅複眼發育過程中會造成不同的影響。

討論

果蠅 Jak/STAT 訊息傳遞鏈中三種 Upd-like 蛋白特性的比較

根據我的實驗結果觀察，Upd-like 蛋白依照蛋白質的醣化修飾，以及在組織中的分布情形，和對 Jak/STAT 訊息傳遞鏈活性的影響，可以將 Upd-like 蛋白分為兩類，其中 Upd 和 Upd3 的特性較為接近，而 Upd2 則屬於另一類。在我的結果中發現 Upd 和 Upd3 皆為氨基連接的醣化蛋白(N-link glycoprotein)(圖一，A、C)，當我將 Upd 或 Upd3 表達於果蠅眼碟時，都可利用細胞外免疫染色法，偵測到它們分泌到細胞外，在組織中呈現點狀，且能長距離分布的狀況(圖六，B、D)，並且都能遠距離的活化 Jak/STAT 訊息傳遞鏈(圖七，B、D)，而且造成果蠅成蟲複眼變大的表型(圖九，A、C)。在進一步觀察後發現 Upd 和 Upd3 仍有不同的特性，當我以 Tunicamycin 處理，阻斷 S2 細胞的氨基連接醣化作用後，西方點墨法的結果中，Upd-HA 分子量雖然降到靠近原本預測的分子量大小，但仍存在多種不同的分子量(圖一，A lane 3、4)，而 Upd3 在 Tunicamycin 處理後僅留下原先預測的 Upd3 分子量大小(圖一，C lane 3、4)。以我的實驗結果推測在 S2 細胞中，Upd 除了氨基連接的醣化修飾外，可能還具有其它蛋白修飾作用，而 Upd3 則是主要為氨基連接的醣化修飾。另一方面，在觀察果蠅成蟲複眼表型時發現，當我同時表達 Upd3 配上 Dome 時，和單獨表達 Upd3

比較，果蠅成蟲的複眼大小很顯著的變小，顯示 Upd3 對於 Dome 受體的劑量可能較敏感，而 Upd 則沒有這種現象(圖十一，I)。

Upd2 的特性與 Upd、Upd3 較不相同，表達 Upd2-GFP 在 S2 細胞中，以不同濃度的 Tunicamycin 處理 S2 細胞後，利用西方點墨法觀察的結果，Upd2-GFP 分子量大小的訊號不受 Tunicamycin 處理的影響(圖一，B)，推測 Upd2 沒有氨基連接的醣化修飾(N-linked glycosylation)，Upd2 可能為其他修飾作用的蛋白，如羧基連接的醣化修飾(O-linked glycosylation)或酯質化等修飾。另一方面，Upd2-GFP 表達於眼碟分化中細胞區域後，以 GFP 抗體進行細胞外免疫染色法，在細胞外無法偵測 Upd2 的訊號(圖六，C)。在先前細胞培養的實驗裡發現，Upd2 與其它 Upd-like 蛋白不同，它從細胞分泌後，不會結合在細胞外基質，而是直接擴散至培養基中(Hombria et al., 2005)。推論 Upd2 在活體細胞中分泌後，因為不結合於細胞外基質，而是直接擴散至體液，可能導致不易以細胞外免疫染色偵測。然而 Upd2 不論以 *GMR-Gal4* 或 *ey-Gal4* 表達於果蠅眼碟，皆無法活化 Jak/STAT 訊息傳遞鏈，利用 *ey-Gal4* 表達 *UAS-upd2* 亦無法造成果蠅成蟲複眼變大，但我以專一表達於果蠅眼碟後緣的 Gal4 果蠅株：*dpp-Gal4*，表達 *UAS-upd2* 可發現果蠅成蟲複眼有變大的表型，顯示此 *UAS-upd2* 果蠅株是具有功能的。近期的研究提出，Upd2 的功能可能類似於哺乳動物體中的瘦體素

(Leptin)，它在果蠅的脂肪體中表達，必須長距離的擴散至大腦作用 (Rajan and Perrimon, 2012)，類似於內分泌(Endocrine)荷爾蒙的特性，與 Upd 及 Upd3 類似旁分泌(Paracrine)的作用不同，Upd2 蛋白分泌後應直接的擴散到體液中，可能不會結合至細胞外基質限制擴散的範圍。

Upd-like 蛋白形成同雙體及異雙體後可能的功能

我的實驗在 S2 細胞中利用免疫共沉澱法，發現這些 Upd-like 蛋白能夠形成同雙體及異雙體(圖三，四)。對於 Upd-like 形成雙體可能的功能，我提出三種可能的假說：第一假說是形成雙體的形式可能改變它們對受體的親和力，進而影響下游的訊息傳遞。第二假說是雙體的形成也許會調控著 Upd-like 蛋白在活體細胞中的分泌方向，在表皮細胞這種具有極性的組織中，Jak/STAT 訊息傳遞鏈各個成員的分布是受到調控的(Sotillos et al., 2008)。在果蠅後腸的表皮細胞中，Dome 受體及 Jak 都位於細胞的頂端(apical)，Upd 要活化這群表皮細胞就必須要向細胞頂端的方向分泌。若 Upd 向基底層(basal)的方向分泌，則是作用於包覆在表皮細胞外的中胚層組織中(Sotillos et al., 2008)，因此 Upd-likes 在表皮細胞中分泌的方向可能受到調控，而雙體的形成也許會影響 Upd-likes 在細胞中極性分泌的方向。第三種可能的假說，由

於 Upd 和 Upd3 從細胞分泌後會結合於細胞外基質，Upd2 則是直接擴散到培養基中(Wright et al., 2011)，這樣的特性可能會影響 Upd-like 蛋白在組織中的分布情形，進而影響他們所產生的功能。在形成 Upd-like 雙體後，也許可改變它們於組織中分布的情形，例如原本偏好結合於細胞外基質的 Upd，在與 Upd2 形成異雙體後，就能在分泌後直接擴散，進而執行不同功能。

Upd-like 蛋白分別表現在眼碟已分化和未分化區域，對 Jak/STAT 訊息傳遞鏈活性有不同影響

在我的實驗中以 *GMR-Gal4* 和 *ey-Gal4* 表達 *UAS-upd-likes* 時，利用 Jak/STAT 訊息傳遞鏈活性的報告者 10XSTAT92E-GFP-NLS，分別觀察它們對 Jak/STAT 訊息傳遞鏈活性的影響。結果中發現當利用 *GMR-Gal4* 表達 *UAS-upd* 或 *UAS-upd3*，會活化眼碟整個未分化細胞區域的 Jak/STAT 訊息傳遞鏈，尤其是中央區域的活性，訊號最為明顯(圖七，B、D)。然而若以 *ey-Gal4* 表達 *UAS-upd* 或 *UAS-upd3*，卻無法活化眼碟未分化細胞區域中央的 Jak/STAT 訊息傳遞鏈活性，而在眼碟背側及腹側邊緣會明顯活化 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的活性(圖八，B'、D')，以及在眼碟細胞基底(basal)靠近視神經軸突的位置，有一群細胞大量表現 Jak/STAT 訊息傳遞鏈活性(圖八，B'、D')。

由於 *ey-Gal4* 和 *GMR-Gal4* 果蠅株所誘發表達的細胞型態不同，*ey-Gal4* 專一表達在果蠅眼碟未分化細胞的區域，*GMR-Gal4* 專一表達在果蠅眼碟分化中細胞的區域(附圖二，B)，所以表達出來的 Upd 蛋白可能不完全相同，可能在蛋白修飾上有差異，因而影響不同結果。這兩種 Gal4 所表達的區域不同，也可能影響 Upd-like 蛋白分泌到組織中的分布情形。另一方面，由於 Jak/STAT 訊息傳遞鏈主要作用於眼碟未分化區域的細胞，促使未分化的細胞進行細胞增生(附圖二)，因此當利用 *ey-Gal4* 誘發表達 *UAS-upd-likes* 在眼碟上未分化的細胞，就是未分化細胞本身所分泌的 Upd-like 配體，作用於分泌細胞本身或鄰近的細胞，屬於自分泌(autocrine)或旁分泌(paracrine)的情形。利用 *GMR-Gal4* 在分化中細胞的區域表達，在擴散分布到眼碟上未分化的細胞活化 Jak/STAT 訊息傳遞鏈，未分化細胞的 Jak/STAT 活性是接收其他細胞所表達的 Upd-like 配體，屬於旁分泌(paracrine)的情形。自分泌與旁分泌之間的差異可能影響 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的調控。

不同的 Upd-like 配體與 Dome 受體之間有不同的交互作用

在我的實驗結果中，觀察到單獨表達 Dome 受體於果蠅眼碟未分化的細胞中，會造成果蠅成蟲小眼的表型，推測這是由於顯性負向作用(dominant negative effect)的影響(圖十一，E)。為觀察不同的 Upd-like

配體與 Dome 受體之間的交互作用有何不同，我進一步將 Upd-likes 單獨表達，和 Upd-likes 與 Dome 同時表達在未分化的細胞中，觀察兩者所造成果蠅複眼中的小眼數，並量化作統計分析(圖十一，I)，發現 Upd 單獨表達(937 ± 134)，和 Upd 與 Dome 同時表達(911 ± 81)兩者的小眼數在統計上沒有顯著差異。而 Upd2 單獨表達(746 ± 18)，和 Upd2 與 Dome 同時表達(665 ± 36)兩者的小眼數在統計上有顯著差異。以及 Upd3 單獨表達(1138 ± 60)，和 Upd3 與 Dome 同時表達(723 ± 39)兩者的小眼數在統計上有顯著差異。其中可以觀察到 Upd3 在同時表達 Dome 受體之後，複眼的小眼數目(723 ± 39)，與單獨表現 Upd3(1138 ± 60)有最顯著的變化(圖十一，I)，推測 Upd3 對於 Dome 受體的劑量可能最為敏感。

Upd-like 蛋白配上 Dome 或 Domelike 受體造成不同的交互作用

先前已知 Dome 以及 Domelike 受體能分別形成同雙體，以及相互形成異雙體，又由於 Domelike 的細胞質區域比 Dome 短了許多，並且 Domelike 沒有 STAT 的結合區域，因此在我的假說中，細胞膜上 Dome 和 Domelike 可能形成不同組合的受體，接著當 Upd-like 蛋白結合於不同組合的受體時，可能因受體的細胞質區域結構不同，進而使下游產生不同影響(附圖三)。當 Upd 和 Domelike 同時表達於果蠅三齡

幼蟲時期的眼碟中，眼碟背側有群向外突出的細胞(圖十，D')，且成蟲的複眼有向頭頂延伸的表型(圖十二，B)，Upd 和 Domelike 同時表達的性狀表型不同於 Upd 與 Dome 同時表達。而 Upd3 和 Domelike 同時表達，出現三種不同的表型，第一種為頭頂出現額外的複眼(32.5%)(圖十二，D)，第二種是複眼大小接近於野生型果蠅(46.25%)(圖十二，E)，第三種是複眼變大，類似於 Upd3 單獨表達的表型(21.25%)(圖十二，F)，同時表達 Upd3 和 Domelike 產生的三種表型也不同於 Upd3 與 Dome 同時表達。由此結果對照我的假說，推論 Upd-like 蛋白配上不同的 Dome 受體，在果蠅複眼的發育過程中，可能引發下游訊息不同的影響。

果蠅 Jak/STAT 訊息傳遞鏈可能和 MAPK 訊息傳遞鏈有交互作用

在哺乳動物體中，Jak/STAT 訊息傳遞鏈與 Receptor tyrosine kinase (RTK)/Ras/mitogen-activated protein kinase(MAPK) 訊息傳遞鏈，以及 Insulin 訊息傳遞鏈之間有複雜的交互作用(Rawlings et al., 2004)。在此過程中，首先 Jak 會磷酸化在受體上的酪胺酸(Tyrosine)位點，進而招攬具有其它訊息傳遞鏈中帶有 SH2 區域的連接蛋白，進而活化 Ras 或 Insulin receptor substrate (IRS) 的下游反應(Rawlings et al., 2004)。

在我的假說之中推測，當不同的 Upd-like 蛋白結合於不同的

Dome 受體之後，可能由於它們親和力的不同，以及不同 Dome 受體的細胞質區域不同，因而影響下游的訊息傳遞。可能除了將訊息傳給主要的 Jak 和 STAT 之外，也許也傳給其他的分支，並和 Jak 以及 STAT 交互作用，進而調控多種不同的功能。

先前的研究已利用免疫沉澱法及遺傳實驗的方法發現，果蠅的 Jak(Hop)和 Raf 之間有交互作用，一起調控果蠅的造血作用(Luo et al., 2002)。推測 Raf 可能接收 Hop 的訊息後，進一步將訊息傳給 MAPK，以執行造血相關的功能(Hombria and Brown, 2002)。所以果蠅 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的受體，除了將訊息傳給 STAT 之外，也可能傳訊息給 MAPK 訊息傳遞鏈，並和 Jak/STAT 交互作用，以執行多種不同的功能。

參考文獻

黃鈺婷。2009。 *unpaired3(upd3)* 參與果蠅眼睛發育之研究。東海大學生命科學系研究所論文。

林詩涵。2010。 Jak/STAT 訊息傳遞鏈中配體在果蠅發育過程扮演的角色。東海大學生命科學系研究所論文。

Agaisse, H. and Perrimon, N. (2004). The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunol Rev* **198**, 72-82.

Agaisse, H., Petersen, U. M., Boutros, M., Mathey-Prevot, B. and Perrimon, N. (2003). Signaling role of hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-dependent response to septic injury. *Dev Cell* **5**, 441-50.

Arbouzova, N. I. and Zeidler, M. P. (2006). JAK/STAT signalling in *Drosophila*: insights into conserved regulatory and cellular functions. *Development* **133**, 2605-16.

Argetsinger, L. S., Campbell, G. S., Yang, X., Witthuhn, B. A., Silvennoinen, O., Ihle, J. N. and Carter-Su, C. (1993). Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell* **74**, 237-44.

Bach, E. A., Ekas, L. A., Ayala-Camargo, A., Flaherty, M. S., Lee, H., Perrimon, N. and Baeg, G. H. (2007). GFP reporters detect the activation of the *Drosophila* JAK/STAT pathway in vivo. *Gene Expr Patterns* **7**, 323-31.

Beccari, S., Teixeira, L. and Rorth, P. (2002). The JAK/STAT pathway is required for border cell migration during *Drosophila* oogenesis. *Mech Dev* **111**, 115-23.

Binari, R. and Perrimon, N. (1994). Stripe-specific regulation of pair-rule genes by hopscotch, a putative Jak family tyrosine kinase in *Drosophila*. *Genes Dev* **8**, 300-12.

Brand, A. H. and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-15.

Brown, S., Hu, N. and Hombria, J. C. (2001). Identification of the first invertebrate interleukin JAK/STAT receptor, the *Drosophila* gene *domeless*. *Curr Biol* **11**, 1700-5.

Brown, S., Hu, N. and Hombria, J. C. (2003). Novel level of signalling control in the JAK/STAT pathway revealed by in situ visualisation of protein-protein interaction during *Drosophila* development. *Development* **130**, 3077-84.

Buchon, N., Broderick, N. A., Chakrabarti, S. and Lemaitre, B. (2009). Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways

in *Drosophila*. *Genes Dev* **23**, 2333-44.

Chen, H. W., Chen, X., Oh, S. W., Marinissen, M. J., Gutkind, J. S. and Hou, S. X. (2002). mom identifies a receptor for the *Drosophila* JAK/STAT signal transduction pathway and encodes a protein distantly related to the mammalian cytokine receptor family. *Genes Dev* **16**, 388-98.

Copf, T., Goguel, V., Lampin-Saint-Amaux, A., Scaplehorn, N. and Preat, T. (2011). Cytokine signaling through the JAK/STAT pathway is required for long-term memory in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 8059-64.

Firmbach-Kraft, I., Byers, M., Shows, T., Dalla-Favera, R. and Krolewski, J. J. (1990). tyk2, prototype of a novel class of non-receptor tyrosine kinase genes. *Oncogene* **5**, 1329-36.

Flaherty, M. S., Zavadil, J., Ekas, L. A. and Bach, E. A. (2009). Genome-wide expression profiling in the *Drosophila* eye reveals unexpected repression of notch signaling by the JAK/STAT pathway. *Dev Dyn* **238**, 2235-53.

Gilbert, M. M., Weaver, B. K., Gergen, J. P. and Reich, N. C. (2005). A novel functional activator of the *Drosophila* JAK/STAT pathway, unpaired2, is revealed by an in vivo reporter of pathway activation. *Mech Dev* **122**, 939-48.

Harpur, A. G., Andres, A. C., Ziemiecki, A., Aston, R. R. and Wilks, A. F. (1992). JAK2, a third member of the JAK family of protein tyrosine kinases. *Oncogene* **7**, 1347-53.

Harrison, D. A., Binari, R., Nahreini, T. S., Gilman, M. and Perrimon, N. (1995). Activation of a *Drosophila* Janus kinase (JAK) causes hematopoietic neoplasia and developmental defects. *EMBO J* **14**, 2857-65.

Harrison, D. A., McCoon, P. E., Binari, R., Gilman, M. and Perrimon, N. (1998). *Drosophila* unpaired encodes a secreted protein that activates the JAK signaling pathway. *Genes Dev* **12**, 3252-63.

Heinrich, P. C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F. and Graeve, L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* **334 (Pt 2)**, 297-314.

Hombria, J. C. and Brown, S. (2002). The fertile field of *Drosophila* Jak/STAT signalling. *Curr Biol* **12**, R569-75.

Hombria, J. C., Brown, S., Hader, S. and Zeidler, M. P. (2005). Characterisation of Upd2, a *Drosophila* JAK/STAT pathway ligand. *Dev Biol* **288**, 420-33.

Hou, X. S., Melnick, M. B. and Perrimon, N. (1996). Marelle acts downstream of the Drosophila HOP/JAK kinase and encodes a protein similar to the mammalian STATs. *Cell* **84**, 411-9.

Imada, K. and Leonard, W. J. (2000). The Jak-STAT pathway. *Mol Immunol* **37**, 1-11.

Jinks, T. M., Polydorides, A. D., Calhoun, G. and Schedl, P. (2000). The JAK/STAT signaling pathway is required for the initial choice of sexual identity in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell* **5**, 581-7.

Johnston, J. A., Kawamura, M., Kirken, R. A., Chen, Y. Q., Blake, T. B., Shibuya, K., Ortaldo, J. R., McVicar, D. W. and O'Shea, J. J. (1994). Phosphorylation and activation of the Jak-3 Janus kinase in response to interleukin-2. *Nature* **370**, 151-3.

Jung, S. H., Evans, C. J., Uemura, C. and Banerjee, U. (2005). The *Drosophila* lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. *Development* **132**, 2521-33.

Kallio, J., Myllymaki, H., Gronholm, J., Armstrong, M., Vanha-aho, L. M., Makinen, L., Silvennoinen, O., Valanne, S. and Ramet, M. (2010). Eye transformer is a negative regulator of *Drosophila* JAK/STAT signaling. *FASEB J* **24**, 4467-79.

Krolewski, J. J., Lee, R., Eddy, R., Shows, T. B. and Dalla-Favera, R. (1990). Identification and chromosomal mapping of new human tyrosine kinase genes. *Oncogene* **5**, 277-82.

Levy, D. E. (1999). Physiological significance of STAT proteins: investigations through gene disruption in vivo. *Cell Mol Life Sci* **55**, 1559-67.

Luo, H., Rose, P. E., Roberts, T. M. and Dearolf, C. R. (2002). The Hopscotch Jak kinase requires the Raf pathway to promote blood cell activation and differentiation in *Drosophila*. *Mol Genet Genomics* **267**, 57-63.

Makki, R., Meister, M., Pennetier, D., Ubeda, J. M., Braun, A., Daburon, V., Krzemien, J., Bourbon, H. M., Zhou, R., Vincent, A. et al. (2010). A short receptor downregulates JAK/STAT signalling to control the *Drosophila* cellular immune response. *PLoS Biol* **8**, e1000441.

Mui, A. L. (1999). The role of STATs in proliferation, differentiation, and apoptosis. *Cell Mol Life Sci* **55**, 1547-58.

Murray, P. J. (2007). The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol* **178**, 2623-9.

O'Shea, J. J., Gadina, M. and Schreiber, R. D. (2002). Cytokine signaling in 2002: new

surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* **109 Suppl**, S121-31.

Osman, D., Buchon, N., Chakrabarti, S., Huang, Y.T., Su, W.C., Poidevin, M., Tsai, Y.C. and Lemaitre, B. (2012). Autocrine and paracrine Unpaired signalling regulate intestinal stem cell maintenance and division. *J. Cell Sci.* (revised).

Perrimon, N. and Mahowald, A. P. (1986). l(1)hopsotch, A larval-pupal zygotic lethal with a specific maternal effect on segmentation in *Drosophila*. *Dev Biol* **118**, 28-41.

Rajan, A. and Perrimon, N. (2012). An interleukin-6 like cytokine regulates systemic insulin signaling by conveying the 'fed' state from the fat body to the brain. *Drosophila research conference abstract* **69**.

Rane, S. G. and Reddy, E. P. (1994). JAK3: a novel JAK kinase associated with terminal differentiation of hematopoietic cells. *Oncogene* **9**, 2415-23.

Rawlings, J. S., Rosler, K. M. and Harrison, D. A. (2004). The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* **117**, 1281-3.

Ready, D. F., Hanson, T. E. and Benzer, S. (1976). Development of the *Drosophila* retina, a neurocrystalline lattice. *Dev Biol* **53**, 217-40.

Schindler, C. and Darnell, J. E., Jr. (1995). Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem* **64**, 621-51.

Sefton, L., Timmer, J. R., Zhang, Y., Beranger, F. and Cline, T. W. (2000). An extracellular activator of the *Drosophila* JAK/STAT pathway is a sex-determination signal element. *Nature* **405**, 970-3.

Silver, D. L., Geisbrecht, E. R. and Montell, D. J. (2005). Requirement for JAK/STAT signaling throughout border cell migration in *Drosophila*. *Development* **132**, 3483-92.

Sotillos, S., Diaz-Meco, M. T., Moscat, J. and Castelli-Gair Hombria, J. (2008). Polarized subcellular localization of Jak/STAT components is required for efficient signaling. *Curr Biol* **18**, 624-9.

Tsai, Y. C. and Sun, Y. H. (2004). Long-range effect of upd, a ligand for Jak/STAT pathway, on cell cycle in *Drosophila* eye development. *Genesis* **39**, 141-53.

Tsai, Y. C., Yao, J. G., Chen, P. H., Posakony, J. W., Barolo, S., Kim, J. and Sun, Y. H. (2007). Upd/Jak/STAT signaling represses wg transcription to allow initiation of morphogenetic furrow in *Drosophila* eye development. *Dev Biol* **306**, 760-71.

Tulina, N. and Matunis, E. (2001). Control of stem cell self-renewal in *Drosophila* spermatogenesis by JAK-STAT signaling. *Science* **294**, 2546-9.

Wilks, A. F. (1991). Cloning members of protein-tyrosine kinase family using polymerase chain reaction. *Methods Enzymol* **200**, 533-46.

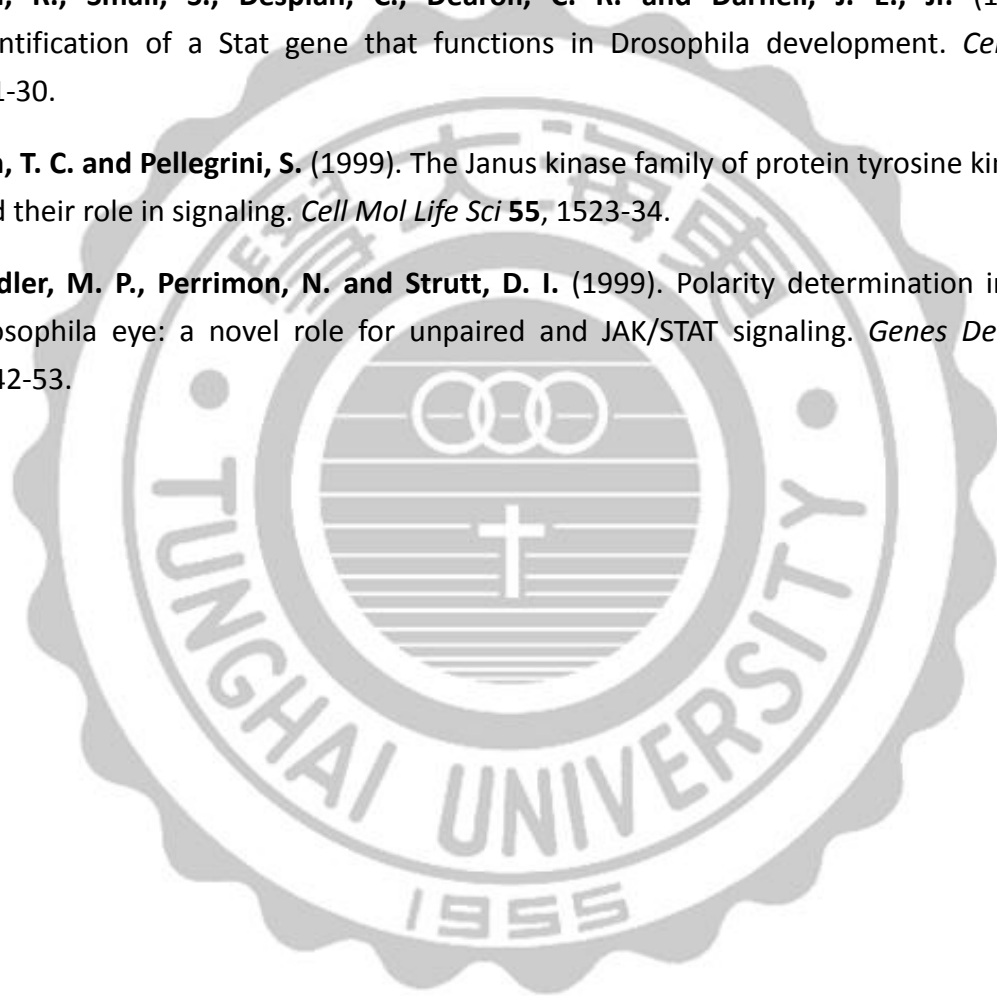
Wright, V. M., Vogt, K. L., Smythe, E. and Zeidler, M. P. (2011). Differential activities of the Drosophila JAK/STAT pathway ligands Upd, Upd2 and Upd3. *Cell Signal* **23**, 920-7.

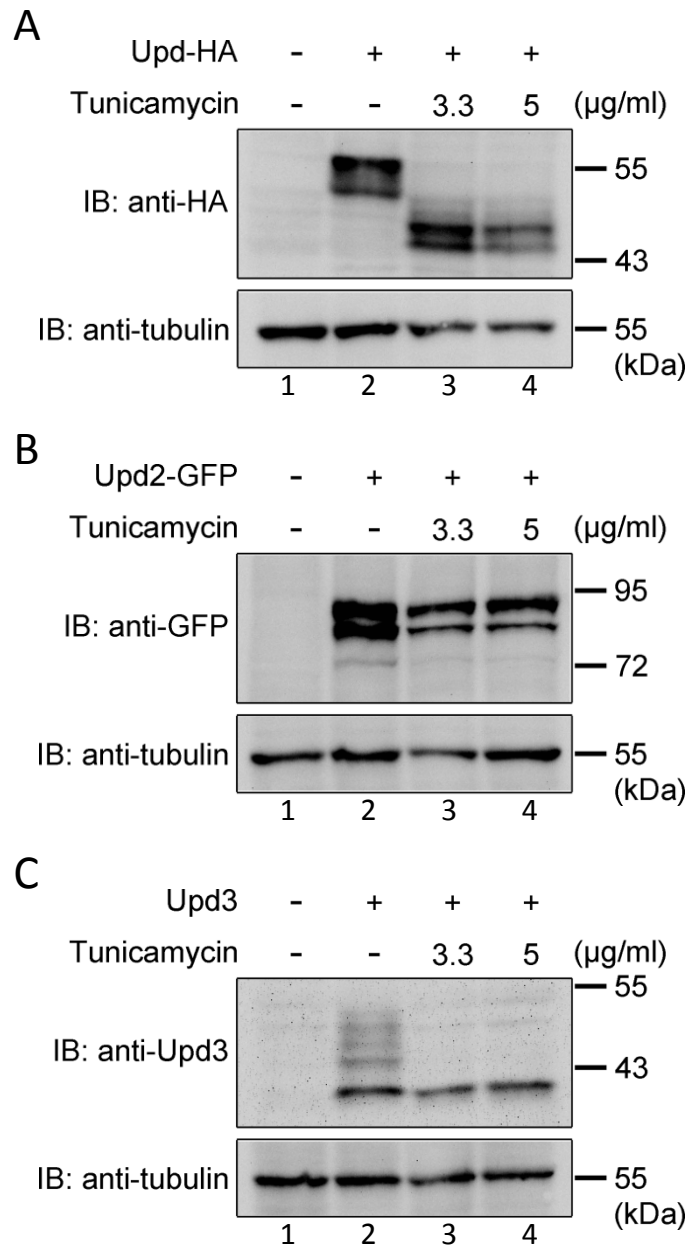
Xi, R., McGregor, J. R. and Harrison, D. A. (2003). A gradient of JAK pathway activity patterns the anterior-posterior axis of the follicular epithelium. *Dev Cell* **4**, 167-77.

Yan, R., Small, S., Desplan, C., Dearolf, C. R. and Darnell, J. E., Jr. (1996). Identification of a Stat gene that functions in Drosophila development. *Cell* **84**, 421-30.

Yeh, T. C. and Pellegrini, S. (1999). The Janus kinase family of protein tyrosine kinases and their role in signaling. *Cell Mol Life Sci* **55**, 1523-34.

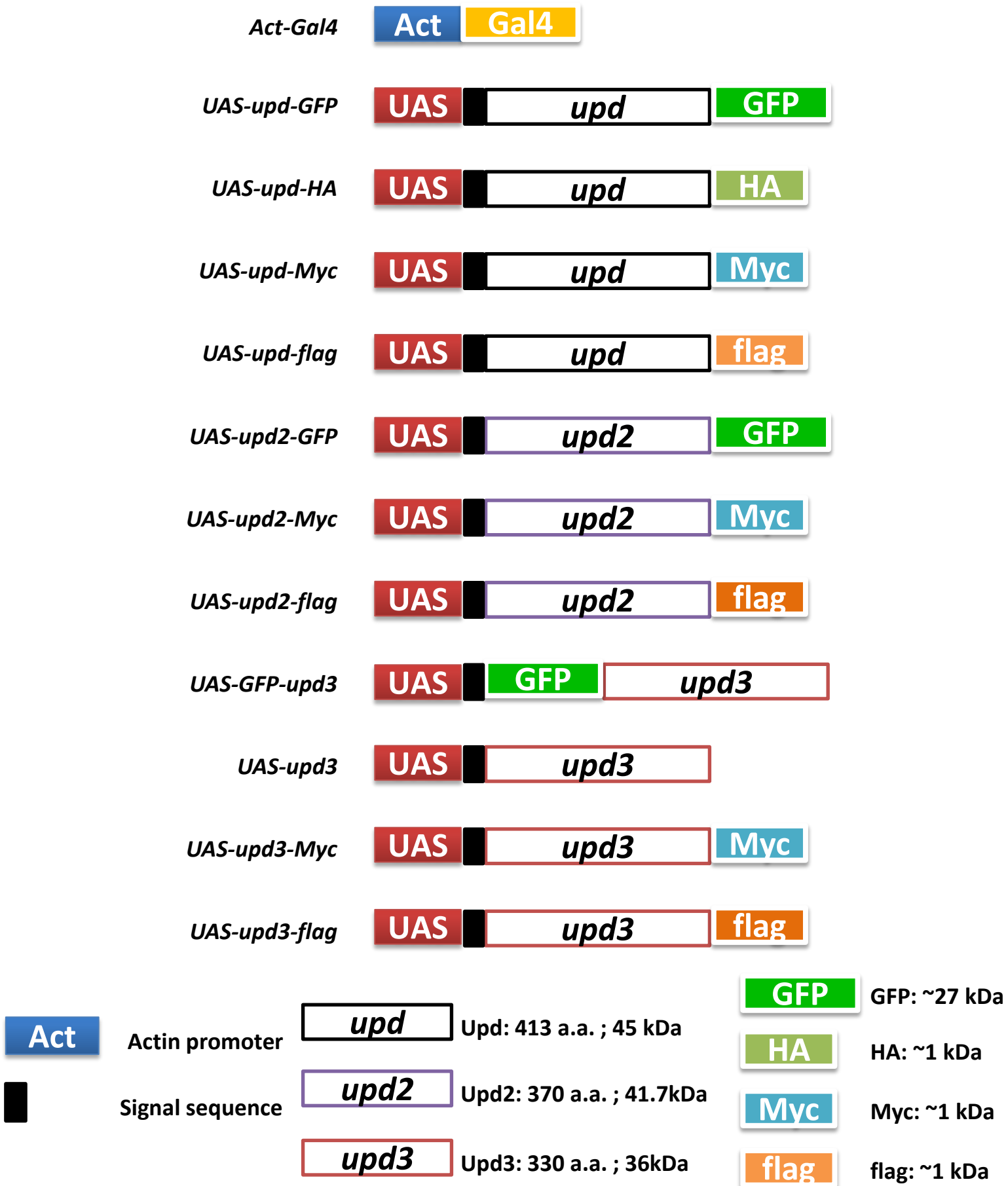
Zeidler, M. P., Perrimon, N. and Strutt, D. I. (1999). Polarity determination in the Drosophila eye: a novel role for unpaired and JAK/STAT signaling. *Genes Dev* **13**, 1342-53.





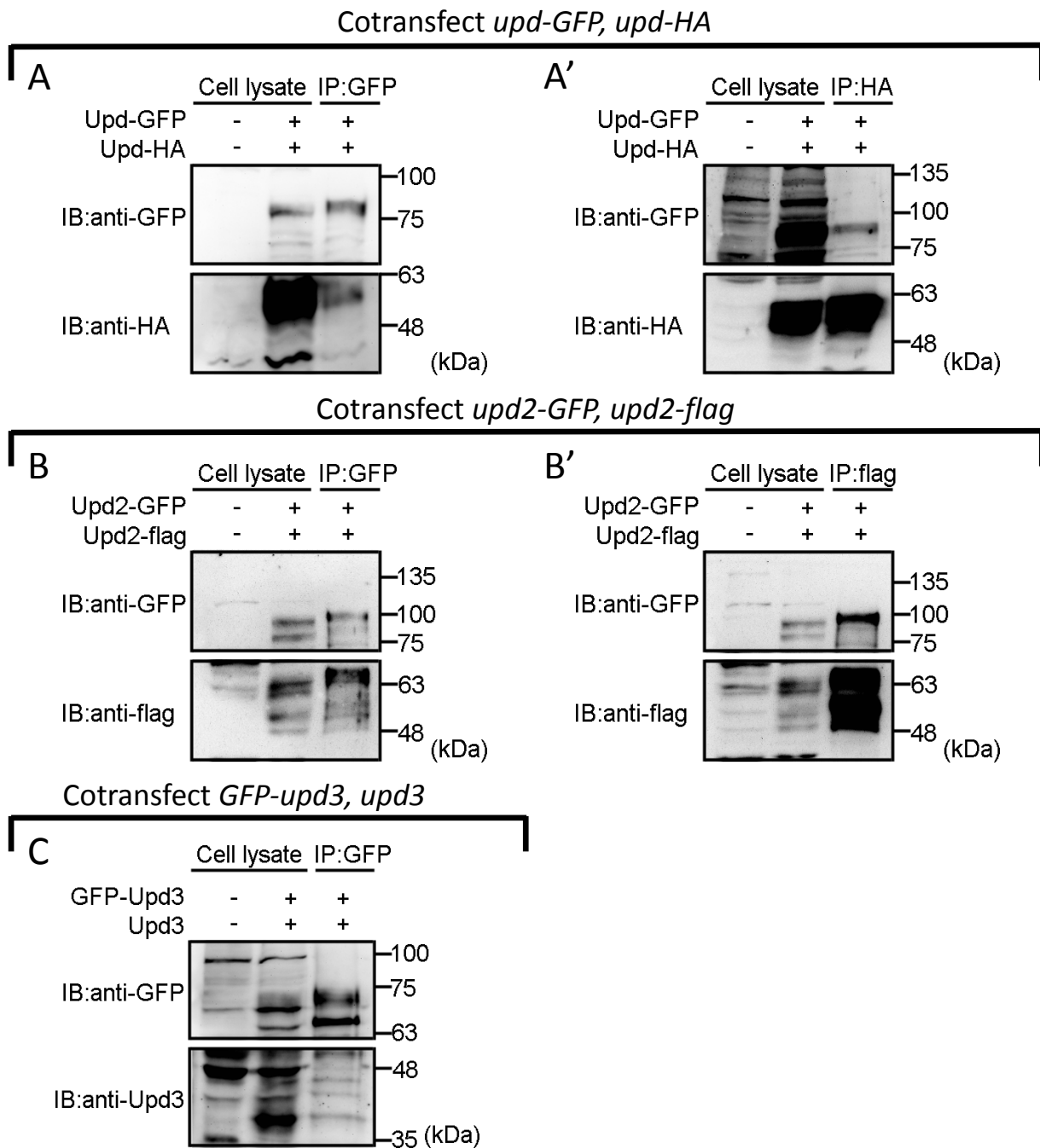
圖一、Upd及Upd3皆為氨基連接的醣化蛋白(N-linked glycoprotein)

(A)將帶有HA標籤蛋白的Unpaired(Upd)蛋白(Upd-HA)，接進具有UAS序列的載體中，再和*Actin-Gal4* (*Act-Gal4*)共同轉染至S2細胞中，使S2細胞大量表現Upd-HA蛋白(*Act>upd-HA*)，再利用HA的抗體進行西方點墨法來偵測Upd-HA，結果顯示在50~60kDa之間呈現多個不同的分子量大小，高於原先預測Upd-HA的分子量(~45kDa)(lane2)。分別以3.3µg/ml和5µg/ml的Tunicamycin處理，發現Upd-HA降至43~50kDa附近的位置 (lane3、4)。(B)利用S2細胞大量表達帶有GFP標籤蛋白的Upd2-GFP蛋白(*Act>upd2-GFP*)，並利用GFP的抗體分析，結果發現Upd2-GFP在分子量85~95kDa之間呈現多個不同的分子量大小(lane2)，分別處理3.3µg/ml和5µg/ml的Tunicamycin，發現Upd2-GFP蛋白分子量並未受影響(lane3、4)。(C)利用S2細胞大量表達Upd3蛋白(*Act>upd3*)，並利用Upd3抗體偵測，結果發現Upd3在約36~55kDa之間偵測到多個不同的分子量大小(lane2)，分別處理3.3µg/ml和5µg/ml的Tunicamycin後，發現Upd3留下原先預測的正確分子量約36kDa (lane3、4)。



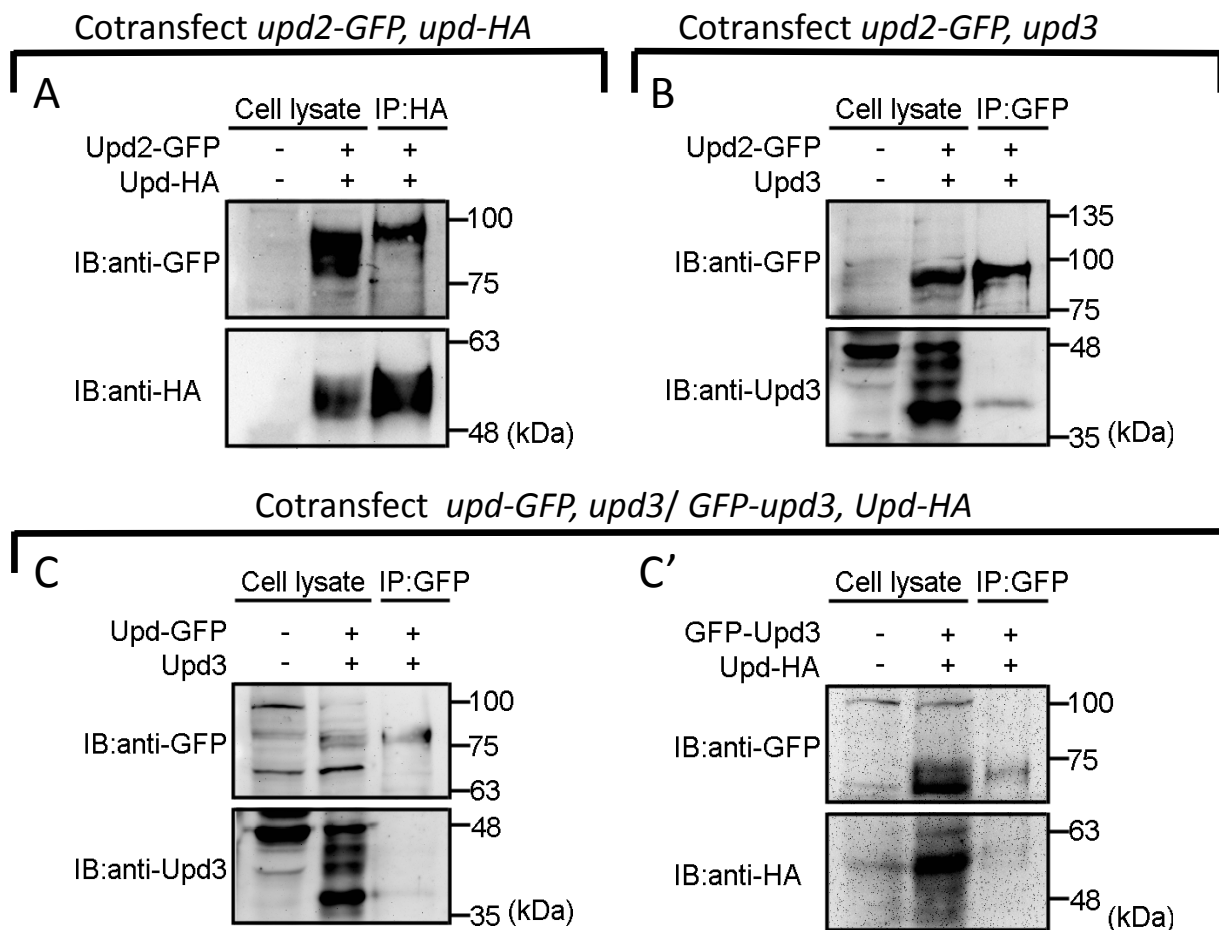
圖二、共同免疫沉澱法所利用之Actin-Gal4及UAS-upd-likes質體

實驗室先前已在有UAS序列的載體中建構帶不同標籤蛋白(tag)的*upd-likes*：*UAS-upd-GFP*、*UAS-upd2-GFP*(Tsai and Sun, 2004)、*UAS-upd-HA*(Su-Wen Cheng)、*UAS-upd2-flag*、*UAS-GFP-upd3*以及*UAS-upd3*(Yu-Ting Chiu)。此外，我也建構：*UAS-upd-Myc*、*UAS-upd-flag*、*UAS-upd2-Myc*、*UAS-upd3-Myc*、*UAS-upd3-flag*，可利用標籤蛋白的抗體以及我們實驗室製備的Upd3抗體，進行西方點墨法和免疫沉澱法分析。



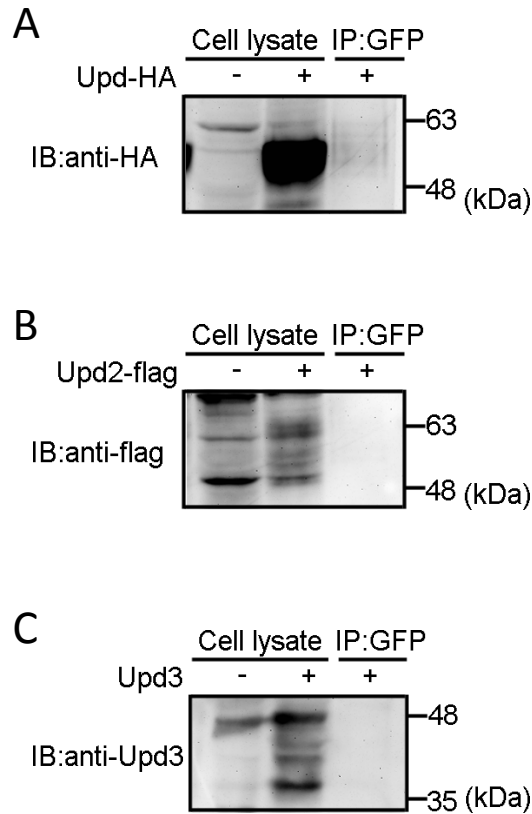
圖三、Upd-like蛋白在S2細胞中會形成同雙體(Homodimers)

將Act-Gal4與不同組合的UAS-upd-likes共同轉染至S2細胞，利用Gal4-UAS系統在S2細胞中表達Upd-like蛋白(Act>upd-likes)，再以共同免疫沉澱法觀察Upd-like蛋白是否會形成同雙體。(A、A')利用S2細胞大量表達Upd-GFP和Upd-HA(Act>upd-GFP, upd-HA)，以GFP及HA的抗體進行西方點墨法分析，確認Upd-GFP和Upd-HA有被表達出來(lane1、2)。(A)利用GFP的抗體進行免疫沉澱，上圖可以觀察到Upd-GFP會被免疫沉澱(lane3)，並且在下圖以HA的抗體偵測發現Upd-HA也會被共同免疫沉澱下來(lane3)。(A')利用HA的抗體進行免疫沉澱法，結果可見下圖Upd-HA會被免疫沉澱(lane3)，並且上圖Upd-GFP也被共同免疫沉澱下來(lane3)。從共同免疫沉澱的結果顯示，Upd會形成同雙體。(B、B')利用S2細胞表達Upd2-GFP和Upd2-flag(Act>upd2-GFP, upd2-flag)，利用GFP和flag的抗體以西方點墨法確認表達(lane2)，再分別以GFP和flag的抗體進行免疫沉澱(B、B' lane3)，結果顯示Upd2-GFP和Upd2-flag都會被共同免疫沉澱。(C)利用S2細胞大量表達GFP-Upd3和Upd3 (Act>GFP-upd3, upd3) (lane2)，利用GFP的抗體進行免疫沉澱法，以GFP抗體及Upd3抗體進行西方點墨法分析，結果顯示GFP-Upd3和Upd3會被共同免疫沉澱下來(lane3)。我的結果發現三種Upd-like蛋白皆能形成同雙體。



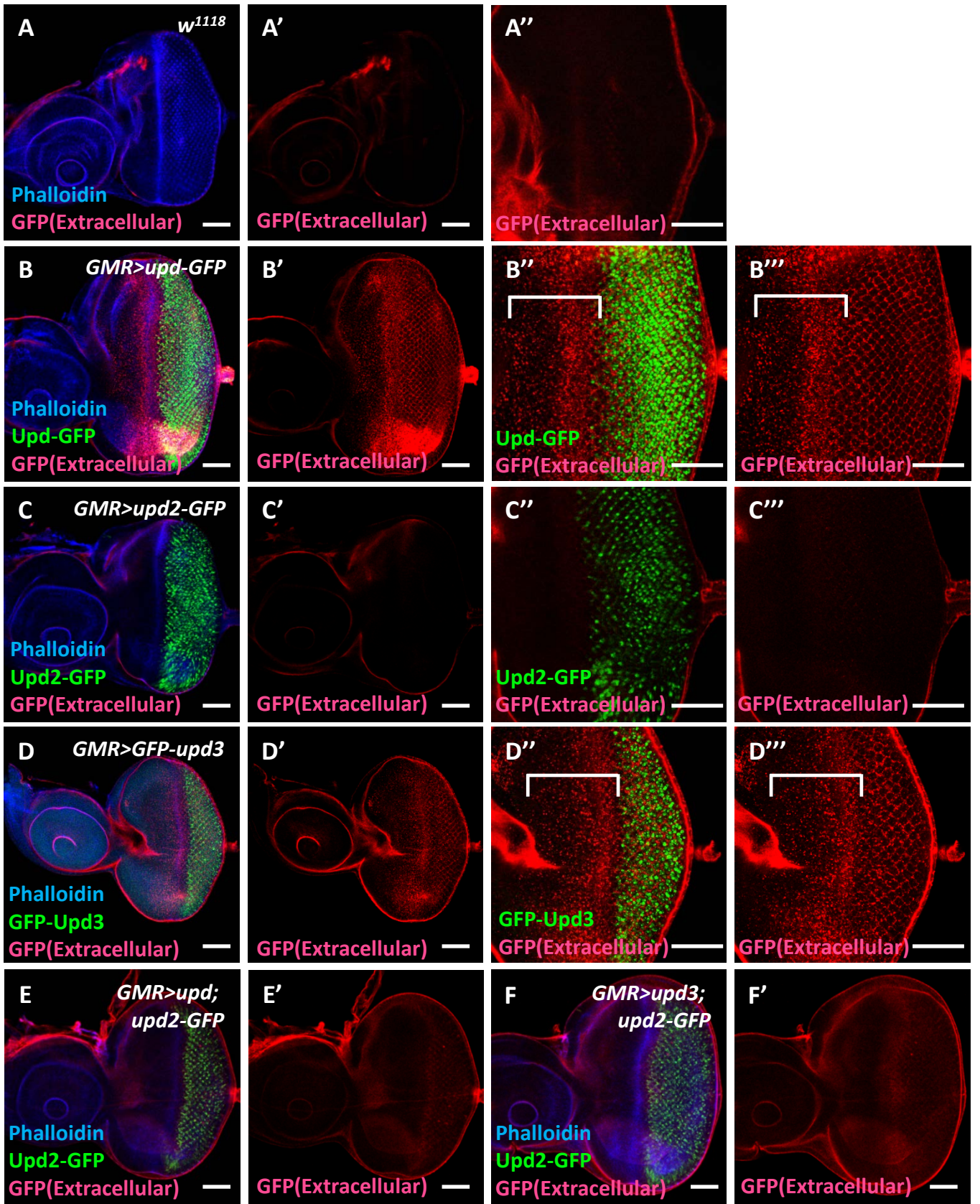
圖四、Upd-like蛋白在S2細胞中會形成異雙體(Heterodimers)

將Act-Gal4與不同組合的UAS-upd-likes共同轉染至S2細胞，利用Gal4-UAS系統在S2細胞中表達Upd-like蛋白(Act>upd-likes)，再以共同免疫沉澱法觀察Upd-like蛋白是否會形成異雙體。(A)利用S2細胞大量表達Upd2-GFP和Upd-HA(Act>upd2-GFP, upd-HA)(lane2)，利用GFP的抗體進行免疫沉澱法，結果顯示Upd2-GFP和Upd-HA會被共同免疫沉澱下來(lane3)。(B)利用S2細胞大量表達Upd2-GFP和Upd3(Act>upd2-GFP, upd3) (lane2)，利用GFP的抗體進行免疫沉澱法，結果顯示Upd2-GFP和Upd3能夠被共同免疫沉澱下來(lane3)。(C)利用S2細胞大量表達Upd-GFP和Upd3(Act>upd-GFP, upd3)(lane2)，利用GFP的抗體進行免疫沉澱法，結果顯示Upd-GFP和Upd3會被共同免疫沉澱下來(lane3)。(C')利用S2細胞大量表達GFP-Upd3和Upd-HA(Act>GFP-upd, upd-HA)(lane2)，利用GFP的抗體進行免疫沉澱法，結果顯示GFP-Upd3和Upd-HA能被共同免疫沉澱下來(lane3)，我的結果發現三種Upd-like蛋白能相互形成異雙體。



圖五、GFP抗體不會直接辨認Upd-HA、Upd2-flag及Upd3 (共同免疫沉澱法控制組)

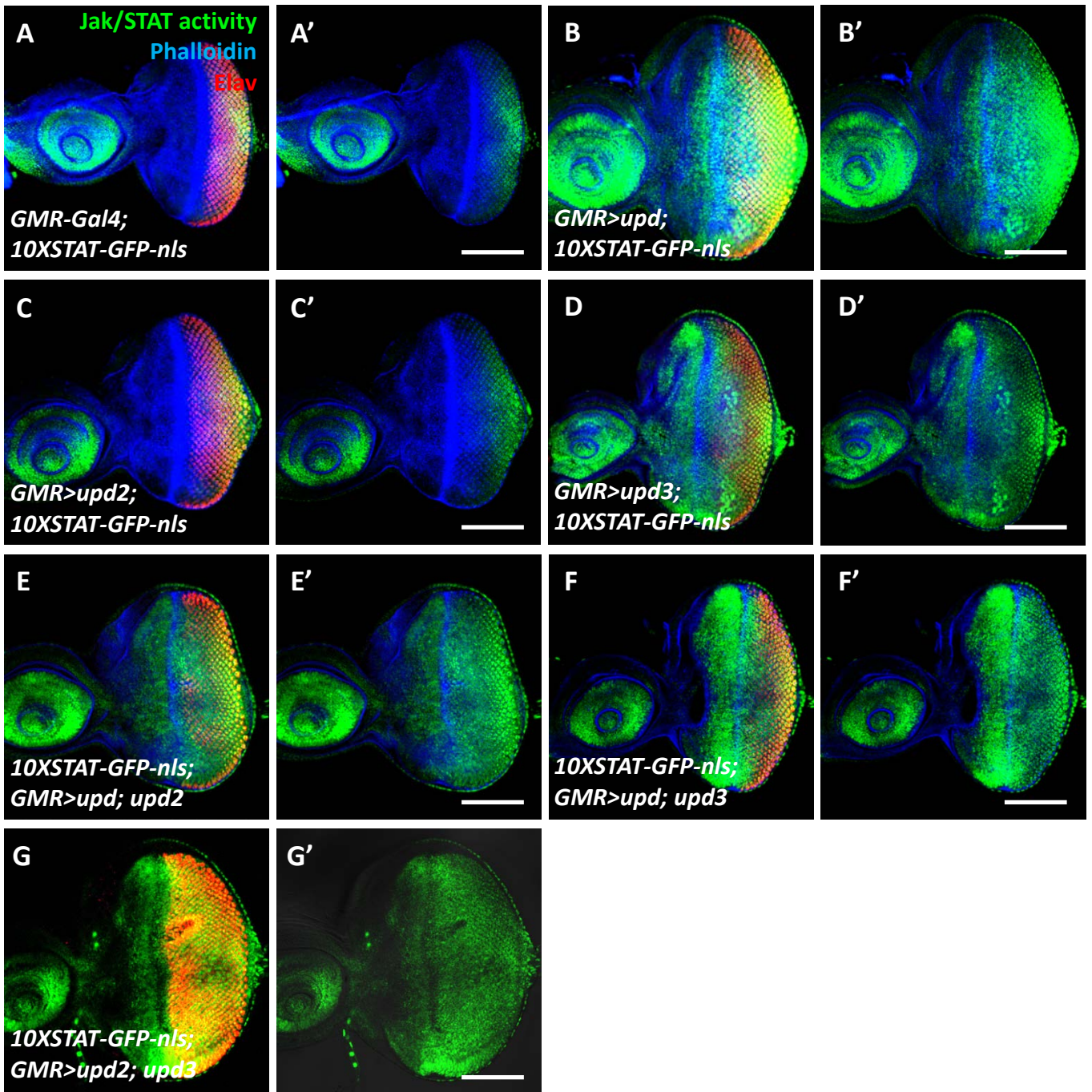
為了確認GFP抗體不會直接辨認Upd-HA、Upd2-flag及Upd3，造成在共同免疫沉澱法的結果中誤判，我轉染將Act-Gal4與帶有GFP標籤蛋白UAS-upd-likes至S2細胞，利用Gal4-UAS系統在S2細胞中表達Upd-like蛋白(Act>upd-likes)，再以GFP的抗體進行免疫沉澱法。(A)利用S2細胞大量表達Upd-HA (Act>upd-HA)(lane2)，利用GFP的抗體進行免疫沉澱法，結果顯示Upd-HA不會被免疫沉澱下來(lane3)。(B)利用S2細胞大量表達Upd2-flag (Act>upd2-flag)(lane2)，利用GFP的抗體進行免疫沉澱法，結果顯示Upd2-flag也不會被免疫沉澱下來(lane3)。(C)利用S2細胞大量表達Upd3(Act>upd3)(lane2)，利用GFP的抗體進行免疫沉澱法，結果顯示Upd3不會被免疫沉澱下來(lane3)。



圖六、Upd-like蛋白分泌至細胞外後於果蠅眼碟內的分布情形

圖六、Upd-like蛋白分泌至細胞外後於果蠅眼碟內的分布情形

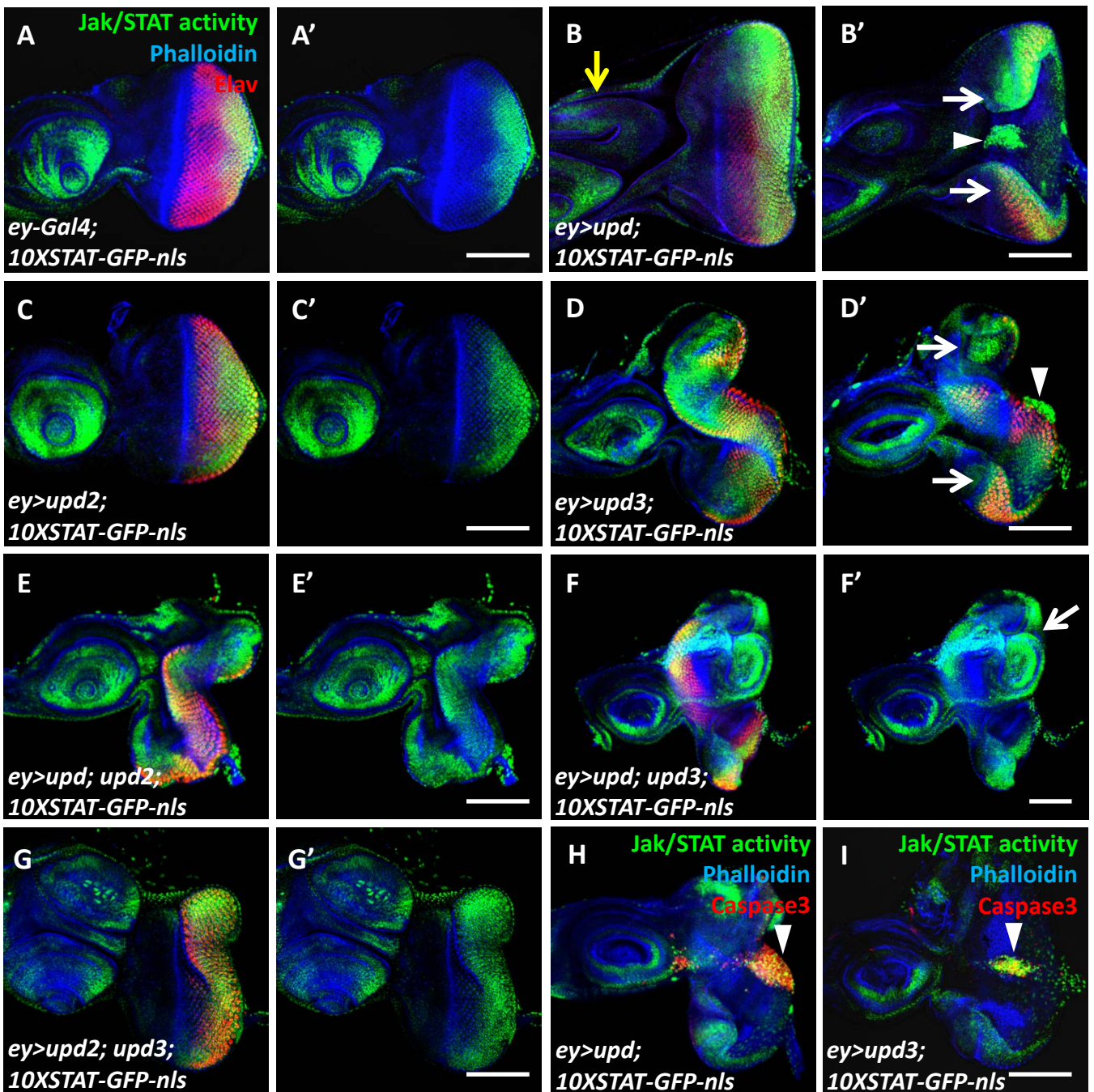
利用專一表達於果蠅眼碟分化中細胞的Gal4果蠅株：*GMR-Gal4*，表達帶有GFP標籤蛋白(tag)的*UAS-upd-likes*，並利用GFP的抗體做細胞外免疫組織染色，以觀察分泌至細胞外的Upd-like蛋白。綠色訊號代表Upd-like-GFP的綠色螢光訊號，紅色訊號代表Upd-like-GFP蛋白分泌至細胞外後，被GFP的抗體偵測到的訊號。(A-A'')野生型果蠅三齡幼蟲晚期的眼碟。(B-B''')利用*GMR-Gal4*表達*UAS-upd-GFP*(*GMR>upd-GFP*)，Upd-GFP綠色螢光的訊號表達在果蠅眼碟分化中細胞的區域(B、B'')，Upd-GFP在細胞外的訊號(紅色)，由分化中細胞的區域擴散至未分化細胞的區域(B')。(B''-B''')利用40倍物鏡觀察以GFP抗體偵測，Upd表達後越過型態發生溝(Morphogenic furrow, MF)，被偵測到點狀訊號散布在未分化細胞的區域(B''、B'''，白色方框)，Upd在分化中細胞外被偵測到點狀的訊號，且點狀訊號相連成格子狀(B''')。(C-C''')利用*GMR-Gal4*表達*UAS-upd2-GFP*(*GMR>upd2-GFP*)，Upd2-GFP綠色螢光的訊號表達在果蠅眼碟分化中細胞的區域(C、C'')，以GFP抗體進行細胞外免疫染色，未偵測到Upd2-GFP在細胞外的訊號(C'-C''')。(D-D''')利用*GMR-Gal4*表達*UAS-GFP-upd3*(*GMR>GFP-upd3*)，GFP-Upd3的綠色螢光訊號表達在果蠅眼碟分化中細胞的區域(D、D'')，GFP抗體偵測到Upd3在細胞外的訊號(紅色)(D')。(D''-D''')以40倍物鏡觀察GFP抗體偵測細胞外GFP-Upd3，GFP-Upd3表達後越過型態發生溝(MF)，呈現點狀訊號散布在未分化細胞的區域(D''、D'''，白色方框)，Upd3在分化中細胞外也被偵測到點狀的訊號，且點狀訊號相連成格子狀的圖樣(D''')。(E、F)為觀察表達Upd或Upd3是否影響Upd2-GFP蛋白於眼碟組織中的分布，利用*GMR-Gal4*表達*UAS-upd2-GFP*，再分別配上Upd或Upd3共同表達，並以GFP抗體進行細胞外免疫組織染色，觀察Upd2-GFP於眼碟組織細胞外的分布情形。(E、E')利用*GMR-Gal4*同時表達*UAS-upd*和*UAS-upd2-GFP*(*GMR>upd; upd2-GFP*)，Upd2-GFP綠色螢光的訊號表達在果蠅眼碟分化中細胞的區域(E)，利用GFP抗體進行細胞外免疫染色的結果，未偵測到Upd2-GFP在細胞外的訊號(E')。(F、F')利用*GMR-Gal4*同時表達*UAS-upd3*和*UAS-upd2-GFP*(*GMR>upd3; upd2-GFP*)，Upd2-GFP綠色螢光的訊號表達在果蠅眼碟分化中細胞的區域(F)，利用GFP抗體進行細胞外免疫染色的結果，無法偵測到Upd2-GFP在細胞外的訊號(F')。(Scale bar: 50μm)



圖七、Upd-likes表達於眼碟分化中細胞的區域對Jak/STAT訊息傳遞鏈活性的影響

圖七、Upd-likes表達於眼碟分化中細胞的區域對Jak/STAT訊息傳遞鏈活性的影響

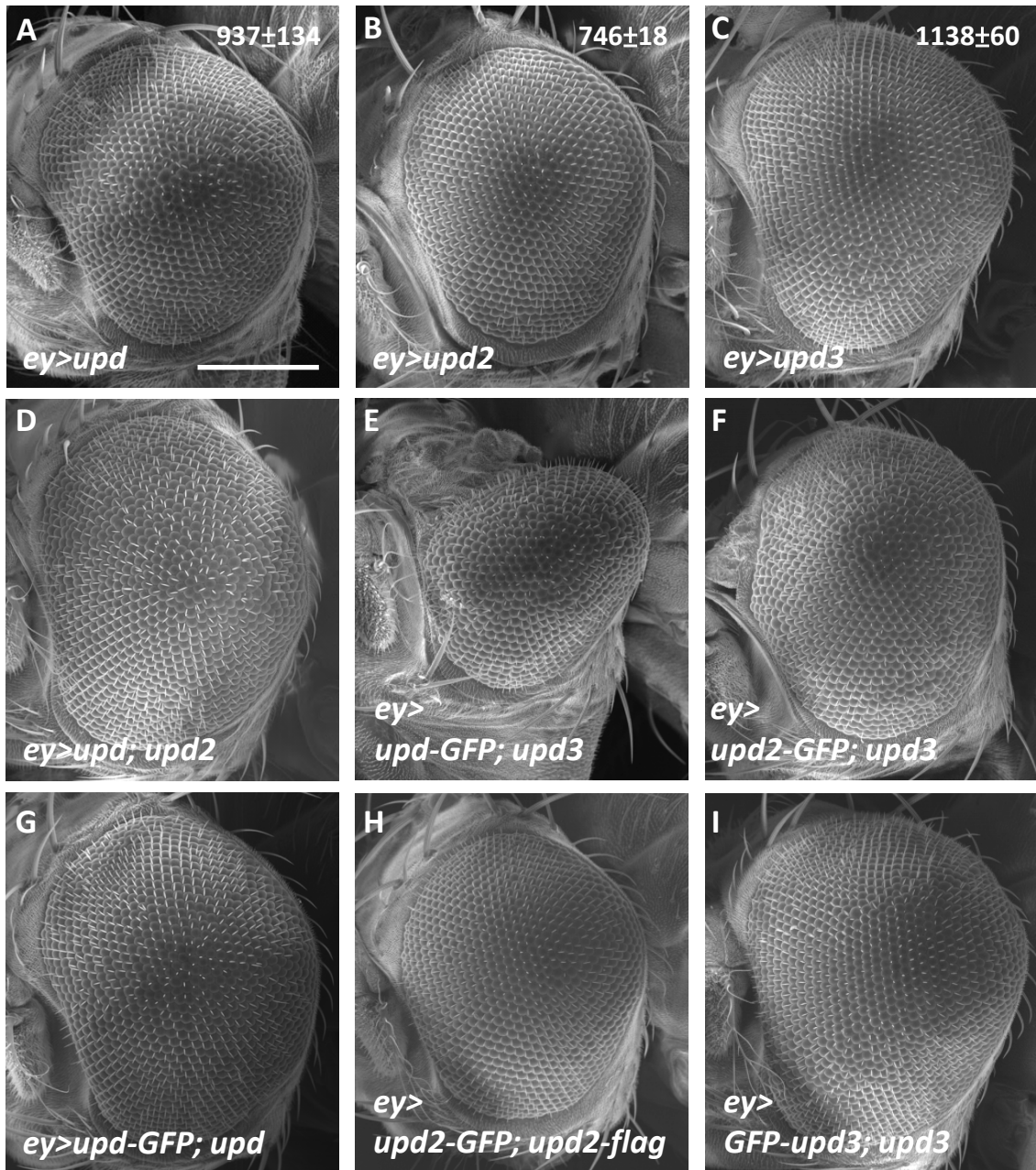
觀察在眼碟分化中細胞的區域，單獨表達Upd-like蛋白或不同Upd-likes同時表達(*GMR>upd-likes*)，對於Jak/STAT訊息傳遞鏈活性的影響。利用Jak/STAT訊息傳遞鏈活性的報告者：10XSTAT92E-GFP-NLS觀察，綠色螢光代表有Jak/STAT訊息傳遞鏈活性的區域。紅色訊號標示分化中的視神經細胞(Elav)。藍色為Phalloidin。(A、A')野生型果蠅(*w¹¹¹⁸*)中內生性的Jak/STAT訊息傳遞鏈活性，在三齡幼蟲晚期的眼碟中，分布於眼碟後端約三分之一的區域。(B、B')當利用*GMR-Gal4*表達*UAS-upd*(*GMR>upd*)於眼碟分化中細胞的區域時，觀察到未分化細胞的區域Jak/STAT訊息傳遞鏈的活性會上升。(C、C')當利用*GMR-Gal4*表達*UAS-upd2*(*GMR>upd2*)於眼碟分化中細胞的區域時，Jak/STAT訊息傳遞鏈活化的範圍在眼碟後端三分之一的區域。(D、D')當利用*GMR-Gal4*表達*UAS-upd3*(*GMR>upd3*)於眼碟分化中細胞的區域時，觀察到未分化細胞的區域Jak/STAT訊息傳遞鏈會被活化。(E、E')當利用*GMR-Gal4*同時表達*UAS-upd*和*UAS-upd2*(*GMR>upd; upd2*)，觀察到未分化細胞的區域中Jak/STAT訊息傳遞鏈活性會上升。(F、F')利用同時表達*UAS-upd*和*UAS-upd3*(*GMR>upd; upd3*)，觀察到未分化細胞的區域有Jak/STAT訊息傳遞鏈的活性上升。(G、G')同時表達Upd2和Upd3(*GMR>upd2; upd3*)，觀察到未分化細胞的區域Jak/STAT訊息傳遞鏈會明顯被活化。(Scale bar: 100μm)



圖八、Upd-likes表達於眼碟未分化細胞的區域對Jak/STAT訊息傳遞鏈活性的影響

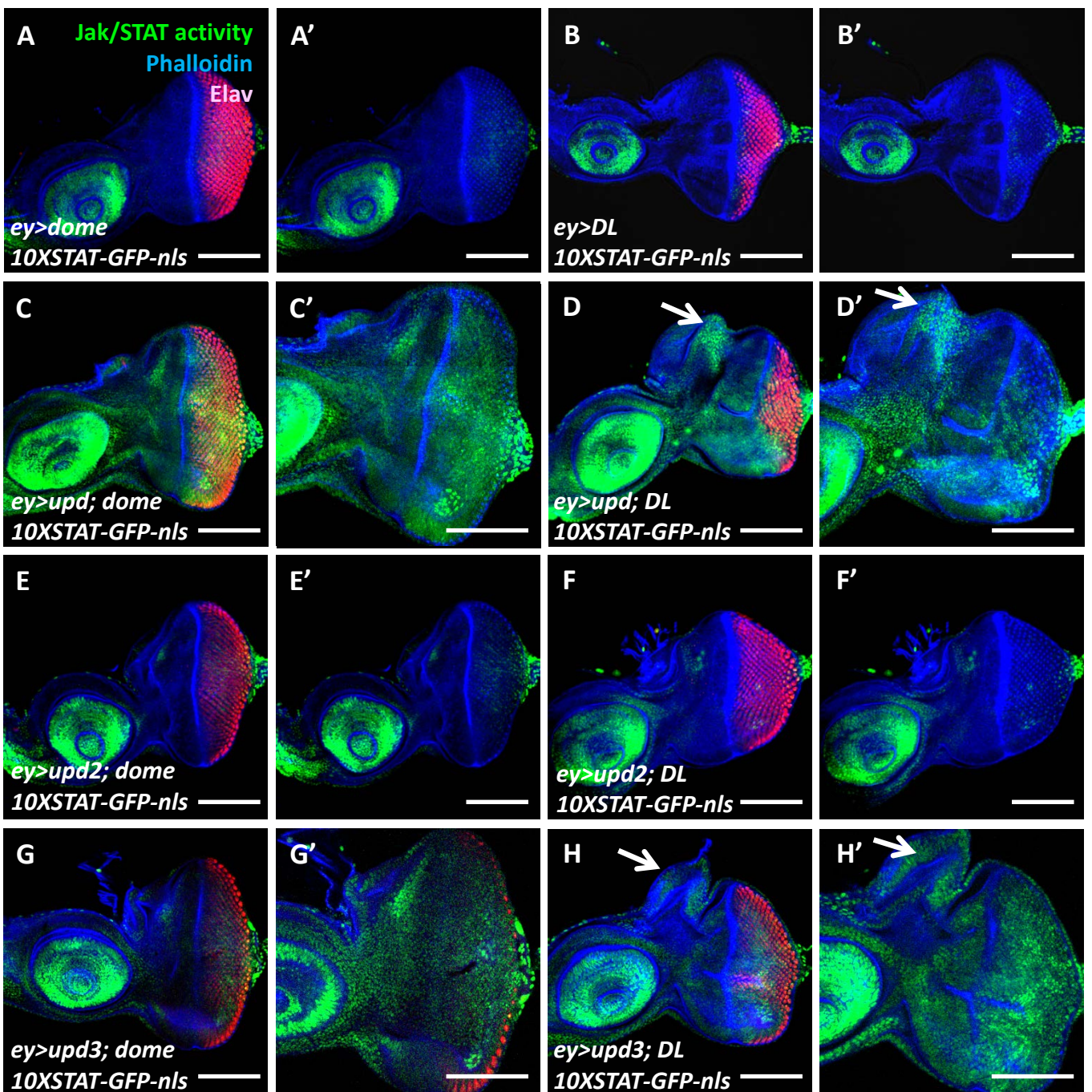
圖八、Upd-likes表達於眼碟未分化細胞的區域對Jak/STAT訊息傳遞鏈活性的影響

在眼碟未分化細胞的區域單獨表達Upd-like蛋白或表達不同組合的Upd-like蛋白，觀察它們對於Jak/STAT訊息傳遞鏈活性的影響。我利用Jak/STAT訊息傳遞鏈活性的報告者：10XSTAT92E-GFP-NLS來反應Jak/STAT訊息的活性，綠色螢光代表有Jak/STAT訊息傳遞鏈活性的區域，紅色訊號標示分化中的視神經細胞(Elav)，藍色為Phalloidin。(A、A')野生型果蠅(*w¹¹¹⁸*)的Jak/STAT訊息傳遞鏈活性，在三齡幼蟲晚期的眼碟中，分布於眼碟後端約三分之一的區域。(B、B')當利用*ey-Gal4*表達*upd(ey>upd)*於未分化細胞的區域，果蠅眼碟有明顯變大的情形，大部分眼碟嚴重摺疊扭曲，並有觸角碟成倍的現象(黃色箭號)。Jak/STAT訊息傳遞鏈的活性，主要在眼碟背側及腹側邊緣被活化(白色箭號)，其中背側邊緣的活性特別強，在眼碟細胞基底(basal)，接近神經軸突的區域，中央有一群細胞的Jak/STAT訊息傳遞鏈被活化(白色箭頭)。B與B'所呈現為同一個眼碟的不同層(focal plane)。(C、C')當利用*ey-Gal4*表達*upd2(ey>upd2)*於未分化細胞的區域時，觀察眼碟大小和型態，以及Jak/STAT訊息傳遞鏈的活性皆類似於野生型果蠅株(A)。(D、D')當利用*ey-Gal4*表達*upd3(ey>upd3)*在未分化細胞區域，在眼碟背側及腹側的邊緣上活化Jak/STAT訊息傳遞鏈(白色箭號)，其中背側邊緣的活性較強。眼碟中央基底層，靠近神經軸突的區域，有一群細胞的Jak/STAT訊息傳遞鏈被活化(白色箭頭)。D與D'所呈現為同一個眼碟的不同層。(E、E')當利用*ey-Gal4*共同表達*upd*和*upd2*的組合(*ey>upd; upd2*)、(F、F')共同表達*upd*和*upd3*的組合(*ey>upd; upd3*)，以及(G、G')共同表達*upd2*和*upd3*的組合(*ey>upd2; upd3*)，皆造成果蠅眼碟變大，並且嚴重摺疊扭曲，Jak/STAT訊息傳遞鏈活性主要都在眼碟邊緣區域被活化。其中(F、F')*ey>upd; upd3*影響最為顯著，變大的眼碟已無法全部放進20倍物鏡的視野下，視神經細胞的區域摺疊扭曲，觸角碟成倍，異常地出現在眼碟的區域(白色箭號)。(H、I)利用*ey-Gal4*分別表達*UAS-upd*和*UAS-upd3(ey>upd, ey>upd3)*，以活化態Caspase 3的抗體染色(紅色)，發現眼碟中央靠近基底層，有Jak/STAT訊息傳遞鏈活化的細胞正在進行細胞凋亡(白色箭頭)。(Scale bar: 100µm)



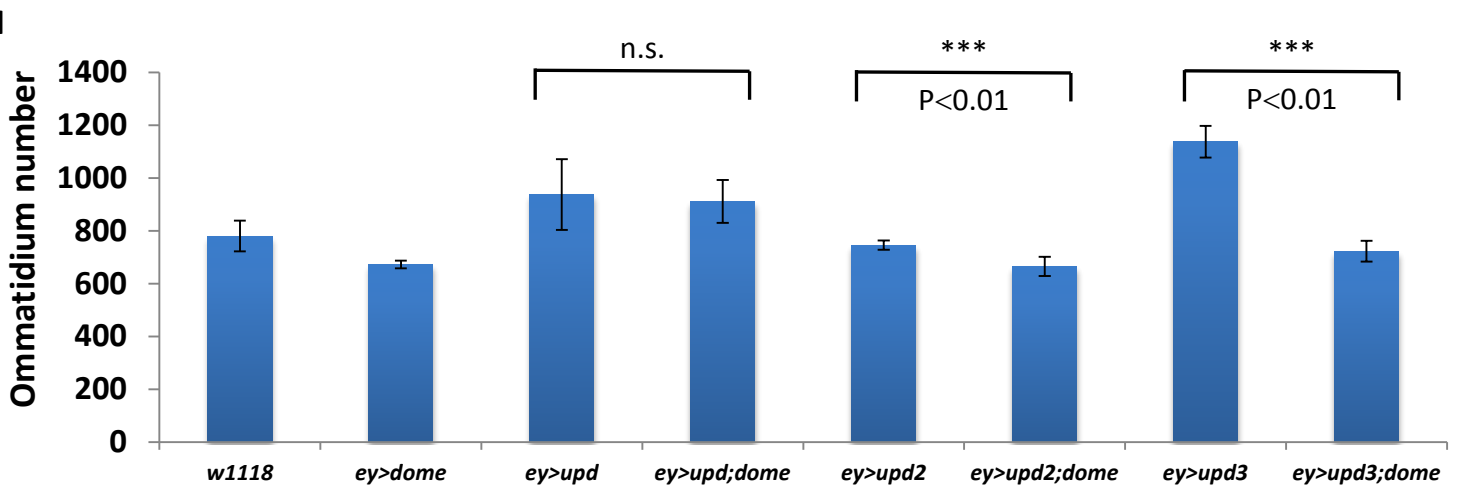
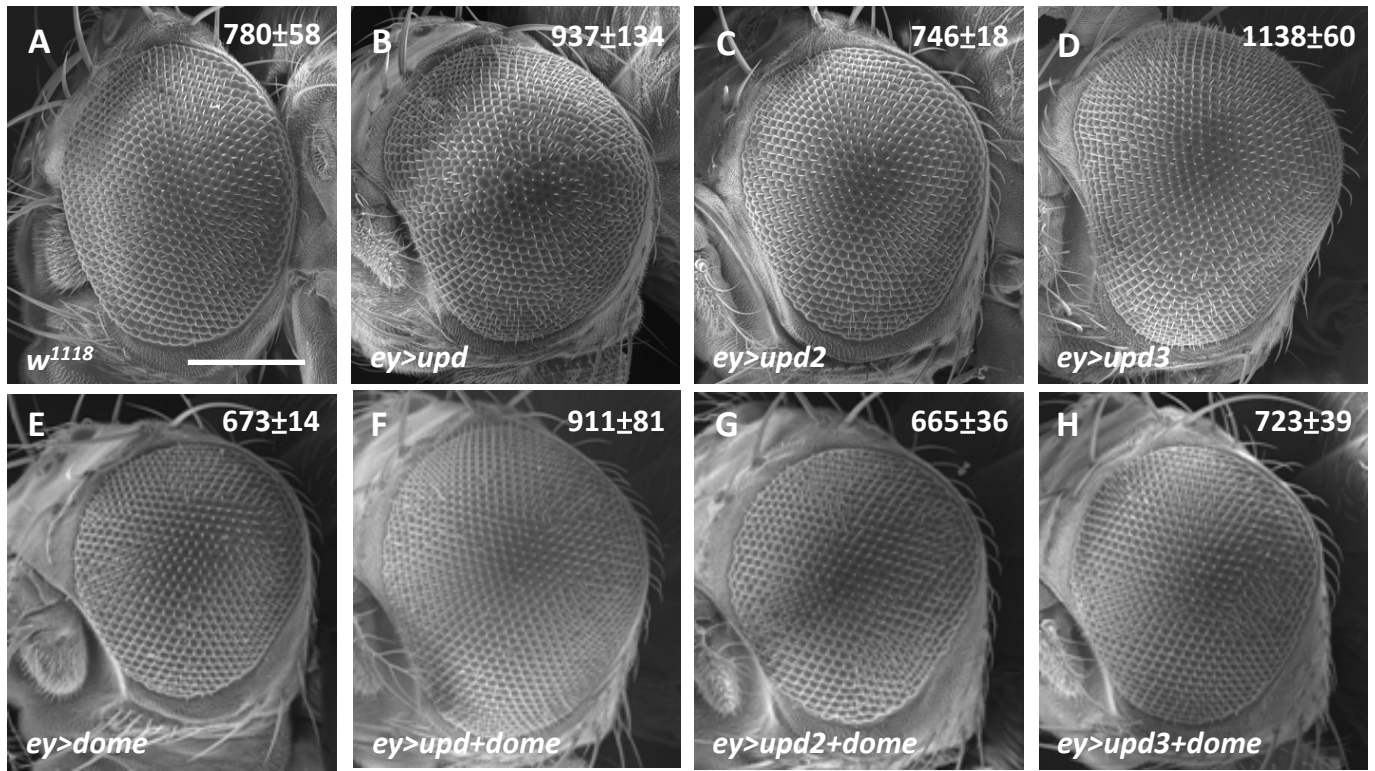
圖九、Upd-likes表達於眼碟未分化區域對成蟲複眼表型的影響

在眼碟未分化區域利用*ey-Gal4*表達單獨以及不同組合的*UAS-upd-likes*，以掃描式電子顯微鏡(Scanning electron microscope, SEM)觀察果蠅成蟲複眼表型。(A)以*ey-Gal4*表達*UAS-upd(ey>upd)*於眼碟未分化區域，導致果蠅成蟲複眼變大，其小眼數增加為約900~1000顆。(B)以*ey-Gal4*表達*UAS-upd2(ey>upd2)*的果蠅成蟲，其複眼大小類似於野生型果蠅，小眼數目約750顆。(C)當利用*ey-Gal4*表達*UAS-upd3(ey>upd3)*，結果類似於Upd造成果蠅成蟲複眼變大，小眼數目增加到約1000顆。(D)利用*ey-Gal4*表達*UAS-upd*和*UAS-upd2*的組合(*ey>upd; upd2*)，造成果蠅成蟲小眼數目增加，複眼變大的表型。(E)利用*ey-Gal4*表達*UAS-upd-GFP*和*UAS-upd3*的組合(*ey>upd-GFP; upd3*)，結果造成果蠅成蟲複眼向外凸出，小眼數目並未增加，頭部產生嚴重缺陷。(F)利用*ey-Gal4*表達*UAS-upd2-GFP*和*UAS-upd3*的組合(*ey>upd2-GFP; upd3*)，造成果蠅成蟲小眼數目增加，複眼變大的表型。(G、H、I)表達兩倍劑量的*upd-like*基因皆造成果蠅成蟲小眼數目增加，複眼變大的表型。 $n \geq 7$ (Scale bar: 200µm)



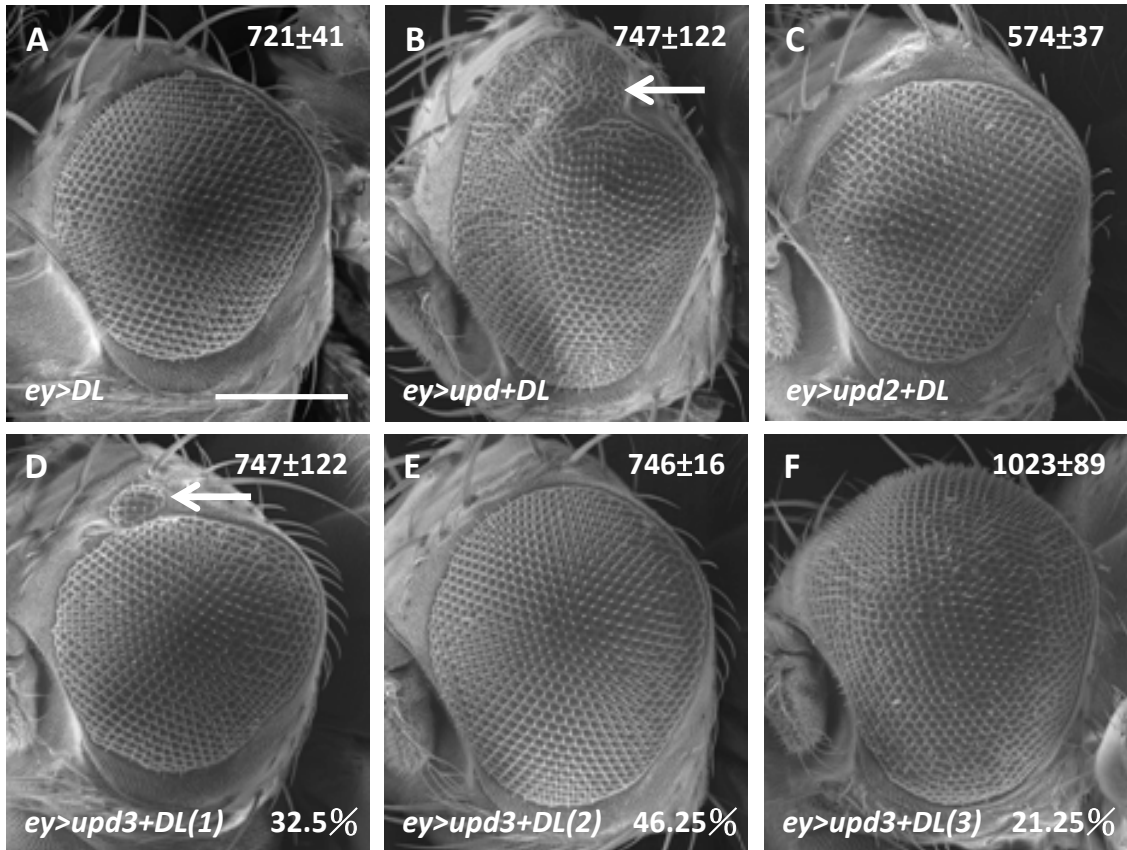
圖十、在果蠅眼碟未分化區域表達Upd-likes和Dome或Domelike受體對Jak/STAT訊息鏈的影響

觀察當Upd-like蛋白與Dome或Domelike受體共同表達於眼碟未分化細胞的區域時，對於Jak/STAT訊息傳遞鏈活性的影響。利用Jak/STAT訊息傳遞鏈活性的報告者：10XSTAT92E-GFP-NLS反應Jak/STAT訊息的活性，綠色螢光代表有Jak/STAT訊息傳遞鏈活性的區域，紅色訊號標示分化中的視神經細胞(Elav)，藍色為Phalloidin。(A、A')利用*ey-Gal4*單獨表達*UAS-dome*(*ey>dome*)內生性的Jak/STAT訊息傳遞鏈活性被抑制。(B、B')利用*ey-Gal4*單獨表達*UAS-domelike*(*DL*)(*ey>DL*)內生性的Jak/STAT訊息傳遞鏈活性也被抑制。(C、C')當Upd和Dome受體同時表達(*ey>upd; dome*)於眼碟未分化區域時，Jak/STAT訊息傳遞鏈會被活化。(D、D')當Upd和Domelike受體同時表達(*ey>upd; DL*)，在未分化區域中Jak/STAT訊息傳遞鏈被活化，且在眼碟背側區域產生一群向外突出的細胞，且有Jak/STAT訊息傳遞鏈的活化(白色箭號)。(E、E')當Upd2和Dome受體同時表達(*ey>upd2; dome*)，內生性的Jak/STAT訊息傳遞鏈活性被抑制。(F、F')當Upd2和Domelike受體同時表達(*ey>upd2; DL*)，內生性的Jak/STAT訊息傳遞鏈活性被抑制。(G、G')Upd3和Dome受體同時表達(*ey>upd3; dome*)，未分化區域的Jak/STAT訊息傳遞鏈被活化。(H、H')Upd3和Domelike受體同時表達(*ey>upd3; DL*)，未分化區域的Jak/STAT訊息傳遞鏈被活化，眼碟背側產生一群向外突出的細胞，且有Jak/STAT訊息傳遞鏈的活化。(Scale bar: 100µm)



圖十一、表達Upd-likes和Dome受體對果蠅成蟲複眼表型的影響

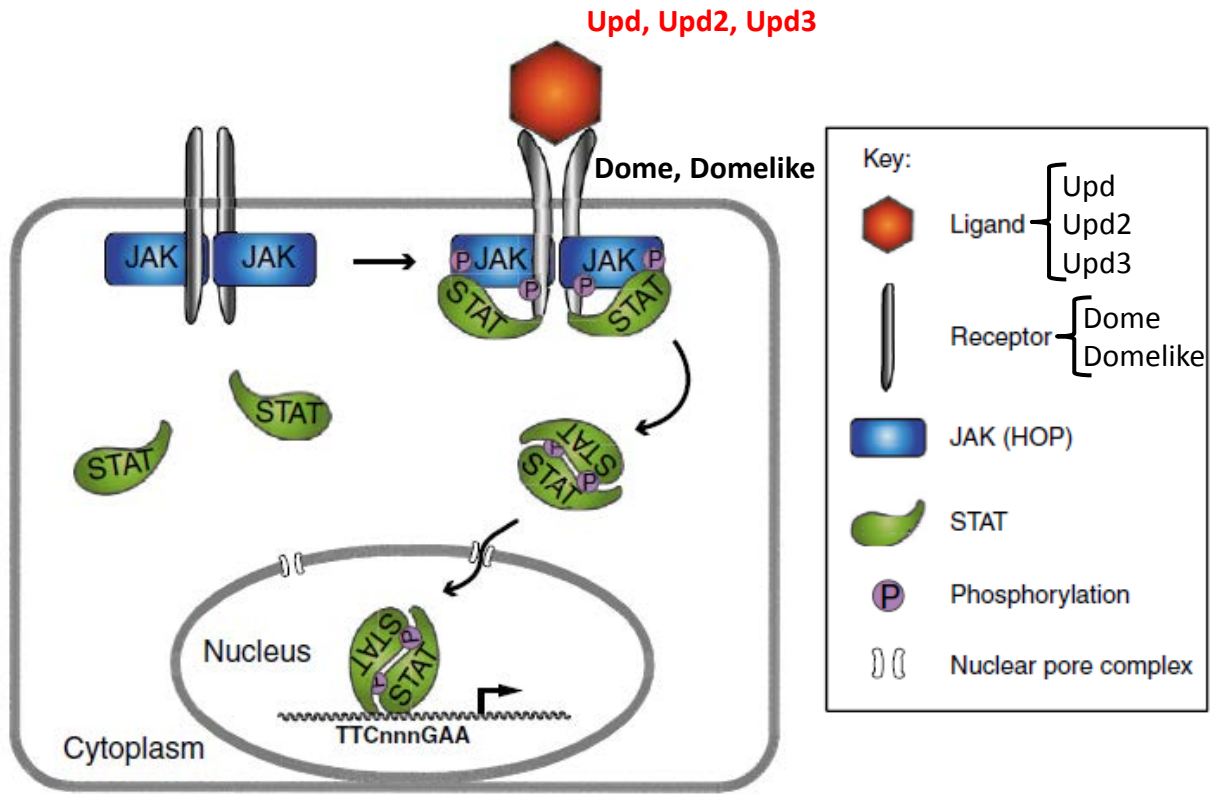
利用*ey-Gal4*表達不同組合的*UAS-upd-likes*與*UAS-dome*受體，以掃描式電子顯微鏡(SEM)觀察果蠅成蟲複眼表型。(A)野生型果蠅的複眼約有750~800顆的小眼。(B)以*ey-Gal4*表達*UAS-upd*(*ey>upd*)於眼碟未分化區域，導致果蠅成蟲複眼變大。(C)在*ey>upd2*的果蠅成蟲，其複眼大小類似於野生型果蠅。(D)在*ey>upd3*的果蠅中，成蟲複眼變大。(E)單獨表達Dome(*ey>dome*)在果蠅眼碟未分化細胞的區域時，會造成果蠅複眼變小的表型。(F-H)表達Upd-likes與Dome受體組合於眼碟未分化區域。(F)Upd與Dome受體同時表達(*ey>upd; dome*)，會造成複眼變大的表型。(G、H)Upd2和Upd3分別與Dome受體同時表達(*ey>upd2; dome*, *ey>upd3; dome*)，都呈現複眼變小的表型。(I)將Upd-likes單獨表達，以及與Dome受體同時表達，計算小眼數目作成統計分析圖表。單獨表達Upd(*ey>upd*)，以及Upd與Dome受體同時表達(*ey>upd; dome*)，在統計上無顯著差異。Upd2和Upd3分別與Dome受體同時表達(*ey>upd2; dome*, *ey>upd3; dome*)，和Upd2、Upd3單獨表達(*ey>upd2*, *ey>upd3*)，在統計上有顯著差異($P<0.01$)。 $n \geq 7$ (n.s.: non-significant) (Scale bar: 200 μ m)



圖十二、表達Upd-likes和Domelike受體對果蠅成蟲複眼表型的影響

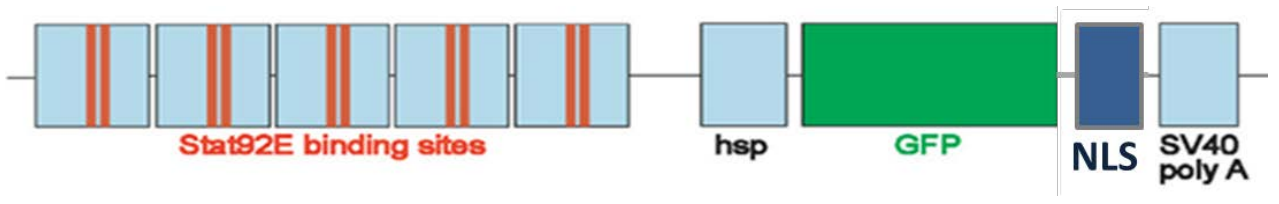
利用*ey-Gal4*表達不同*UAS-upd-like*與*UAS-Domelike*受體的組合，以掃描式電子顯微鏡(SEM)觀察果蠅成蟲複眼表型。(A)單獨表達Domelike(*ey>DL*)在果蠅眼碟未分化細胞的區域時，會造成果蠅成蟲複眼變小的表型。(B)Upd與Domelike同時表達(*ey>upd; DL*)於眼碟未分化區域，造成果蠅成蟲複眼向頭頂延伸的表型(白色箭號)。(C)Upd2與Domelike同時表達(*ey>upd2; DL*)，造成果蠅成蟲複眼變小。(D-F)Upd3與Domelike同時表達(*ey>upd3; DL*)產生三種不同的表型。(D)第一種是複眼變小，但在頭頂生成額外的複眼(白色箭號，出現機率：32.5%)。(E)第二種是複眼大小接近於野生型的果蠅(出現機率：46.25%)。(F)第三種是複眼變大接近於Upd3單獨表達的表型(出現機率：21.25%)。n≥7 (Scale bar: 200μm)

A



B

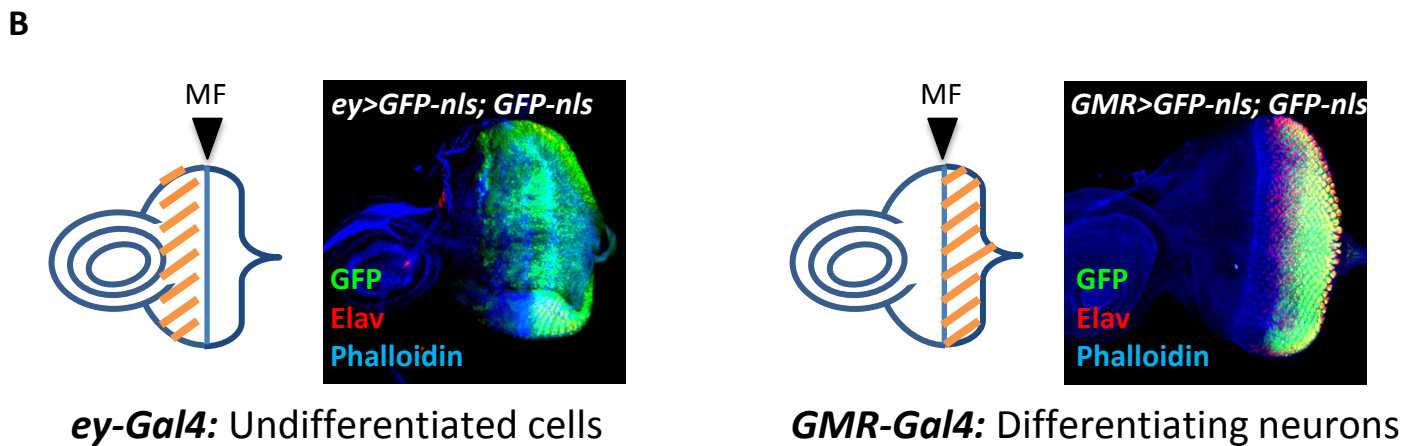
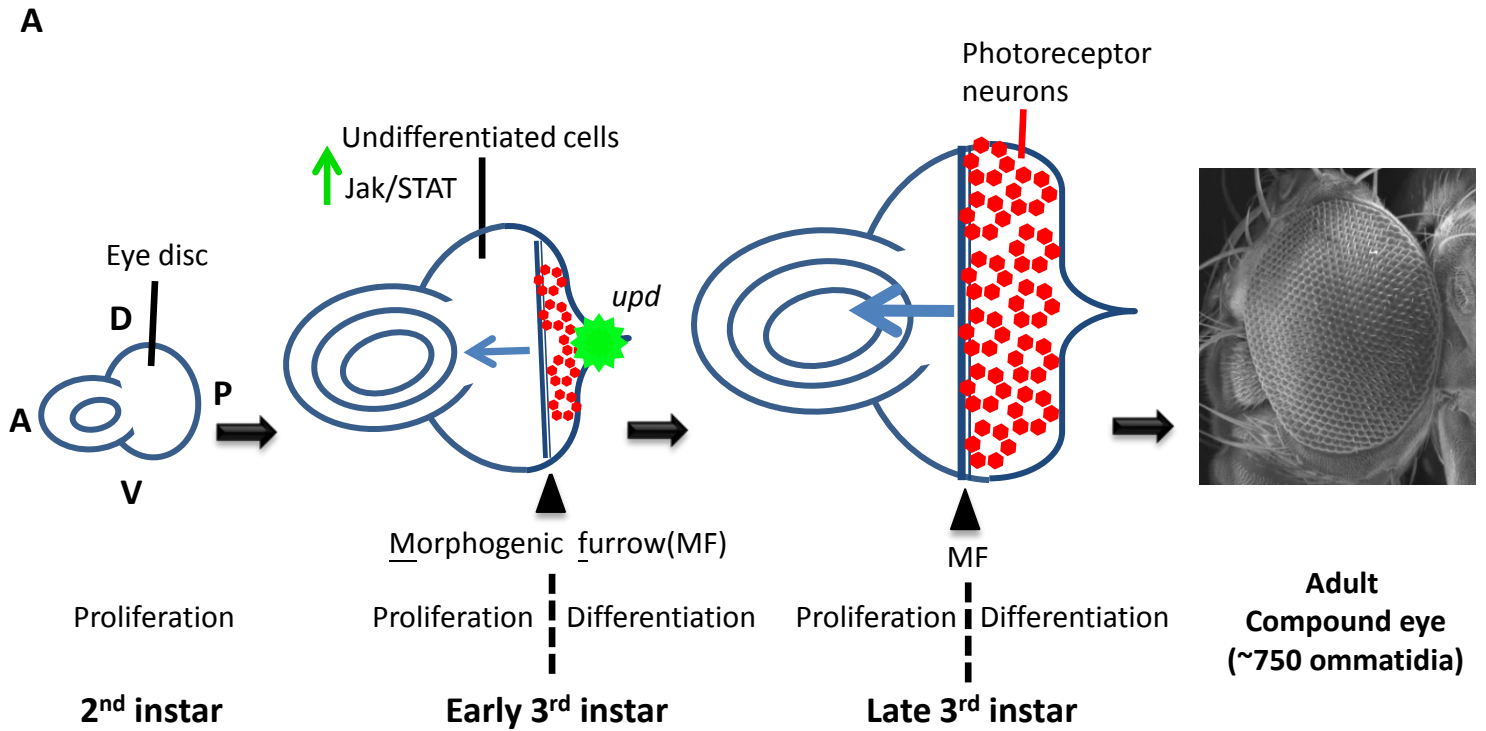
10XSTAT92E-GFP-nls: Jak/STAT activity reporter



(Lin, 2010)

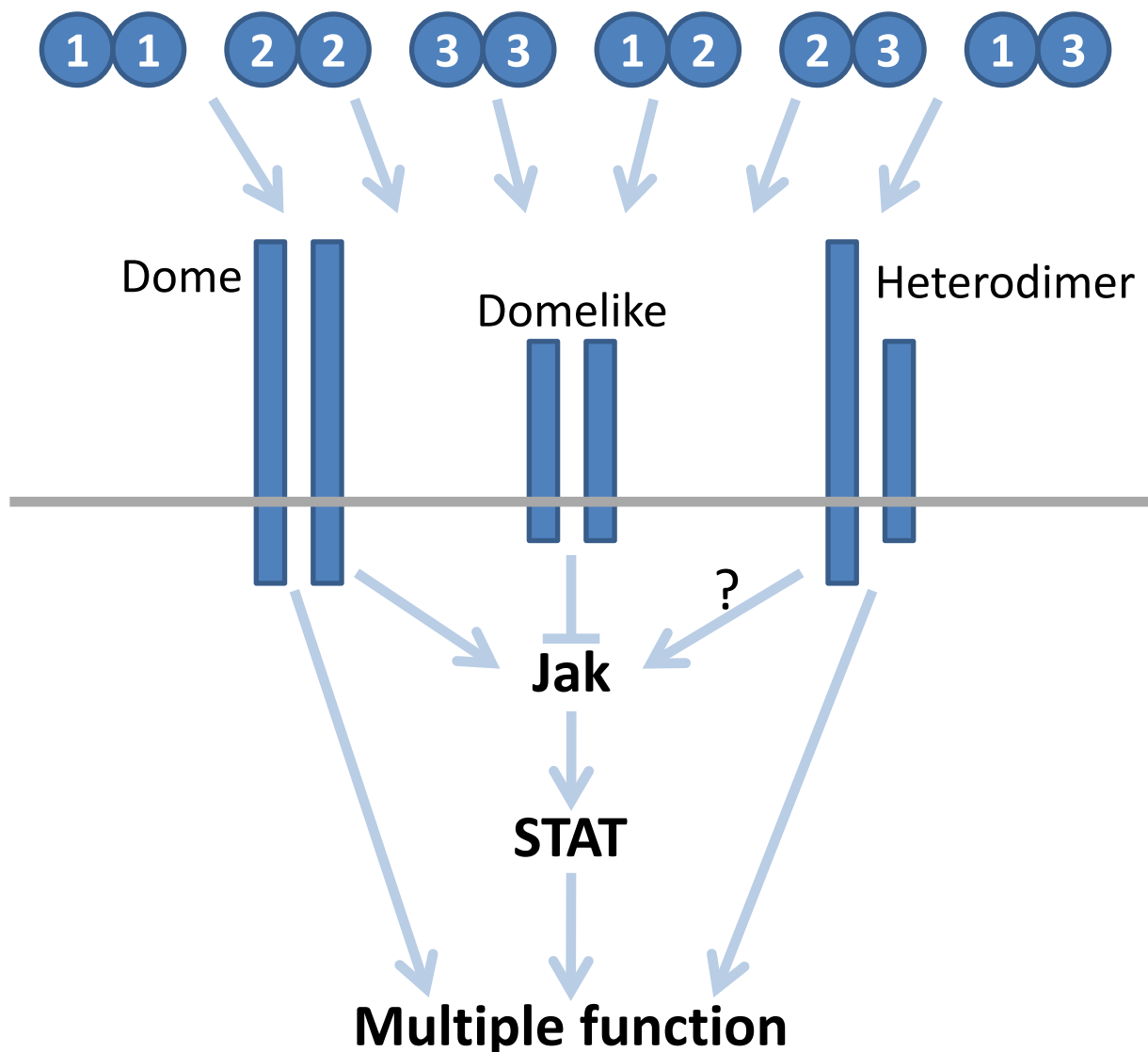
附圖一、果蠅Jak/STAT訊息傳遞鏈及其活性的報告者10XSTAT92E-GFP-NLS

(A)果蠅的Jak/STAT訊息傳遞鏈有三個配體：Unpaired(Upd)、Upd2、Upd3(合稱Upd-likes)，以及兩個受體：Domeless(Dome)、Domelike。當Upd-likes結合至Dome受體，會使受體構形發生改變，活化結合在受體上的Jak kinase，活化的Jak kinase會磷酸化Dome，使Dome上產生一個連接點，使STAT結合至Dome受體，最後Jak kinase會磷酸化STAT，而磷酸化的STAT會形成雙體(dimer)的型式，進入細胞核中，結合到特定的核苷酸序列(TTCnnnGAA)稱之為Gamma interferon Activated Site(GAS)，起始下游基因的轉錄(Arbouzova and Zeidler, 2006)。(B) Jak/STAT訊息傳遞鏈活性的報告者：10XSTAT92E-GFP-NLS，它是在十個STAT92E的結合位後面接上熱休克蛋白的啟動子(promoter)，及綠色螢光蛋白的報告基因，在綠色螢光蛋白之後接有細胞核訊息序列(nuclear localization sequence, NLS)，使綠色螢光蛋白進入細胞核中，以增加綠色螢光的解析度(Lin, 2010)。若有活化的STAT92E結合時，會誘導綠色螢光蛋白的表現，利用10XSTAT92E-GFP-NLS可觀察組織中有Jak/STAT訊息傳遞鏈活化的細胞。



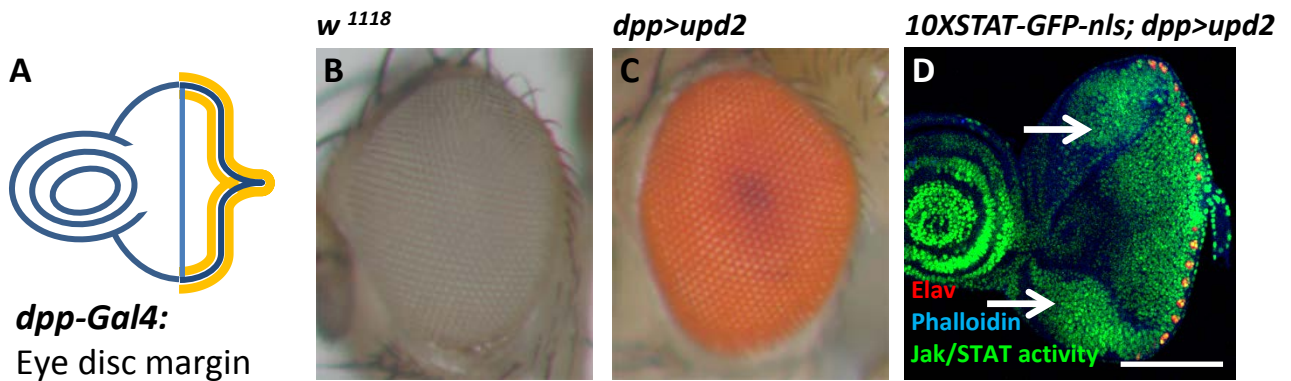
附圖二、果蠅複眼的發育過程及專一表達於果蠅眼碟的Gal4果蠅株*ey-Gal4*及*GMR-Gal4*

(A) 果蠅成蟲的複眼是由幼蟲體內一個盤狀構造發育而來，此盤狀構造稱為眼碟(eye imaginal discs)。在發育早期，眼碟上的細胞不斷的增生，在果蠅幼蟲二齡及三齡幼蟲早期，內生性的*upd* 表達於果蠅眼碟後緣的中點上，Upd蛋白表達後會長距離的分泌擴散，使眼碟中未分化細胞的Jak/STAT訊息傳遞鏈活性上升，促使未分化細胞進行細胞增生 (Tsai and Sun, 2004)。到三齡幼蟲時期，此時眼碟後緣細胞會壓縮，生成一條型態發生溝(Morphogenic furrow, MF)，型態發生溝從眼碟後緣向前端移動，此時型態發生溝所經過的細胞，將有機會被選為視神經細胞開始進行分化，形成果蠅成蟲的複眼 (Ready et al., 1976)，野生型果蠅的複眼約有750~800顆的小眼。此圖及本論文所有的眼碟左側皆為前端(A: Anterior)，右側為後端(P: Posterior)，上方為背側(D: Dorsal)，下方為腹側(V: Ventral)。(B) 實驗中主要運用兩種Gal4果蠅株，*ey-Gal4*：專一表達於果蠅眼碟未分化細胞的區域。*GMR-Gal4*：專一表達於果蠅眼碟分化中視神經細胞的區域。



附圖三、Jak/STAT 訊息傳遞鍵調控果蠅多種發育過程及生理反應之可能的分子機制模式圖

在先前的研究中發現Dome以及Domelike會形成同雙體及異雙體(Brown et al., 2003; Kallio et al., 2010; Makki et al., 2010)，並且唯有形成雙體的受體，才能接收配體的訊息，進而向下繼續傳遞訊號(Brown et al., 2003)。另一方面，我們也觀察到Upd-like蛋白在果蠅的各個發育階段中，都有表現區域很鄰近或重疊的現象。因此我們推測，三個Upd-like蛋白彼此之間也可能形成同雙體及異雙體，並藉由和不同的Dome受體結合，造成上游訊息的多樣性，再藉由受體細胞質區域的不同，將訊息傳給除了主要的Jak和STAT之外，可能還會傳給其它的訊息分支，並和Jak/STAT交互作用，進而調控多種不同的功能。



附圖四、表達*upd2*於果蠅眼碟邊緣的區域會活化Jak/STAT訊息鏈及造成成蟲複眼變大

由於不論表達*upd2*於果蠅眼碟的未分化區域(*ey-Gal4*)或已分化區域(*GMR-Gal4*)，都沒有觀察到眼碟中Jak/STAT訊息傳遞鏈活性的活化，成蟲複眼的大小也接近於野生型，所以為了確定實驗室的*UAS-upd2*果蠅株具有功能，也利用其它的*Gal4*果蠅株表達，並觀察相較於野生行是否有不同的表型。(A)*dpp-Gal4*是專一表達於果蠅眼碟邊緣的*Gal4*果蠅株。(B)野生型果蠅成蟲的複眼。(C)表達*upd2*於果蠅眼碟的邊緣(*dpp>upd2*)，發現相較於野生型可以造成成蟲複眼有變大的現象。(D)表達*upd2*於果蠅眼碟邊緣可活化Jak/STAT訊息傳遞鏈的活性，以Jak/STAT訊息傳遞鏈活性的報告者(10XSTAT-GFP-NLS)觀察，綠色螢光代表有Jak/STAT訊息傳遞鏈活性的區域，紅色訊號標示分化中的視神經細胞(Elav)，藍色為Phalloidin，可見Jak/STAT訊息傳遞鏈在眼碟未分化區域的邊緣明顯的被活化(白色箭號)。顯示實驗室所用的*UAS-upd2*果蠅株具有功能，但唯有表達於眼碟邊緣時才能活化Jak/STAT訊息傳遞鏈，並造成成蟲複眼變大。

個人資料

中文姓名：王柏凱

英文姓名：Po-Kai Wang

出生日期：1987年10月17日

戶籍地址：新北市新店區寶橋路76號4樓

聯絡電話：0921409776

電子信箱：kaicanfly@hotmail.com

學歷：

東海大學生命科學系學士(2006-2010)

東海大學生命科學系生物醫學組碩士班

經歷：

東海大學生命科學系分子生物學實驗兼任助教(2010)